CAROLINE SANUZI QUIRINO DE MEDEIROS

CRIPTOCOCOSE EXPERIMENTAL E EFEITO DE DROGAS ANTIFÚNGICAS

RECIFE
Setembro/2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

CRIPTOCOCOSE EXPERIMENTAL E EFEITO DE DROGAS ANTIFÚNGICAS

Aluna: Caroline Sanuzi Q. de Medeiros

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Área de Concentração:
Fungos de interesse médico

Orientador:
Prof[a]. Dr[a]. Rejane Pereira Neves

Co-orientador:
Prof. Dr. José Vitor Moreira Lima Filho

RECIFE
Setembro/2010

Medeiros, Caroline Sanuzi Quirino de
Criptococose experimental e efeito de drogas antifúngicas / Caroline Sanuzi Quirino de Medeiros. – Recife: O Autor, 2010.

62 folhas: il., fig., tab.
Orientador: Rejane Pereira Neves.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biologia de fungos, 2010.
Inclui bibliografia e anexos.

1. *Cryptococcus neoformans* 2. Beta-lapachona 3.Micologia I. Título.

579.59 CDD (22. ed.) UFPE/CCB-2010- 201

CRIPTOCOCOSE EXPERIMENTAL E EFEITO DE DROGAS ANTIFÚNGICAS.

CAROLINE SANUZI QUIRINO DE MEDEIROS

Data da defesa: 18 de fevereiro de 2009

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Drª Rejane Pereira Neves (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Drª. Oliane Maria Correia Magalhães
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho
Universidade Federal de Pernambuco

"Um súbito pensamento errôneo pode dar
lugar a uma indagação frutífera que revela verdades
de grande valor."

Isaac Asimov

Dedico

Ao meu pai, Péricles Medeiros, que partiu tão precocemente, deixando tantas saudades. De onde estiver sei que está feliz, a me ver concluir mais uma etapa do nosso sonho. Graças a ele, tive a possibilidade de desenvolver este trabalho.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus por sempre iluminar meus caminhos.

A Universidade Federal de Pernambuco, ao Centro de Ciências Biológicas e ao Departamento de Micologia, pela oportunidade oferecida para a realização do Curso de Mestrado em Biologia de Fungos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da UFPE nas pessoas da Coordenadora Leonor Maia, da Vice-coordenadora Elaine Malosso e da secretária Giovana.

Ao Prof. Armando Marsden, chefe do laboratório de Micologia Médica, por disponibilizar as instalações necessárias ao desenvolvimento deste trabalho.

À minha orientadora Rejane Pereira Neves, quem muito admiro, pela orientação, apoio e amizade, indispensáveis para a condução e finalização deste trabalho.

Ao Pof. José Vitor Moreira de Lima Filho, pela co-orientação, estímulo e liberdade em todos os momentos em que este trabalho foi desenvolvido.

Ao Prof. Celso Câmara pela síntese da beta-lapachona.

Ao Prof. Nicodemos Telles, pela realização das análises histológicas e contribuição no aprimoramento deste trabalho.

À Profª Oliane Maria Correia Magalhães, pelo exemplo de profissional e pessoa, sempre prestativa e incentivadora de meu desenvolvimento profissional.

Aos colegas da Micologia, Rubão, Aline, Dani, Vanessa, Ana Maria, Helô, Bil, e em especial á Patrícia, Suanni e André, pela amizade, apoio e colaboração na realização deste trabalho.

Aos colegas de turma, pelos agradáveis momentos vividos e pelos elos de amizades formados.

Aos amigos do Laboratório Central pela compreensão, incentivo e momentos de distração proporcionados.

Ao meu namorado Odinilson por ser tão especial e por tornar os momentos da minha vida mais felizes, além da colaboração neste trabalho.

A minha família, pelo amor, paciência, compreensão e apoio incondicional.

RESUMO GERAL

Cryptococcus neoformans é considerado o principal agente etiológico da Criptococose. A infecção tem início geralmente nos pulmões, disseminando para outros órgãos. O sistema nervoso central é o principal alvo em que a levedura sobrevive, prolifera e causa meningite e meningoencefalite, podendo ser letal. O propósito desta pesquisa foi avaliar a eficácia terapêutica da beta-lapachona e Anfotericina B na criptococose experimental. Camundongos foram imunossuprimidos com 5mg de dexametasona via intraperitoneal e infectados com 10^6 UFC/mL de *C. neoformans* URM5811 uma semana após a imunossupressão pela veia caudal. Após sete dias os camundongos foram tratados diariamente com beta-lapachona (10mg/Kg) ou anfotericina B (0,5mg/Kg) via endovenosa. O grupo controle recebeu tampão fosfato seguindo o mesmo tempo de tratamento. A Concentração Mínima Inibitória da beta-lapachona e anfotericina B foram de 4μg/mL e 0,5μg/mL, respectivamente. A Concentração Mínima Fungicida para a beta-Lapachona foi 64μg/mL. Os ensaios revelaram que a beta-lapachona na concentração de 10mg/mL não apresentaram toxicidade para camundongos imunossuprimidos após uma semana de exposição crônica. Camundongos imunossuprimidos infectados por *C. neoformans* e tratados com 10mg/kg de beta-lapachona debelaram as leveduras do baço e fígado e diminuíram a concentração de leveduras no pulmão e cérebro após 14 dias de infecção quando comparado com o grupo tratado com tampão fosfato ($P<0.05$). Esses resultados foram similares para o grupo tratado com anfotericina B. Os resultados indicam que a beta-lapachona é uma droga promissora para o tratamento de criptococose disseminada, apresentando potente atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-Chaves: Criptococose, *C. neoformans*, Beta- lapachona, Anfotericina B, infecção experimental.

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans have been described as the main etiological agents of cryptococcosis**.** The infection commonly starts in the lungs and disseminate to several organs. The central nervous system is the main target where the yeast survives, proliferates and leads to meningitis and meningoencephalitis, which could be lethal. The study aims evaluate the therapeutic efficacy of beta-lapachone and amphotericin B on the experimental cryptococcosis. Mice were immunosuppressed with dexamethasone by intraperitoneally route and challenged with 10^6 CFU/mL of *C. neoformans* strain 5811 one week after the immunosuppression by the tail vein. After seven days, were treated daily with beta-lapachone (10 mg/Kg) or amphotericin B (0,5 mg/Kg) by intravenously route. The control group received phosphate saline following the same schedule for the experimental ones. The Minimal Inhibition Concentration for beta-lapachone and amphotericin B reached 4 μg/L and 0,5 μg/L, respectively. The Minimal Fungicidal Concentration for beta-lapachone reached 64 μg/L. Assays revealed beta-lapachone at 10 mg/Kg was not toxic to immunosuppressed mice after one week of chronic exposure. Immunosuppressed mice infected by *C. neoformans* and treated with 10 mg/Kg of beta-lapachone cleared the yeast from the spleen and liver and decreased its concentration in the lungs and brain after fourteen days infection, when compared to phosphate saline group ($P < 0.05$). These results were similar to amphotericin-treated group. The results sustain that beta-lapachone is a potential drug for treatment of disseminated cryptococcosis, showing a potent *in vitro* and *in vivo* antifungal activity.

Keywords: Cryptococcosis, *C. neoformans*, Beta-lapachone, Amphotericin B, Experimental infection.

SUMÁRIO

	Páginas
1. INTRODUÇÃO	**10**
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	**12**
2.1 Criptococose	**12**
2.2 *Cryptococcus neoformans*	**15**
2.3 Resposta imune ao *Cryptococcus*	**17**
2.4 Diagnóstico	**19**
2.5 Criptococose experimental	**21**
2.6 Drogas antifúngicas	**22**
2.6.1 Anfotericina B	**24**
2.7 Susceptibilidade aos antifúngicos	**26**
2.8 Resistência em *Cryptococcus neoformans*	**27**
2.9 Beta- lapachona como fitoterápico	**28**
3. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA NAFTOQUINONA BETA-LAPACHONA CONTRA INFECÇÃO DISSEMINADA POR *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* VAR. *NEOFORMANS* EM CAMUNDONGOS SUIÇOS IMUNOSSUPRIMIDOS POR DEXAMETAXONA	**32**
4. CONSIDERAÇÕES GERAIS	**44**
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	**45**
ANEXO	

1. INTRODUÇÃO

A criptococose é uma micose de distribuição cosmopolita e caráter oportunista, causadas por espécies de *Cryptococcus* cuja inalação das estruturas viáveis do constitui-se na principal via de contaminação (SORREL; ELLIS, 1997; ORDÓNEZ; CASTÃNEDA, 2001; BARBOSA et al., 2005). Os representantes desse gênero se reproduzem predominantemente por brotação e caracterizam-se, em geral, por apresentar colônia mucóide com atividade ureásica e sem capacidade fermentativa (BARNETT et al., 2000, HOOG et al., 2000; LACAZ et al., 2002).

O agente etiológico da criptococose de maior incidência é *C. neoformans*, levedura encapsulada que apresenta uma notável capacidade de infectar e causar doença em uma variedade de hospedeiros (CASADEVALL et al., 2000; CHIKAMORI; FUKUSHIMA, 2005). Esta espécie apresenta variedades como C. *neoformans* var. *neoformans, C. neoformans* var. *gatti e C. neoformans* var. *grubii* (ORDÓÑEZ; CASTÃNEDA, 2001; HORTA et al., 2005). Contudo *C. albidus*, *C. laurenttii* e *C. unigutulatus* também têm sido isolados como agente causador desta micose (ORDÓÑEZ; CASTÃNEDA, 2001; SIDRIM; ROCHA).

A capacidade de *Cryptococcus* produzir doença depende Do estado imunológico do hospedeiro e de fatores de virulência do fungo como produção de cápsula mucopolissacarídica e enzimas os quais são capazes de aumentar a sobrevivência da levedura no hospedeiro, facilitando o desencadeamento e a persistência da doença (CHEN et al., 2003; CHIKAMORI; FUKUSHIMA, 2005; LIN; HEITMAN, 2006).

A infecção primária em indivíduos imunocompetentes ocorre, contudo nos imunodeprimidos o número de casos tem se tornado significativamente crescente com o advento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), entretanto outros fatores contribuem, tais como, as terapias com drogas imunossupressoras, câncer, diabetes *mellitus* e indivíduos submetidos a transplantes (PERFECT, 2005; LITVINTSECA et al., 2006).

A doença, geralmente de origem pulmonar tende a disseminar-se para vários órgãos, principalmente para o sistema nervoso central (SNC), uma vez que as leveduras apresentam tropismo por este sítio corpóreo causando meningite e meningoencefalite podendo estas serem fatais se não forem diagnosticadas e tratadas adequadamente (COLE et al., 1996; PERFECT, 2005; LIN; HEITMAN, 2006).

O tratamento da criptococose até o momento é realizado com anfotericina B, contudo essa droga de escolha apresenta toxicidade, tornando-se necessária a busca de drogas alternativas com menos efeitos adversos (MARCUCCI et al., 2001; BANSKOTA et al., 20020. Para esse fim, novos compostos podem ser testados como a β-lapachona, uma quinona sintetizada do lapachol, obtido do Ipê-Roxo (*Tabebuia avellanedae* - Bignoneaceae), que apresenta ação antifúngica, antitumoral, antibacteriana e anti *Trypanosoma* (OLIVEIRA-BRETT et al., 2002), a qual até o momento, não foi testada no tratamento da criptococose. Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia terapêutica da Beta-lapachona na criptococose disseminada em camundongos Suiços imunossuprimidos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Criptococose

A criptococose, conhecida anteriormente por Torulose, Blastomicose Européia ou doença de Busse – Buschke é uma micose crônica, subaguda ou aguda potencialmente fatal, de distribuição cosmopolita, e que acomete mamíferos domésticos, principalmente, o gato e o cão, animais silvestres e o homem (DARZÉ et al., 2000; HONSHO et al., 2003; LARSSON et al., 2003; PEREIRA & COUTINHO, 2003; REOLON et al., 2004; TABOADA, 2004).

Esta micose não apresenta predileção por sexo ou raça, sendo mais frequente em adultos, acometendo raramente crianças (GOLDMAN et al., 2001). Pode se manifestar tanto como doença oportunista em pacientes imunossuprimidos, quanto como doença primária em indivíduos imunocompetentes, dependendo da espécie infectante (SORREL, 2001; TORRES-RODRÍGUES et al., 2003; IDNURM et al., 2005; CAPILLA et al., 2006).

O agente etiológico da criptococose de maior ocorrência é a levedura capsulada *Cryptococcus neoformans*, a qual pode ser isolada em madeira em decomposição e excretas de pássaros, este último constituindo um importante fator na transmissão do microorganismo (McCURDY; MORROW, 2001; AVERBUCH et al., 2002; LEE et al., 2004).

A alta prevalência da levedura em isolados ambientais, associada à rara transmissão homem-homem ou animal-animal, indica que a infecção é adquirida através de fontes ambientais do fungo, principalmente através da inalação das estruturas fúngicas, sobretudo, em fezes de aves (GATES et al., 2004: KOMMERS et al., 2005).

As outras espécies do gênero geralmente são consideradas sapróbias, existindo raros relatos de infecções causadas por *C. albidus*, *C. laurenttii*. Outras espécies isoladas de material clínico, consideradas de menor importância, são *C. unigutulatus* C. *curvatus*, *C. adeliensis*, *C. humiculus*, *C. luteolus* e *C. macerans* (McCURDY; MORROW, 2001; AVERBUCH et al., 2002; LEE et al., 2004; DELGADO et al., 2005; SOARES et al., 2005; KHAWCHAROENPORN et al., 2007).

Segundo IDNURM et al. (2005) a prevalência da infecção por C. neoformans está diretamente relacionada com o grau de exposição à levedura e com a condição imune do hospedeiro. Até a década de 70, infecções fúngicas oportunistas causadas por esta levedura eram de rara ocorrência. Entretanto, na década de 80, o número de casos

elevou-se com a expansão de pacientes gravemente doentes/ e ou imunossuprimidos, incluindo principalmente os pacientes infectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), ou com câncer, que apresentam neutropenia induzida por quimioterapia, e ainda os transplantados, que recebem terapia imunossupressiva. Outros fatores que também contribuem são o uso de antibióticos de amplo espectro e glicocorticóides (PEREA; PATTERSON, 2002; LIN; HEITMAN, 2006).

De acordo com MOREIRA et al. (2006), a criptococose é considerada atualmente a doença oportunista com maior morbidade e mortalidade entre os pacientes soropositivos para HIV sendo o agente um patôgeno humano emergente. DEL VALLE et al. (2006) afirmam que a meningite criptococócica é a infecção fúngica mais comum do SNC e a terceira mais frequente complicação neurológica em pacientes com AIDS.

A criptococose manifesta-se com diversos quadros clínicos sendo aparentemente a primo-infecção de origem pulmonar. Segundo HULL; HEITMAN (2002); ABEGG et al. (2006) algumas evidências indicam que a infecção se inicia nos pulmões tais como a identificação de excretas de aves como reservatório ambiental e a descoberta nestas de partículas infecciosas cujo tamanho é compatível com a deposição alveolar, além do reconhecimento da pneumonia criptococócica e descrição de nódulos subpleurais infectados.

Cryptococcus pode colonizar o sistema respiratório sem produzir doença em indivíduos imunocompetentes, apresentando-se de forma assintomática e regressiva, com resposta imunológica evoluindo para cura. As leveduras podem permanecer latentes nos linfonodos pulmonares, onde são destruídas ou sofrem reativação em um momento de imunossupressão (NISHIKAWA et al., 2003; LIN; HEITMAN, 2006).

Dependendo do estado imunológico do paciente, a partir da infecção pulmonar, pode haver proliferação e disseminação por via linfo-hematogênica para o baço, fígado, rins, íleo, olhos, miocárdio, ossos e, em especial, para o SNC, sítio pelo qual a levedura apresenta tropismo acentuado. No SNC acarreta quadros de meningite, encefalite, ou meningoencefalite após atravessar a barreira hematoencefálica, alcançando o endotélio microvascular do cérebro (TORRES-RODRÍGUES et al., 2003; OLSZEWSKI et al., 2004; CAPILA et al., 2006).

Esta preferência pelo SNC se deve a fatores que contribuem para a viabilidade das leveduras, tais como a presença de catecolaminas, importantes para a formação da cápsula de melanina (dificulta a fagocitose), falta de atividade do complemento e à fraca

ou ausente resposta inflamatória no tecido cerebral (SEVERO et al., 1998; LIN; HEITMAN, 2006).

De acordo com HOANG et al. (2004); FRIEDMAN et al. (2005) a maioria das infecções pulmonares por C. neoformans não é detectada porque a exposição inicial e a infecção são assintomáticas ou subclínicas. Os sinais e sintomas quando presentes são relativamente inespecíficos, proporcionando assim o aumento de casos subdiagnosticados de criptococose, principalmente em pacientes imunossuprimidos.

Por outro lado quando acometem pacientes imunocompetentes, os sintomas são tosse, mal estar, dor torácica, pouca produção de escarro, perda de peso, febre baixa e hemoptise leve, e sinais radiológicos variáveis podendo ser estas, as manifestações clínicas iniciais (HOANG et al., 2004; FRIEDMAN et al., 2005).

A doença invasiva pulmonar quase sempre ocorre na condição de imunossupressão ou em casos de doenças crônicas, podendo o exame radiológico do tórax revelar nódulos, massas, cavidades, derrame pleural, infiltrado inflamatório intersticial ou linfoadenopatia, devendo-se excluir nestes casos doenças como neoplasia pulmonar e tuberculose dentre outras (TRILLES et al., 2004; PERFECT, 2005; BIVANCO et al., 2006).

No SNC, a criptococose pode ser encontrada com características de meningite, meningoencefalite. A manifestação clínica da infecção criptocócica, particularmente na meningite, pode ser súbita, com poucos sinais ou sintomas. A sintomatologia mais comum inclui mal estar, febre podendo evoluir para cefaléia frontal ou temporal, vômitos e sinais de irritação meníngea. Mudanças comportamentais e perda de memória são também comuns durante a infecção em casos mais graves, observa-se confusão mental, topor, apatia, edema papilar, perda visual, hidrocefalia e massas intracerebrais. (NISHIKAWA, 2003; TRILLES, 2004; VILCHEZ et al., 2002; CASALI et al., 2003).

De acordo com KUMAR et al. (2005); XIUJIAO; XU (2005); BIVANCO et al. (2006), além de acometer os sistemas respiratório e nervoso, a criptococose pode manifestar-se por meio de lesões cutâneas. Essas ocorrem geralmente por disseminação hematogênica (criptococose cutânea secundária – CCS), ou de forma rara e localizada, por inoculação do fungo de modo traumático (criptococose cutânea primária – CCP). As lesões geralmente são múltiplas acometendo principalmente a face, sendo representada por máculas avermelhadas, pápulas, pústulas, nódulos ou úlceras (TRILLES et al., 2004).

Nos indivíduos que fazem uso de corticosteróides é observado celulite com eritema e endurecimento (TRILLES et al., 2004). MARTINEZ et al. (2001), afirmam que este tipo de manifestação clínica da criptococose é menos comum, sendo mais prevalente no norte da Europa, atingindo cerca de 10% a 15% dos pacientes.

Os tratamentos antirretrovirais e antifúngicos reduziram o número de mortes por criptococose, e, mesmo assim, em alguns países em desenvolvimento onde o tratamento é limitado, a mortalidade devido à criptococose em pacientes com AIDS pode ser maior que 30% (IDNURM et al., 2005).

No Brasil, pesquisas mostram que 4,5% das infecções oportunistas associadas à pacientes portadores de HIV são causadas por *C. neoformans*, com predominância da variedade neoformans (JANBON, 2004).

2.2 *Cryptococcus neoformans*

O gênero Cryptococcus reúne aproximadamente 38 espécies de leveduras, fungos unicelulares, que se reproduzem predominantemente por brotação, podendo algumas linhagens ocasionalmente produzir pseudohifas, observadas em secções de tecidos. Morfofisiologicamente caracteriza-se por apresentar colônia mucoíde, ausência de capacidade fermentativa, capacidade de assimilar inositol e produzir urease além de ser sensível a cicloheximida (BARNETT et al., 2000; HOOG et al., 2000; IKEDA et al., 2002; LACAZ et al., 2002).

Cryptococcus neoformans é um basidiomiceto de forma esférica ou globosa, com diâmetro aproximado de 2-8 μm com brotamentos simples ou, raramente, múltiplos (FAGANELLO et al., 2006), apresentando uma cápsula mucopolissarídica (ZARAGOSA et al., 2003). Esta levedura desenvolve-se *in vitro* entre 48 e 72 horas, produzindo colônias mucóides, lisas, de coloração branca a creme, sendo o grau de mucosidade da colônia dependente da formação da cápsula mucopolissacarídica (ZAGAROSA et al., 2006).

Este patógeno oportunista é encontrado em frutas, pele de animais, pessoas imunologicamente comprometidas, no meio ambiente em detritos de origem vegetal e animal, e principalmente em excretas de aves, onde pode permanecer viável por mais de dois anos (NELSON; COUTO, 2001; LARSSON et al., 2003; PEREIRA: COUTINHO, 2003; TABOADA, 2004).

Cryptococcus neoformans foi descrito como patógeno humano em 1894 por Otto Busse e Abraham Buschke, isolado de uma lesão na tíbia. Um ano mais tarde, Sanfelice isolou uma levedura encapsulada a partir de suco de pêssego fermentado e demonstrou a sua patogenicidade em animais de laboratório. A recuperação do microorganismo a partir de lesões de humanos e de animais e seu isolamento do ambiente estabeleceram o potencial patogênico e a capacidade de vida livre, respectivamente (CASADEVALL; PERFECT, 1998; LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA et al., 2004).

O tamanho da cápsula varia consideravelmente e é determinado por características genéticas da cepa e pelas condições de cultivo ou ambientais, apresentando pequenas cápsulas quando no ambiente, entretanto durante a infecção, há um aumento significante de seu tamanho devido à presença de estímulos, tais como altos níveis de CO_2 e limitação de ferro (ZAGAROSA et al., 2003).

Segundo CASALI et al, (2001) e NISHIKAWA et al (2003), a presença da cápsula de mucopolissacarídeo é uma característica distinta, sendo considerada importante fator de virulência antifagocítico. Aproximadamente 90% da cápsula é constituída pelos polissacarídeos glucuronoxilomanana, galactoxilomanana e manoproteína.

A diferença na estrutura das glucuronoxilomananas permite a identificação de cinco sorotipos agrupados em três variedades reconhecidas, todas patogênicas para o homem: *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipos D e AD), *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C) e mais recentemente, *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A), sendo estas variedades divididas com base em critérios fenotípicos, sorológicos, bioquímicos, epidemiológicos, manifestações clínicas e resposta a terapias antifúngicas (KELER et al., 2003; DIAZ; FELL, 2005; NIELSEN et al., 2007; QUEIROZ et al., 2008; SILVA et al., 2008).

Os representantes relativos aos sorotipos A e D, ambos de distribuição mundial, geralmente encontram-se em solos e fezes de aves domésticas, principalmente pombos (*Columbia livea*), considerados a maior fonte ambiental destas variedades, sendo usualmente o agente causador da criptococose em pacientes imunocomprometidos (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003; LEVITZ; BOEKHOUT, 2006).

Cryptococcus neoformans variedade *gattii* é considerada restrita a regiões de clima tropical e subtropical, sendo, predominantemente associada a eucaliptos (*Eucalypitus spp*) e madeiras em decomposição, infectando pacientes

imunocompetentes (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003; SOARES et al., 2005; LEVITZ; BOEKHOUT, 2006).

Algumas características importantes na apresentação clínica da doença diferenciam as infecções causadas pelas diferentes variedades. A doença decorrente de infecção por *C. neoformans* variedade *gattii* é caracterizada por hidrocefalia e lesões cerebrais focais, apresentando uma alta incidência de criptococomas no pulmão e cérebro. Esta infecção apresenta uma alta morbidez neurológica e resposta retardada a terapia antifúngica, mais seqüelas neurológicas, além das intervenções neurocirúrgicas serem mais freqüentes (SORREL, 2001; HORTA et al., 2005; SILVA et al, 2008).

A criptococose causada por *C. neoformans* variedade *neoformans* também esta associada a lesões pulmonares e cerebrais. Tais achados se apresentam como infiltrados inflamatórios difusos, exibindo um maior índice de mortalidade e sensibilidade a terapia antifúngica em relação àquela causada por *C. neoformans* variedade *gattii* (SORREL, 2001; SILVA et al, 2008).

SILVA et al., (2008) analisando isolados de 35 pacientes com criptococose atendidos no Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (HE-UFTM), verificaram a prevalência de *C. neoformans* var. *neoformans* encontrada em 88,6% dos casos. Os autores afirmam que esta variedade vem ganhando destaque pelo aumento populacional, mas, sobretudo pelo crescente número de hospedeiros susceptíveis.

2.3 Resposta imune ao *Cryptococcus neoformans*

De modo geral, o primeiro aspecto importante para a patogenicidade de C. neoformans parece ser a aderência a superfície do hospedeiro, seguida pela colonização do tecido. Esta levedura é um patógeno intracelular facultativo, portanto, capaz de sobreviver em macrófagos e permanecer na vesícula fagossômica ácida, mantendo a capacidade de multiplicação (PERFECT, 2005).

Segundo SANTANGELO et al. (2004) essa permanência intracelular parece ser um elemento importante na persistência da infecção, disseminação por via linfo-hematogênica e localização no SNC. O mecanismo pelo qual C. neoformans evita a morte após a ingestão por fagócitos permanece pouco compreendido, mas há evidências de que a sobrevivência intracelular pode ser dada pela produção de pigmentos melanóides.

Além disso, de acordo com TUCKER; CASADEVALL (2002); HULL; HEITMAN (2002); SANTANGELO et al. (2004) a interação da levedura com amebas e nematódeos presentes no ambiente como competidores, contribuiu para o patógeno desenvolver estratégias para sobreviver ao sistema imune dos mamíferos.

As respostas do hospedeiro a *C. neoformans* são relativamente bem compreendidas, sendo essencial uma resposta imune celular eficiente, induzindo inflamação granulomatosa, para que a infecção seja eficientemente contida (PERFECT, 2005).

Esta inflamação específica é induzida por linfócitos Th-1 ativados, com a participação de citocinas, como fator de necrose tumoral (TNF), interferon gama e Interleucina 2 (IL-2) e algumas quimiocinas MCP-1 e M1P-1α envolvidas no recrutamento de células inflamatórias. As células efetoras contra *C. neoformans* são os linfócitos TCD4+ e TCD8+ e macrófagos ativados (HUFFNAGLE ET AL., 2000; PERFECT, 2005).

Segundo BIANC & HARRISON (2004) o risco de criptococose disseminada cresce abruptamente em pacientes infectados por HIV, que apresentam um estado de profunda imunossupressão apresentando contagem de TCD4+ inferior a 100 células/μL.

De acordo com KOMMERS et al, (2005) a formação da cápsula de polissacarídeo, a inibição da ação dos macrófagos alveolares e a produção de fenol oxidase possuem papel significativo na patogenicidade de *C. neoformans*.

Os polissacarídeos capsulares apresentam vários efeitos imunomodulatórios sobre a resposta do hospedeiro, como inibição da fagocitose, inativação de componentes do sistema complemento, supressão da imunidade mediada por células T e tolerância imunogênica. Um dos mecanismos que resultam em tolerância é a interferência desses polissacarídeos na migração de leucócitos, principalmente neutrófilos por quimiotaxia, devido à desensibilização de seus receptores, impedindo que os mesmos deixem a circulação sanguínea e migrem para o local da inflamação (KOMMERS et al., 2005; PERFECT, 2005; MONARI et al., 2006).

Além disso, os polissacarídeos prejudicam a adesão de leucócitos durante a migração pelo endotélio, sendo ainda responsáveis pelo aumento da produção de IL-10 (antiinflamatória) e indução da perda de receptores para o fator de necrose tumoral α na superfície dos neutrófilos (BOSE et al., 2003; ELLERBROEK et al., 2004).

Em estudos de infecção experimental em camundongos, a composição antigênica da cápsula *in vivo* é distinta em diferentes órgãos infectados, sugerindo uma evolução da estrutura capsular durante a infecção (CHARLIER et al., 2005).

Segundo PAL, 2005 a patogenicidade de *C. neoformans* varia entre os isolados não sendo por isso complemente explicada. No diagnóstico diferencial das infecções oportunistas nos indivíduos imunodeprimidos, a doença deve ser considerada, pois o diagnóstico precoce é fundamental para reduzir a morbidade e mortalidade.

2.4 Diagnóstico

Atualmente, o diagnóstico da criptococose requer avaliação clínica e laboratorial sendo esta última feita através de exame direto, isolamento do agente etiológico seguido de provas bioquímicas para identificação final, histopatologia, além de pesquisa de antígenos circulantes utilizando-se a reação de aglutinação em partículas de látex. Técnicas moleculares também podem ser utilizadas, porém ainda apresentam aplicação restrita no diagnóstico clínico (QUEIROZ et al., 2008).

Segundo LARSSON et al. (2003); NAMIQ et al. (2005) vários espécimes como líquor, escarro, lavado brônquico, aspirados de lesões cutaneomucosas, urina, macerados de tecidos obtidos de biópsia, secreção prostática e sangue periférico podem ser utilizados para a pesquisa direta e cultura da levedura. De acordo com CORREIA et al. (2002), o líquido céfalo-raquidiano (LCR) representa a amostra de escolha, uma vez que o agente etiológico apresenta tropismo pelo sistema nervoso central.

A observação microscópica de células de leveduras capsuladas através da tinta da China fornece um diagnóstico diferencial, rápido e barato, sendo especialmente importante na clínica sugestiva de meningite criptococócica. A base para a visualização das leveduras por este método consiste no afastamento das partículas da tinta pela cápsula, formando um halo claro em torno da célula, tornando o diagnóstico mais difícil quando se trata de linhagens acapsuladas (KOMMERS ET AL., 2005).

Para o cultivo desta levedura são citados vários meios, entretanto os mais utilizados são ágar Sabouraud-dextrose, ágar semente de Níger (alpiste) ou semente de girassol, ágar dopamina, ágar batata cenoura e extrato de malte. Os autores que indicam a utilização desses meios descrevem os aspectos das colônias de coloração branca a creme, escurecendo com o tempo e textura mucóide. Isolados com cápsula pequena ou

acapsular produzindo colônias secas ou glabras (BARNETT et al., 2000; HOOG et al., 2000).

Outro método utilizado para o diagnóstico da criptococose é a análise histológica utilizando colorações de rotina ou alternativas em biópsias, como HE (hematoxilina-eosina), PAS (Ácido Periódico de Schiffer), Azul de Alciano, Metenamina argêntica, Masson-Fontana e pelo eletivo Mucicarmin de Mayer o qual cora a cápsula fúngica em vermelho (LACAZ et al., 2002; MENEZES et al., 2002; NAMIQ et al., 2005).

Os cortes histológicos corados pelo HE mostram células de C. neoformans esféricas, ovais ou elípticas; com parede fina rósea ou azul pálido com 5 a 15μm de diâmetro. As cápsulas não se coram devido a sua natureza mucopolissacarídica, permanecendo um halo claro (LACAZ et al., 2002; BIVANCO et al., 2006). Através da histopatologia vizualiza-se uma reação inflamatória crônica com linfócitos, histiócitos, macrófagos e células gigantes, o granuloma pode ser observado em alguns casos, sendo a necrose variável, de mínima e abundante, assim como o número de leveduras (BIVANCO et al., 2006).

De acordo com Moreira et al., (2006) para o diagnóstico laboratorial da criptococose a pesquisa direta demonstrou a presença do microrganismo em 98,3% das amostras de LCR, sendo obtida cultura em 100% dos casos.

Contudo, MITCHELL; PERFECT (1995) verificaram falha na detecção do fungo no sangue periférico o que é explicado pelo fato de tal amostra conter menos que 10 UFC/mL, sendo possível que o frequente insucesso no cultivo, se deva as concentrações inferiores a 10^3 a 10^7 UFC/Ml de líquor.

No entanto, a cultura é tradicionalmente o padrão ouro dos métodos de diagnóstico laboratorial para *C. neoformans*, embora apresente como limitações o tempo necessário para o desenvolvimento e identificação do agente etiológico (LACAZ et al., 2002; QUEIROZ et al., 2008). Por outro lado segundo CASADEVAL; PERFECT (1998) na meningite criptocócica crônica o líquor pode resultar em cultura não obtida devido à pequena concentração de leveduras viáveis no nível lombar. Esta baixa concentração é devida ao tratamento prévio e torna-se um problema no monitoramento dos pacientes crônicos. As preparações com tinta da China, porém, permanecem positivas por meses após o tratamento e recuperação de pacientes crônicos, sendo o método indicado nessa condição.

2.5 Criptococose experimental

Os modelos de infecção experimental são importantes para o estudo da patogênese e para o acompanhamento do tratamento. Estes ocupam posição essencial no estudo de doenças infecciosas, como resultado de problemas éticos da exposição de seres humanos a agentes potencialmente letais (WILES et al., 2006).

A indução de infecções em modelos animais bem definidos fornece informações acerca do processo da doença, aproximando-se do contexto natural, apesar das diferenças existentes entre estas infecções e as induzidas. O modelo é somente uma representação do processo natural da doença, e deverá ser apropriado para o processo que se deseja estudar, envolvendo vários fatores, como, por exemplo, a integração do conhecimento com os múltiplos ambientes em que a doença se estabelece (WILES et al., 2006).

No estudo da criptococose, os modelos mais utilizados são ratos, coelhos e camundongos, para avaliar, principalmente, a patogenicidade, os fatores de virulência do microrganismo, e a imunidade do hospedeiro. A escolha da espécie animal e via de inoculação do microrganismo depende do objetivo e do grau de reprodutibilidade desejado (SEGAL; BAUM, 1994; PERFECT, 2005). A via intraperitoneal talvez seja a mais conveniente pela facilidade, a intracracerebral permite o estudo da proliferação das leveduras no sistema nervoso central, que é o sítio clínico mais importante desta infecção. A intravenosa é uma técnica quantitativa e padronizada, e fornece respostas a respeito da disseminação do microrganismo para os diferentes órgãos, as vias intranasal e intratraqueal permitem a avaliação da capacidade do microrganismo se disseminar a partir dos pulmões, e podem melhor simular a infecção natural, porém apresenta considerável variabilidade (CASADEVALL; PERFECT, 1998).

Os camundongos, das diversas linhagens, são animais susceptíveis à infecção por *Cryptococcus* e são os modelos mais utilizados, pelo baixo custo, pela facilidade no manuseio, e devido à disponibilidade de diversas linhagens geneticamente conhecidas (WICKES; KWON-CHUNG, 2002; PERFECT, 2005). As infecções nestes animais podem ser subclínicas ou letais, na dependência do tamanho do inóculo, da via de inoculação, do isolado considerado e, quanto aos animais, da linhagem e do estado imunológico. Nestas condições é possível estudar os fatores envolvidos na virulência, as diferentes linhagens de microrganismos, o tropismo para os diferentes órgãos, o comportamento de diferentes linhagens de camundongos frente a um isolado em

particular, o comportamento do sistema imunológico e a relação com a doença, e ainda, a eficácia de drogas antifúngicas (CASADEVALL; PERFECT, 1998; PERFECT, 2005).

Conforme SEGAL; BAUM, (1994) quando se trata de infecção experimental, alguns estudos podem ser conduzidos avaliando a disseminação e o tropismo do microrganismo para diferentes tecidos, assim como a sobrevida do hospedeiro e a resposta terapêutica.

A quantificação da carga fúngica em diferentes órgãos permite avaliar a disseminação do microrganismo e sua depuração pelo hospedeiro. Possibilita, ainda, analisar a eficiência do sistema imunológico do animal, a virulência do microrganismo, a eficácia do tratamento com drogas antifúngicas, e comparar a resposta do hospedeiro as diferentes linhagens de microrganismos (CHRETIEN et al., 2002; WICKES; KWON- CHUNG, 2002). A avaliação da sobrevivência do hospedeiro é feita determinando-se a taxa de sobrevivência ou de morte de animais, de acordo com o período de tempo após a infecção experimental. Permite comparar o grau de virulência dos diferentes isolados dos microrganismos, desde que se utilizem animais previamente padronizados, por exemplo, que apresentem peso, idade e padrão de resposta imunológica semelhantes, comparando-se os tempos de evolução da infecção até a morte do animal (WICKES; KWONG-CHUNG, 2002).

A utilização de um modelo animal para propor novas alternativas terapêuticas é crucial, sendo esse um caminho essencial no trajeto de estudos *in vitro* até seu uso em pacientes (GRAYBILL, 2000).

2.6 Drogas Antifúngicas

O tratamento de enfermidades causadas por fungos é um desafio, uma vez que existem muitas similaridades entre a maquinaria celular de fungos e a humana, diminuindo-se, desta forma, a disponibilidade de drogas para o tratamento destas doenças, quando comparadas a doenças causadas por bactérias ou vírus (IDNURM et al., 2005).

Atualmente a droga de escolha utilizada para o tratamento da criptococose continua sendo a Anfotericina B, droga esta que mudou o perfil da criptococose de infecção fatal para curável. Devido à toxicidade, principalmente para os rins, a terapia tem sido combinada com fluorocitosina, para reduzir sua dose e duração de tratamento,

enquanto que, para tratamentos mais longos esta é associada ao fluconazol (BIANC; HARRISON, 2004)

A combinação de fluorocitosina com anfotericina B apresenta vantagens pelas diferenças farmacocinéticas e mecanismos de ação das drogas, que resultam em sinergismo. Contudo, principalmente em pacientes com AIDS, fluorocitosina pode causar efeitos adversos intoleráveis como leucopenia e distúrbios gastrointestinais (MITCHELL; PERFECT 1995).

O fluconazol, apesar de fungistático, apresenta excelente perfil de segurança, farmacocinética e resposta clínica. Porém o uso indiscriminado deste fármaco em pacientes com AIDS, a longo prazo, pode resultar em resistência (BRANDT et al., 2001; ROGERS, 2006; SANAT et al., 2006).

Estudo com cepas clínicas de *C. neoformans* demonstrou a ocorrência de heteroresistência ao fluconazol devido a seleção de clones resistentes induzida pela longa exposição ao fluconazol (YAMAZUMI et al., 2003).

Em pacientes com AIDS e com meningite criptocócica o tratamento é realizado em duas fases: na fase de indução o paciente recebe anfotericina B na dosagem de 0,7 a 1,0 mg/kg/dia, até a obtenção de três culturas de líquor negativas com intervalo maior de um mês; na fase de manutenção o paciente é tratado com fluconazol na dosagem de 400mg/dia por 8 semanas e após este período o paciente recebe 200mg/dia até pelo menos 6 meses de reconstrução imunológica (níveis de linfócitos TCD4+ acima de 200cel/mm^3) (BRANDT et al., 2001; PAPPALARDO; MELHEM 2003; BICANIC; HARRISON, 2004).

Devido à grande incidência de criptococose decorrente do aumento crescente de indivíduos imunodeprimidos aliada aos efeitos colaterais causados pelos fármacos utilizados no tratamento desta infecção, além do aumento do número de isolados de *C. neoformans* resistentes, torna-se necessária a descoberta de novas drogas para intervenção terapêutica da doença (ODOM et al.,1997; SANGUINETTI et al., 2006). Por este motivo, as pesquisas que buscam desenvolver novos agentes antifúngicos são cada vez mais numerosas (YAMAZUMI et al., 2003).

Enquanto que fatores clínicos podem contribuir para o insucesso no tratamento desta doença, a exposição do *Cryptococcus* aos agentes antifúngicos pode limitar a ação dos mesmos por serem intrinsicamente resistentes ou por adquirirem resistência específica (SANGLARD, 2002).

O tratamento da maioria das infecções está embasado nos resultados da sensibilidade *in vitro*, esses resultados podem predizer a resposta clínica, porém, esta resposta depende de vários outros fatores intrínsecos ao antifúngico bem como a interação patógeno versus hospedeiro. Devido a essa multiplicidade de fatores é evidente que existam discrepâncias entre os resultados de sensibilidade *in vitro* e *in vivo* (RIVAS; SERRANO, 2003).

2.6.1 Anfotericina B

A anfotericina B é um antibiótico poliênico macrocíclico produzido pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus*, foi inicialmente isolada em meados de 1955 (GOLD et al., 1956; VANDEPUTTE et al., 1956; FILIPPIN; SOUZA, 2006). Apresenta atividade fungicida contra inúmeros fungos, sendo comumente usada no tratamento de infecções sistêmicas causadas por leveduras em pacientes imunocomprometidos (DISMUKES, 2000).

O efeito fungicida da droga contra *C. neoformans* depende da concentração administrada (KLEPSER et al., 1998). A ação da anfotericina B depende da concentração usada, do tipo de fungo e de um bom veículo para a droga (ARAÚJO et al., 2005).

Este fármaco age principalmente, ligando-se ao esterol da membrana da levedura, diretamente no ergosterol, desestabilizando esta estrutura, produzindo poros. Esta ligação não interfere na síntese, porém altera a permeabilidade da membrana, causando extravasamento de íons conduzindo, eventualmente, a morte celular (THIPINE et al., 1999; HUANG et al., 2002). O ergosterol é necessário na manutenção da permeabilidade e fluidez da membrana, garantindo a modulação de enzimas ligadas à membrana plasmática. A ausência do ergosterol e o acúmulo de seus precursores afetam a estrutura da membrana plasmática e a absorção de vários nutrientes, tornando os fungos vulneráveis a danos (DERAY, 2002; HUANG et al., 2002).

Segundo ZARAGOZA et al. (2005) a Anfotericina B pode ainda afetar a morfologia da cápsula polissacarídica de *C. neoformans* sugerindo um mecanismo de ação adicional na eficácia contra a criptococose.

Por mais de 30 anos a Anfotericina B tem sido uma das mais importantes drogas usadas em infecções fúngicas severas. Porém, seu uso tem sido limitado devido aos

vários efeitos adversos destacando-se a nefrotoxicidade (DERAY, 2002; FILIPPIN; SOUZA, 2006).

Por ter pouca absorção no trato gastrointestinal, em infecções sistêmicas a droga deve ser administrada por via intravenosa. Em altas concentrações alcançam o fígado, baço, pulmão e rins. A penetração no LCR é muito baixa (2 a 4%), em alguns tecidos como o fígado, a anfotericina B pode ser detectada até 12 meses após a administração (MORA-DUARTE et al., 2002; GERBAUD et al., 2003).

Na urina e no soro a droga pode ser detectada até sete semanas após terapia. A droga penetra no líquido pleural, peritoneal e sinovial atingindo cerca de 50% das concentrações séricas. O líquor apresenta concentrações de um terço à metade das encontradas no soro. No corpo humano, a maior parte da anfotericina B provavelmente está ligada à membrana das células teciduais que contém colesterol. A principal via para a eliminação da droga não é conhecida, parte é excretada pelas vias biliares e apenas 3% é eliminada na urina com concentrações equivalentes ás do plasma (FILIPPIN; SOUZA, 2006).

O tratamento com Anfotericina B quase sempre resulta em algum grau de disfunção renal, que varia em gravidade de um paciente para outro, sendo claramente uma função da dose total. Em um estudo utilizando Anfotericina B, 24,8% dos pacientes tratados com 0,6 - 1,0 mg/Kg/dia apresentaram nefrotoxicidade comprovada através de achados laboratoriais (MORA-DUARTE et al., 2002).

Um estudo com células renais de ratos conduzido por VARLAM et al. (2001) sugeriu que a Anfotericina B induzia apoptose das células tubulares renais e células intersticiais em uma taxa diretamente proporcional a sua concentração. Observou-se 90% de apoptose e necrose com a concentração máxima utilizada de 5,0 mg/mL, reduzindo-se as lesões a medida que esta era proporcionalmente diminuída. Estudos posteriores demonstraram que, o efeito tóxico foi máximo nos túbulos com hipocalemia, hipostenúria, diminuição da capacidade de excretar ácidos, como também envolveu os glomérulos com diminuição da depuração de creatinina, com ou sem azotemia (MORA–DUARTE et al., 2002; FILIPPIN; SOUZA, 2006).

Durante o curso do tratamento com Anfotericina B, a nefrotoxicidade foi constadada através de concentrações séricas elevadas de creatinina (WALSH et al., 1999; MORA- DUARTE et al., 2002), muitas vezes até três vezes o limite superior da normalidade (WALSH et al., 1999).

BARCHIESI et al. (2004) ao analisar a eficácia terapêutica da anfotericina B durante criptococose experimental, verificou que camundongos CD1 machos infectados com 2,5x 10^3 UFC via endovenosa apresentaram redução das contagens fúngicas em todos os órgãos analisados a exceção do cérebro. Os animais foram tratados com 0,3 mg/Kg/dia de anfotericina B intraperitonealmente durante 10 dias consecutivos. No cérebro decorrido 21 dias após o fim da terapia não foi verificado nenhuma diferença nas contagens fúngicas entre o grupo tratado e o controle.

Por outro lado LARSEN et al. (2004) realizaram estudo com o intuito de delinear a dose de anfotericina B na qual se obtinha melhor resultado aliado a menor toxicidade durante infecção em camundongos Balb/c machos infectados com 700 UFC de *C. neoformans* intracerebralmente. As doses utilizadas de anfotericina B variaram de 0,3 a 1,3 mg/kg/dia administradas via endovenosa. Foi observado que 95% dos animais tratados com 0,5 mg/Kg/dia de anfotericina B sobreviveram até o final do experimento (16 dias). É importante observar que com doses iguais ou superiores a 0,7 mg/Kg/dia foi verificado número inaceitável de morte nas primeiras 24 horas (cerca de 40%) sendo o percentual de mortes diretamente proporcional ao aumento da dose.

2.7 Susceptibilidade aos antifúngicos

Segundo BARCHIESI et al. (2000) a avaliação da susceptibilidade de *C. neoformans* aos antifúngicos é de grande interesse considerando a alta frequência e as severas manifestações clínicas da infecção por esta levedura.

Os testes de susceptibilidade antifúngica para leveduras ainda requerem mais estudos, devido às divergências quanto ao uso de drogas, a diversidade dos organismos e as metodologias específicas (RODRIGUES-TUDELA et al., 2000).

Desde os anos 80, grupos norte-americanos e europeus estão envolvidos em desenvolver um método de referência para testar susceptibilidade antifúngica, sendo o principal, o proposto pelo National Commitee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)- atualmente denominado Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (PAPPALARDO; MELHEM, 2003).

Em 1997, o NCCLS apresentou a padronização do método de microdiluição em caldo. O teste realizado em placa de microtitulação apresentava a vantagem da redução no consumo dos reagentes e a possibilidade de se testar vários isolados ao mesmo tempo. Em 2002, foi proposto o Manual M27A-2 do NCCLS que padronizou os testes

por macro e microdiluição (COLOMBO; ALVES, 2004) sendo estes atualmente aceitos para testar a susceptibilidade antifúngica *in vitro*. Estes testes diminuíram as variações de CMIs entre os laboratórios, e a melhora na reprodutibilidade permitiu uma comparação dos níveis de resistência entre regiões, além do monitoramento da emergência de isolados resistentes (PERFECT; COX, 1999; NCCLS 2002; PAPPALARDO; MELHERM, 2003).

2.8 Resistência em *Cryptococcus neoformans*

Apesar do tratamento combinado anfotericina B, fluocitosina e anfotericina B, fluconazol ser geralmente bem sucedido na criptococose, falhas na terapia ocorrem por uma variedade de razões, incluindo resistência direta às drogas antifúngicas (PEREA; PATTERSON, 2002).

Vários estudos utilizando a metodologia do CLSI foram realizados para avaliar a situação da resistência a *C. neoformans.* Num estudo realizado nos Estados Unidos com 732 isolados clínicos, obtidos nos períodos de 1992 a 1994 e 1996 a 1998, um pequeno número de isolados mostrou CIMs elevadas. Estas estavam aumentadas em dois isolados testados para anfotericina B (≥2μg/mL), 14 isolados a fluocitosina (≥32μg/mL), 8 isolados a fluconazol (≥64μg/mL) e 45 isolados a itraconazol (≥1μg/mL) (BRANDT et al., 2001).

Outro estudo mostrando a ação da anfotericina B sobre isolados mutantes propôs que a resistência ocorria por mudanças tanto qualitativas quanto quantitativas dos esteróis. Podendo ocorrer uma diminuição do conteúdo de ergosterol celular, ou substituição de alguns ou de todos por outros com afinidade diminuída a anfotericina. Por exemplo, substituição do ergosterol, colesterol e estigmasterol, por um esterol 3-hidroxi ou 3-oxi ou também, reorientação ou mascaramento do ergosterol existente, tornando a ligação da anfotericina estericamente ou termodinamicamente menos favorecida (PEREA; PATTERSON, 2002).

Em um estudo realizado por FILIPPIN, (2006) com dois isolados de *C. neoformans* (pré e pós-tratamentos) em que houve falha do tratamento, foi observada uma correlação entre resistência à anfotericina B e padrão de esteróis. O isolado pós-tratamento resistente possuía um defeito na esterol isomerase, levando ao acúmulo de outros esteróis e diminuição no conteúdo de ergosterol.

Em vista da resistência verificada por alguns isolados de *C. neoformans* a anfotericina B e a outros antifúngicos, torna-se indispensável a descoberta de novas alternativas terapêuticas mais eficientes e menos tóxicas para o tratamento da criptococose.

2.9 Beta- lapachona como fitoterápico

Segundo BONTEMPO (1992), a fitoterapia consiste no conjunto de técnicas de utilização de vegetais no tratamento de doenças e na recuperação da saúde. Comporta numerosos grupos de pesquisadores que estudam e empregam as plantas medicinais, desde as mais simples e empíricas até as científicas e experimentais.

As plantas podem representar uma base de novas moléculas biologicamente ativas, quando exploradas dentro de um programa voltado para a pesquisa, desenvolvimento e produção de novos fármacos (FERREIRA., 1998).

As pesquisas utilizando produtos naturais visam obter novos princípios ativos que possam se tornar novos fármacos ou modelos para síntese de novas drogas além de possibilitar a avaliação não só dos efeitos farmacológicos e toxidade potencial como também analisar a relação entre os efeitos metabólicos, imunes e hormonais (BENDAZOLLI, 2000; COVINGTON, 2001; DE MOURA et al., 2001).

Os fitomedicamentos ou fitoterápicos são medicamentos produzidos a partir de moléculas biologicamente ativas em sua forma natural. Apesar do avanço da tecnologia, que diariamente cria novos compostos e substâncias sintéticas com ações medicinais, mais de 40% de toda matéria-prima dos medicamentos encontrados continuam sendo de origem vegetal (COVINGTON, 2001).

ANTUNES et al. (2006) reforçando a importância da utilização de produtos naturais, realizaram uma investigação antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória de fitoconstituintes, observando excelente ação frente a microrganismos patogênicos.

No contexto de busca por alternativas terapêuticas às atuais drogas antifúngicas, sabidamente tóxicas, está inserida a *Tabebuia avellanedae*, uma espécie vegetal pertencente a família Bignoniaceae do gênero *Tabebuia* (FONSECA et al., 2004) que é popularmente conhecida no Brasil como "ipê roxo". É nativa da América, ocorrendo em todo Brasil desde o Amazonas até o Rio Grande do Sul sendo utilizada inclusive na ornamentação de ruas e praças (DAVANSO et al., 2002).

Segundo a literatura etnobotânica a casca é utilizada na medicina popular sob forma de chá, como antiinfeccioso, antifúngico, diurético, adstringente e no tratamento caseiro de impetigo, contra alguns tipos de câncer, lúpus, doença de Parkinson, psoríase e alergias (KOYAMA et al., 2000; WARASHINA et al., 2004). Análises fitoquímicas registraram como componentes da madeira as naftoquinonas, principalmente o lapachol, α-lapachona e β- lapachona, quercitina e ácido hidroxibenzóico (MIRANDA et al., 2001; SILVA et al., 2002).

Silva et al. (2003) afirmam que um dos principais constituintes do ipê-roxo são as naftoquinonas, representadas pela β-lapachona, as quais constituem uma ampla e variada família de metabólitos de distribuição natural. Nos últimos anos intensificou-se o interesse por estas substâncias, não só devido a sua importância nos processos bioquímicos vitais, mas também, o destaque cada vez maior que apresentam nos estudos farmacológicos.

A β-lapachona, conhecida quimicamente por 3,4-diidro-2,2-dimetil-2H-naftol [1,2-b] pirano-5,6-diona, é uma ortonaftoquinina sintetizada a partir do lapachol. É um produto natural que apresenta forma cristalina laranja-avermelhada com ponto de fusão característico entre 154,5 e 155,5°C e é estruturalmente estável em pH de 3 a 9. Tem sido, desde o início da década de 90, alvo de estudos no mundo todo devido ao excelente potencial farmacológico *in vitro* e *in vivo* (FONSECA et al., 2004; CUNHA-FILHO et al., 2005).

Segundo MIRANDA et al. (2001); SILVA et al. (2002); SPERANDEO (2004); ANTUNES et al. (2006) e CUNHA-FILHO et al. (2007), nos últimos anos tem sido atribuídas várias atividades farmacológicas a β-lapachona, tais como atividade antiviral, anti-inflamatória, anti-psoriática, anti-parasitária, antitumoral e antifúngica. No entanto, a maioria dos estudos atuais envolvendo a β-lapachona enfoca a sua ação sobre o agente da doença de Chagas, *Trypanossoma cruzi*, e sua eficácia no tratamento de neoplasias (LI et al., 2000; PARK et al., 2005; CHOI et al., 2007; CUNHA-FILHO et al., 2007; CUNHA-FILHO et al., 2008; QUEIROZ et al., 2008; SALAS et al., 2008; SONG et al., 2008).

Os mecanismos de ação apresentados pela β-lapachona são bastante amplos destacando-se o estresse oxidativo que provoca ao induzir a formação deletéria endógena de espécies bioativas derivadas do oxigênio (O_2, OH, H_2O_2) e inibição do transporte de elétrons na célula como ocorre com o *T. cruzi*. Outra atividade marcante destas substâncias, descoberta recentemente, é a inibição do complexo das

topoisomerases, ação que provoca o desencadeamento da apoptose celular (MIRANDA et al., 2001; SILVA et al., 2002; SPERANDEO, 2004).

CASTRO et al. (1994) ao estudar a atividade de derivados do lapachol e análogos da beta-lapachona frente *Mycobacterium tuberculosis* analisaram que a substância mais ativa foi a beta-lapachona apresentando CIM de 6,25mg/mL, sendo a menos ativa o lapachol apresentando CIM de 50mg/mL . Os autores observaram uma nítida correlação entre lipossolubilidade e atividade antimicrobiana visto que os derivados mais polares entre eles o lapachol foram bem menos ativos, sugerindo que a atividade destas quinonas pode ter relação com suas lipossolubilidades, o que interfere em sua capacidade de transpor a membrana celular.

Com relação a sua atividade antifúngica, GUIRAUND et al. (1994) compararam as atividades antibacteriana e antifúngica do lapachol e β-lapachona. Os autores constataram que os fungos avaliados foram mais sensíveis que as bactérias, particularmente a β- lapachona. Dentre os isolados fúngicos testados, destacou-se *Cryptococcus neoformans*, o qual foi inibido frente à β-lapachona, o que não ocorreu com o lapachol. A concentração inibitória mínima foi de 0,02µg/mL e a fungicida foi de 1µg/mL.

TANDON et al. (2004) sintetizaram 10 compostos derivados de naftoquinonas e testaram suas atividades antiviral, antitumoral e antifúngicas. Os autores analisaram tanto fungos filamentosos quanto leveduras, as quais se destacam *C. neoformans* e *Candida albicans*. Os compostos que apresentaram um CIM $\leq$ 50µg/mL foram considerados ativos pelos pesquisadores. A atividade dos compostos foi comparada com drogas de referência como Anfotericina B, miconazol e nistatina.

Em outro estudo, utilizando para a determinação do CIM as normas do CLSI (2002), a β-lapachona apresentou CIM de 100µg/mL para a única amostra de fungo testada, representada por *C. albicans* (ANTUNES et al., 2006).

Estudos recentes mostram que a citotoxicidade da β- lapachona ainda não foi completamente comprovada (SILVA et al., 2002; MENACHO-MARQUÉS; MURGUIA, 2006).

Apesar de amplo espectro de bioatividade, os mecanismos de atuação da β-lapachona em modelos experimentais ainda não estão bem delineados. Atualmente, há um grande interesse pela farmacologia e mecanismo de ação da β-lapachona. Os testes *in vitro* e *in vivo* muito podem contribuir para o esclarecimento dos mecanismos de

atividade dos fitofármacos e, em conseqüência, para o planejamento de novos medicamentos comerciais (QUEIROZ et al., 2008).

3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA NAFTOQUINONA BETA-LAPACHONA CONTRA INFECÇÃO DISSEMINADA POR *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* VAR. *NEOFORMANS* EM CAMUNDONGOS SUIÇOS IMUNOSSUPRIMIDOS POR DEXAMETAXONA

3 Trabalho publicado na *Revista da Brazilian Journal of Medical and Biological Research* como C.S. Medeiros, N.T. Pontes-Filho , C.A. Camara , J.V. Lima-Filho, P.C. Oliveira, S.A. Lemos, A.F.G. Leal, J.O.C. Brandão, R.P. Neves . Antifungal activity of the naphthoquinone beta-lapachone against disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in dexamethasone-immunosupressed swiss mice.

RESUMO

A atividade antifúngica in vivo da naftoquinona beta-lapachona contra infecção disseminada por *Cryptococcus neoformans* foi investigada. Camundongos foram imunossuprimidos diariamente com dexametasona (0.5 mg / camundongo) por via intraperitoneal por 3 dias, o procedimento foi repetido quatro dias depois, e os animais foram infectados por via intravenosa com *Cryptococcus neoformans* (10^6 UFC / mL) uma semana depois. Sete dias após a infecção os camundongos foram divididos em grupos e tratados diariamente com beta-lapachona (10 mg / kg, iv) por 7 (N = 6) e 14 dias (N = 10). Anfotericina B (0,5 mg / kg) foi utilizado como droga de comparação e um grupo adicional recebida PBS. O tratamento com beta-lapachona eliminou a levedura do baço e do fígado, e a carga fúngica diminuiu aproximadamente 10^4 vezes nos pulmões e no cérebro 14 dias após a infecção, quando comparado ao grupo PBS ($P < 0,05$). Este resultado foi semelhante ao do grupo tratado com anfotericina B. A proteção foi sugestivamente devido à atividade antifúngica in vivo desta droga e, aparentemente, não influenciada pela ativação da resposta imune, devido a contagens de células leucocitárias serem semelhantes entre os grupos. Este estudo destaca a perspectiva da utilização da beta-lapachona para o tratamento da criptococose disseminada.

Palavras-chaves: Beta-lapachona; *Cryptococcus neoformans*; Criptococose; imunossupressão; infecção experimental; Anfotericina B

Introdução

Criptococose é uma micose sistêmica oportunista que acomete especialmente pacientes imunocomprometidos (Perfect; Casadeval et al., 2002). Pacientes infectados por HIV, pacientes com câncer, diabéticos, submetidos a transplante ou procedimentos invasivos pessoas recebendo corticosteróides são especialmente susceptíveis a esta doença. A primo-infecção por *Cryptococcus* começa nos pulmões e comumente se dissemina para outros órgãos (Barbosa et al., 2006). Contudo, a levedura apresenta tropismo pelo sistema nervoso central, sítio no qual sobrevive e prolifera causando meningite e meningoencefalite, que podem ser fatais se não tratadas adequadamente (Chen et al., 2003). Duas variedades de *C. neoformans* têm sido descritas: *C. neoformanas* var. *neoformans* que apresenta maior incidência em pacientes imunodeprimidos e *C. neoformans* var. *gatti,* mais freqüentemente isolado de hospedeiros imunocompetentes (Chakrabarti 2007). A criptococose é tratada com anfotericina B/azóis como a principal escolha terapêutica. No entanto, a alta taxa de letalidade entre pacientes imunocom prometidos indica a necessidade de novas opções terapêutica (VanderHost et al., 1997).

Produtos naturais ou substâncias derivadas com propriedades antifúngicas têm sido usadas no tratamento da criptococose. Alguns exemplos são os óleos essenciais de plantas que têm sido amplamente divulgados, devido ás suas propriedades antimicrobianas (Mondello et al., 2003). A beta-lapachona é sintetizada do lapachol, derivado da *Tabebuia avellanedae*, conhecida popularmente como ipê-roxo, uma planta pertencente à família Bignoneaceae, comumente encontrada em muitas regiões do Brasil. Esta naftoquinona foi previamente descrita pela sua atividade antitumoral, anti-tripanossomica e antibacteriana (Salas et al., 2008; Pereira et al., 2006; Blanco et al., 2007). Estudos anteriores da atividade antifúngica do lapachol e da beta-lapachona

contra *C. neoformans* são, até certo ponto, contraditórios devido a protocolos experimentais distintos (Guiraud et al., 1994). No entanto, esses dados reforçam que novos estudos são necessários antes de propor de ensaios antifúngicos com humanos.

Neste trabalho foi avaliado o papel da naftoquinona beta-lapachona no controle de criptococose disseminada em modelo murino de camundongos Suíços imunossuprimidos com dexametasona.

Material e Métodos

Síntese da Beta-lapachona

A Beta-lapachona foi sintetizada a partir do produto natural lapachol derivado da *T. avellanedae* (Bignoneaceae) usando ácido sulfúrico de acordo com a metodologia adaptada de Cavalcante et al 2008.

C. neoformans URM5811

Foram testadas 16 isolados de C. neoformans estocados na Coleção de Culturas-Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco para sensibilidade *in vitro* a beta-lapachona de acordo com o método do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI) Manual M27-A3, (NCCLS, 2002). (dados não apresentados). A concentração inibitória mínima e a concentração fungicida mínima para beta-lapachona foram 4 e 64mg/mL respectivamente. *C. neoformans* var *neoformans* URM5811 foi obtida de um paciente com AIDS e usado devido a sua alta virulência e sensibilidade *in vitro* a beta-lapachona.

Protocolo de imunossupressão dos animais

Machos adultos de camundongos Suíços pesando aproximadamente 30g foram obtidos do biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE). Os animais

foram manuseados de acordo com procedimentos experimentais aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (protocolo #013968/2007-1). O protocolo de imunossupressão foi adaptado de Capilla et al. (2006). Foi administrado 0,5 mg/camundongo de dexametasona (Teuto® Brasil) intraperitonealmente durante três dias consecutivos e, em seguida, a cada intervalo de quatro dias até o final de cada experimento. A contagem total de leucócitos no sangue dos camundongos imunossuprimidos (IS) em comparação com animais imunocompetentes (IC) foi usado para confirmar a imunossupressão.

Modelo de infecção por *C. neoformans*

Sete dias após o início da imunossupressão, os animais (N=6) foram inoculados com 0,2 mL de C. neoformans URM5811 (106células/Ml) pela veia caudal. Camundongos IC (N=6) foram usados como controle e inoculados sob as mesmas condições experimentais. Os animais foram observados diariamente quanto a sinais clínicos e quanto à mortalidade durante 14 dias.

Ensaio de citotoxicidade em camundongos imunossuprimidos por dexametasona

As doses de beta-lapachona foram selecionadas baseando-se em 12,25% e 25% da dose letal de 80mg/Kg determinado para ratos IC (Santana et al., 1968). A droga foi dissolvida em DMSO 10% e diluída em Tween 80 3% (v/v em PBS) para obter soluções estoque na concentração de 100g/L. Então, 0,2mL de suspensão contendo 10 ou 20 mg/Kg foi administrada diariamente pela veia caudal dos camundongos suíços IS (N=6) por uma semana. Os animais controle (n=6) receberam apenas o solvente (DMSO 10% adicionado de Tween 80 3%; v/v em PBS) sem a beta-lapachona. Os animais foram observados diariamente sendo fígado e rins submetidos a análises histológicas ao final dos experimentos.

Tratamento da criptococose disseminada com beta-lapachona

Após sete dias da infecção, 0,2 mL de beta- lapachona (10 mg/Kg) foram administrados diariamente pela veia caudal em camundongos IS por meio de dois cronogramas independentes: 1) 7 dias de tratamento (N=6), ou 2) 14 dias de tratamento (N=10). Anfotericina B (0,5 mg/Kg) foi usada para comparação e os animais não tratados receberam apenas PBS. Os animais foram observados quanto a sinais clínicos e mortalidade diariamente até o fim dos experimentos.

Contagem de *C. neoformans* e análise histológica

Uma alíquota de sangue foi coletada por punção cardíaca após anestesia com halotano. Baço, fígado, pulmões e cérebro foram pesados e macerados em PBS (1:10 ou 1:100 p/v). Todas as amostras foram submetidas a diluições seriadas e 0,1 mL foram plaqueados na superfície do meio SDA acrescido de cloranfenicol (50mg/ml) e incubados a 37°C por 24-72 h. Os resultados das colônias foram expressos como UFC/g de órgãos ou mL de sangue. Os tecidos foram fixados em formaldeído 10% e processados por embebição em parafina. Secções de 5µm foram coradas com hemtoxilina-eosina (HE) e as laminas foram codificadas e examinadas por um único patologista, não informado sobre as condições experimentais de cada grupo.

Análise estatística

A significância estatística das contagens de células brancas e UFC foram analisadas estatisticamente por meio do teste t Student ou ANOVA, com nível de significância determinado como $P< 0,05$.

Resultados

Protocolo de imunossupressão e modelo de infecção por C. neoformans

O protocolo de imunossupressão aplicado em camundongos suíços (grupo IS) resultou em contagens de células leucocitárias aproximadamente de 45% e 61% inferiores que as contagens em camundongos IC, após sete e 14 dias de infecção respectivamente ($P< 0,05$). Ainda *C. neoformans* URM5811 produziu infecção disseminada em camundongos IS que vaiou de 10^4 a 10^6 UFC/g de baço, fígado, pulmão e cérebro 14 dias após infecção, em quanto que camundongos IC foram resistentes a criptococose ($P< 0,05$).

Citotoxicidade da beta-lapachona in vivo

A beta-lapachona a 10 mg/kg não foi notavelmente tóxica para camundongos IS após inóculo diário por uma semana uma vez que todos os animais estavam saudáveis e sobreviveram durante os experimentos. De maneira controversa a dose de 20 mg/Kg provocou alterações motoras e contrações abdominais após inoculação e lesões na cauda que se tornaram necróticas durante os experimentos, levando alguns animais a morte (33%). Exames histopatológicos do fígado e rins mostraram ausência de alterações morfológicas a 10 mg/Kg mais degeneração hidrotropica do fígado a dose de 20 mg/kg.

Tratamento da criptococose disseminada com beta-lapachona

O tratamento com beta-lapachona (10 mg/kg) reduziu significativamente a população de *C. neoformans* no baço,fígado e pulmões sete dias após a infecção (Figura 1A). Além disso, a levedura foi eliminada do baço e fígado e diminuiu aproximadamente 10^4 vezes sua população nos pulmões e cérebro 14 dias após a infecção, quando comparada ao grupo tratado com PBS. Esses resultados foram similares aos obtidos com o tratamento

utilizando anfotericina B 0,5 mg/kg (P< 0,05)(Fig1B). Exames histológicos mostraram necrose liquefativa e infiltração celular no cérebro dos grupos beta-lapachona e anfotericina B, mas menos intensa que aquelas observadas em lâminas de cérebro do grupo PBS (Figura 1C). Por outro lado quatro de dez camundongos do grupo beta-lapachona morreram durante os experimentos contra um de dez em outros grupos.

Contagem de leucócitos em camundongos tratados com beta-lapachona

Como esperado, as contagens total e diferencial mostraram a queda após 14 dias de infecção (exceto para contagens de monócitos, que permaneceu a mesma durante a primeira semana) devido a administração de dexametasona (Tabela 1). Não houve diferenças nas contagens celulares dos diferentes grupos.

Discussão

Neste trabalho foi desenvolvido um modelo experimental de criptococose adequado para investigar a capacidade da naftoquinona beta-lapachona de controlar a doença. No entanto, a ausência de estudos farmacêuticos sobre esta droga torna impossível prever sua atividade antifúngica *in vivo*. Previamente, Pereira et al. (2006) relatou que a beta-lapachona é tóxica para culturas de células de rin BSC-40 de macacos verdes africanos em concentração superior a 2 mg/L. Além disso, um estudo relatou efeito tóxico da beta-lapachona em ratos imunocompetentes (SANTANA et al., 1968). Nossos dados mostram que a beta-lapachona a 10mg/kg não foi tóxica após uma semana de exposição diária, possibilitando seu uso em um modelo de infecção por C. neoformans. Ainda, o tratamento com a beta-lapachona reduziu a população de C. neoformans em 10.000 vezes nos pulmões e no cérebro e eliminou a levedura do baço e fígado, sugerindo que tratamentos longos poderiam levar a esterilização de todos os órgãos. Esse efeito protetor foi confirmado por exames histológicos, que mostraram que o dano foi menos

intenso que no grupo tratado com PBS. De maneira controversa, atribuiu-se a morte dos animais do grupo beta-lapachona a algum efeito tóxico colateral da droga, uma vez que os animais não estavam especificamente susceptíveis a doença, tendo suas contagens de leucócitos similares àquelas dos grupos PBS e anfotericina B.

Howland (1963) relatou que os mecanismos de ação da naftoquinona parecem envolver fosforilação oxidativa e/ou inibição da cadeia transportadora de elétrons. Além disso, a beta-lapachona aumenta os ânions superóxido e os peróxidos de hidrogênio induzindo citotoxicidade ao *Trypanossoma cruzii* (Salas et al.,2008). Por outro lado o controle da infecção por C. neoformans é devido ao sistema imune e depende da ativação de células T em camundongos resistentes (Schop 2007). Embora o mecanismo de ação da beta-lapachona contra criptococose permaneça obscuro, parece não haver estar relacionado à ativação do sistema imune, o que poderia aumentar a depuração dos órgãos. Essa idéia foi corroborada pelo estado imunológico dos camundongos durante o presente trabalho, uma vez que é sabido que a dexametasona impede a ativação das células B e T, diminuindo substancialmente as imunidades humoral e celular (Franchimont et al., 2000). Também a influencia da beta-lapachona na inibição do óxido nítrico e indução da expressão da oxido nítrico sintetase e a atenuação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 beta, IL-6 e fator de necrose tumoral alfa foram recentemente relatados (Moon et al., 2007).

Tratamentos experimentais contra criptococose disseminada têm sido propostos por muitos investigadores. Por exemplo, 10 mg/kg do triazol SCH56592 diminuiu significativamente a infecção fúngica no pulmão de animais de laboratório e a administração de 4mg/kg de SPK-843, um novo polieno, aumentou a sobrevivência e reduziu a colonização por *C. neoformans* nos órgãos (Hossain et al., 1999). Esse trabalho mostrou uma aplicação prospectiva da naftoquinona beta-lapachona para o

tratamento da criptococose disseminada. Embora essa droga possivelmente produza efeitos tóxicos localizados, diferentes doses e novos esquemas terapêuticos podem ser empregados. Ainda, nós acreditamos que a beta-lapachona possui um efeito protetor contra células do *C. neoformans*. Esses mecanismos de ação estão sob investigação de nosso grupo de pesquisa.

Agradecimentos

Nós agradecemos a MSc, Maria Helena Madruga Lima-Ribeiro (Lika/UFPE) por providenciar os animais usados neste estudo. Os autores agradecem ao CNPq pelo apoio financeiro. J.V. Lima-Filho é membro do Programa de Educação Tutorial (PET-MEC/SESu).

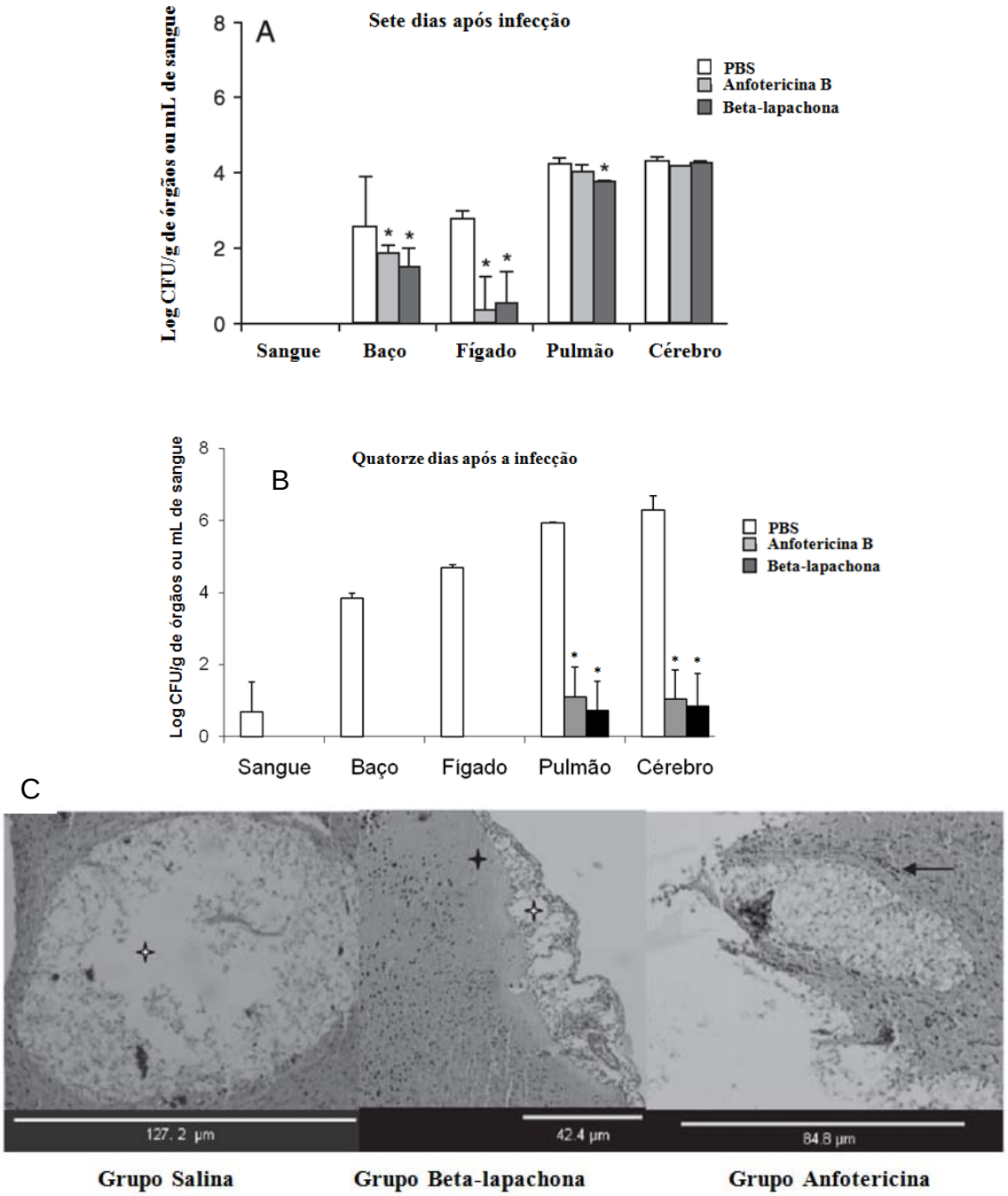

Figura 1. Efeito protetor da administração de beta-lapachona em camundongos Suíços imunossuprimidos infectados por *Cryptococcus neoformans* URM5811. Sete dias após infecção, camundongos foram tratados diariamente com PBS, 10 mg/kg de beta-lapachona ou 0,5 mg/kg de anfotericina B por 7 (A) ou 14 dias (B). * $P < 0,05$ comparado ao grupo PBS (Teste T e ANOVA). O dano histológico no cérebro 14 dias após é mostrado na figura C. Necrose liquefativa e coagulativa são indicadas por estrelas branca e preta, respectivamente. A seta indica infiltrados inflamatórios próximos a lesão.

Tabela 1. Contagem de células leucocitárias em camundongos imunossuprimidos por dexametasona infectados com *Cryptococcus neoformans* amostra URM5811 e tratados com beta-lapachona

Grupos animais	Total de leucócitos / mL de sangue		Segmentados		Monócitos		Linfócitos	
	7 dias*	14 dias	7 dias*	14 dias	7 dias*	14 dias	7 dias*	14 dias
PBS	2666 ± 152.75	2166 ± 173.20	230 ± 61.33	118 ± 32.5	165 ± 4.2	172 ± 41.05	2309 ± 95.44	1913 ± 131.16
Anfotericina B	2680 ± 208.16	2255 ± 224.22	237 ± 58.55	148 ± 36.16	151 ± 35.26	178 ± 29.86	2312 ± 118.76	1973 ± 239.15
Beta-lapachona	2700 ± 200.0	2133 ± 163.29	218 ± 59.57	106 ± 12.67	162 ± 48.81	152 ± 15.13	2320 ± 132.89	1875 ± 163.83

*P < 0.05, 7 dias comparado com 14 dias de tratamento por grupo celular (ANOVA).

4. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Com base nos resultados obtidos foi possível concluir:

- Camundongos Suíços são susceptíveis a infecção por *Cryptococcus neoformas* variedade *neoformans* quando imunossuprimidos.
- O grau de infecção por *Cryptococcus neoformans* URM5811 é indiretamente proporcional ao estado imunológico do animal.
- O isolado URM5811 apresenta características de patogenicidade como presença de cápsula mucopolissacaridica espessa e consistência mucóide.
- A partir do sétimo dia de infecção o modelo experimental da criptococose é eficaz.
- A levedura é encontrada em maior percentual no fígado e baço após o sétimo dia de infecção e no pulmão e cérebro após 14° dia.
- O modelo de infecção experimental crônico apresenta potencial para avaliação preliminar *in vivo* de novas drogas para controle da infecção.
- O sangue periférico não é uma amostra adequada para a confirmação da infecção.
- Beta-lapachona é tóxica na concentração de 20mg/Kg/dia, porém na concentração de 10mg/Kg/dia não apresenta toxicicidade.
- Beta-lapachona e anfotericina B reduzem a população de *C. neoformans* no baço, fígado e pulmões sete dias após a infecção.
- Beta- lapachona e anfotericina B eliminam a levedura do baço, fígado reduzindo em 10^4 vezes a população nos pulmões e cérebro após 14 dias de tratamento.
- A beta-lapachona é uma droga em potencial para o tratamento da criptococose disseminada, apresentando potente atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbeg, M.A., Celia, F.L., Faganello, J., Valente, P., Shrank, A., Vainstein, M.H. 2006. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of Psittaciformes in a Southern Brazilian Zoological Garden. *Mycopathologia* 161: 83-91.

Antunes, R.M.P., Lima, E.O., Pereira, M.S.V., Camara, C.A., Arruda, T.A., Catão, R.M.R., Barbosa, T.P., Nunes, X.P., Dias, C.S., Silva, T.M.S. 2006. Atividade antimicrobiana *in vitro* e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. *Brazilian Journal Pharmacognosy* 16: 517-524.

Araújo, I.B., Brito, C.R., Urbano, I.A., Dominici, V.A., Silva-Filho, M.A., Silveira, W.L., Damasceno, B.P., Medeiros, A.C., Egito, E.S. 2005. Similarity between the *in vitro* activity and toxicity of two different fungizone ™/ Lipofundin admixtures. *Acta Cirúrgica Brasileira* 20: 129-133.

Averbuch, D., Boekhoutt, T., Falk, R., Engelhard, D., Shapiro, M., Block, C., Polachek, I. 2002. Fungemia in a cancer patient caused by fluconazole-resistant *Cryptococcus laurenttii*. *Medical Mycology* 40: 479-484.

Banskota, A.H., Takema, N., Lucia, Y.S., Tezuka, Y., Suresh, A., Midorikawa, K., Kadota, S. 2002. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology* 80: 67-73.

Barbosa, F.M., Fonseca, F.L., Holandino, C., Alviano, C.S., Nimrichter, L., Rodrigues, M.L. 2005. Glucuroxylomannan-mediated interation of Cryptococcus neoformans with human alveolar cells results in fungal internalization and host cell damage. *Microbes and infection* 8: 493-502.

Barchieesi, F., Spreghini, E., Schimizzi, A, N., Maracci, M., Giannini, D., Carle, F., Scalise, G. 2004. Posaconazole and Amphotericin B Combination Therapy against *Cryptococcus neoformans* Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 3312-3316.

Barchieesi, F., Schimizzi, A.M., Caselli, F., Novelli, A., Fallani, S., Giannini, D., Arzeni, D., Cesare, S., Francesco, L.F., Fortuna, M., Giacometti, A., Carle, A., Mazzet, T., Scalise, G. 2000. Interactions between triazoles and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 44: 2435-2441.

Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D. 2000. *Yeast: characteristics and identification*. 3ª edição. Cambridge, University press.

Bianic, T., Harrison, T.S. 2004. Cryptococcal meningitis. *British Medical Bulletin.* 72: 99-118.

Bivanco, F.C., Machado, C.A.S., Martins, E.L. 2006. Criptococose cutânea *Arquivo Medicial ABC*. 31: 102-109.

Bendazolli, W.S. 2000. Fitomedicamrntos: perspectivas de resgate de uma terapia histórica. *O Mundo da Saúde*. 24: 123-126.

Bontempo, M. 1992. Medicina Natural: Fitoterapia. São Paulo, Nova Cultura.

Bose, I., Reese, A.J., Ory, J.J., Janbon, G., Doering, T.L. 2003. A yest under cover: the capsule of Cryptococcus neoformans. *Eukaryot Cell* 2: 655-663.

Brandt, M.E., Pfaller. M.A., Hajjeh, R.A., Hamill, R.J., Pappas, P.G., Reingold, A.L., Rimland, D., Warnock, D.W. 2001. For the Cryptococcal disease active surveillance group. Trends in Antifungal Drug Susceptibility of Cryptococcus neoformans Isolates in the United Sates: 1992 to 1994 and 1996 to 1998. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 45: 3065-3069.

Capilla, J., Claudia, M.L., Clemons, K.V., Raymond, A., Sobel-Stevens, D.A. 2006. Experimental systemic infection with Cryptococcus neoformans var. grubii and Cryptococcus gattii in normal and immunodeficient mice. *Medical Mycology* 44: 601-610.

Casadevall, A., Perfect, J. R. 1998. *Cryptococcus neoformans***.** Washington, American Society for Microbiology Press.

Casadevall, A., Rosas, A., Nosanchuk, J.D. 2000. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Current opinion in microbiology* 3: 354-358.

Casali, A.K., Staats, C.C., Schrank, A., Vainstein, M.H. 2001. *Cryptococcus neoformans*: aspectos moleculares e epidemiológicos. *Journal of Clinical Microbiology* 20: 34-37.

Casali, A.K., Goulart, L., Rosa, L.K.S., Ribeiro, A.M., Amaral, A.A., Alves, S.H., Shrank, A., Meyer, W., Vainstein, M.H. 2003. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *FEMS Yeast Research* 3: 405-415.

Castro, S.L., Pinto, M.C.F.R., Pinto, A.V. 1994. Atividade tuberculostática de naftoquinonas naturais de espécies de Tabebuia (bignoniaceae) e seus derivados sintéticos. *Microbios* 5: 78-83.

Chen, S.H.M., Stins, M.F., Sheng-He, H., Chen, Y.H., Kown-Chung, K.J., Chang, Y., Kim, K.S., Suzuki, K., Jong, A.Y. 2003. *Cryptococcus neoformans* induces alterations in the cytoskeleton of human brain microvascular endothelial cells. *Journal of Medical Microbiology* 52: 961-70.

Charlier, C., Chretien, F., Baudrimont, M., Mordelet, E., Lortholary, O., Dromer, F. 2005. Capsule structure changes associated with Cryptococcus neoformans crossing of the blood-brain barrier. *American Journal Pathology* 166: 421-432.

Chikamori, M., Fukushima, K. 2005. A new hexose transporter from Cryptococcus neoformans: Molecular cloning and structural and functional characterization. *Fungal genetics and biology*. 42: 646:655.

Choi, E.K., Terai, K., Ji, M., Kook, Y. H., Park, K.H., Oh, E.T., Griffin, R.J., Lim, B.U., Kim, J.S., Lee, D.S., Boothman, D. A., Loren, M., Song, C.W., Park, H.J. 2007. Upregulation of NAD (P): Quinone oxidoredustase by radiation potentiates the effect of bioreductive β-lapachone on cancer cells. *Neoplasia* 9: 634-642.

Chretien, F., Lortholary, O., Kansau, I., Neuville, S., Gray, F., Dromer, F. 2002. Pathogenesis of cerebral *Cryptococcus neoformans* infection after fungemia. *Journal Infectious Disease Stockholm* 186: 522- 530.

Cole, G., Halawa, A., Anaissie, E. 1996. The role of gastrointestinal tract in hematogenous candidiasis: from the laboratory to the bedside. *Clinical Infectious Diseases* 22: 73-88.

Colombo, A.L., Alves, S.H. 2004. Teste de susceptibilidade a antifúngicos. Em: SIDRIN, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Micologia Médica à luz de autores contemporâneos. ed Guanabara Koogan, pp. 102-111.

Corrêa, M.P.S.C., Severo, L.C., Oliveira, F. M., Iron, K., Londero, A.T. 2002. The spectrum of computerized tomography (CT) findings in cerebral nervous system (CNS) infection due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in immunocompetent children. *Revista do Instituto de Medicina Tropical* 44: 283-287.

Covington, M.B. 2001. Traditional Chinese medicine in the treatment of diabetes. Diabets spectrum. *Diabetes* 14: 154-159.

Cunha-Filho, M.S.S., Alves, F.C., Alves, G.M.C., Monteiro, D.M., Medeiros, F.P.M.; Neto, P.J.R. 2005. Beta- lapachona: desenvolvimento e validação de metodologia analítica para nova alternativa terapêutica antineoplásica. *Revista Brasileira de. Farmácia* 86: 39-43.

Cunha-Filho, M.S.S., Cunha-Marinho, B., Torres-Labandeira, J.J., Martinez-Pacheco, R., Landin, M. 2007. Characterization of β-Lapachone and Methylated β-Cyclodextrin Solid-state System. *AAPS PharmSciTech* 8:1-10.

Cunha-Filho, M.S.S., Martínez-Pacheco, L., Landí. M. 2008. Dissolution rate enhancement of the novel antitumoral β-lapachone by solvent change precipitation of microparticles. *European Journal of Pharmaceutics Biopharmaceutics* 6: 1-7.

Dannaoui, E., Abdul, M., Arpin, M., Michel- Nguyen, A., Piens, M.A., Favel, A., Lortholary, O., Dromer, F. 2006. The French Cryptococcosis study group. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50: 2464-2770.

Darzé, C., Lucena, R., Gomes, I., Melo, A. Características clínicas laboratoriais de 104 casos de meningoencefalite criptocócica. 2000. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 33: 21-26.

Davanso, V. M. 2002. Photosynthesis, Growth and development of Tabebuia avellanedae lor. Ex. Grised (Bignoneaceae) in fooded soil. *Brazilian archives biology and Technology* 45: 375-384.

Delgado, A.C.N., Taguchi, H., Mikami, Y., Myiajy, M., Villares, M.C.B., Moretti, M.L. 2005. Human criptococcosis: relationship of environmental and clinical strains of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from urban and rural areas. *Mycopathologia*, 159: 7-11.

De Moura, K.C.G. 2001. Trypanocidal activity of naftoquinonas from Tabebuia and some heterocyclic derivates: Review from an interdiciplinary study. *Journal Brazil Chemistry Soc* 12: 325-338.

Del Valle, L., Pina-Oviedo, S. 2006. HIV desordens of the brain; Pathology and pathogenesis. *Frontiers Bioscience* 11: 718-732.

Deray, G. 2002. Amphotericin B nephrotoxicity. *Journal Antimicrobial Chemotherapy* 49: 37-41.

Diaz, M.R., Fell, J.M. 2005. Use of a suspension array for rapid identification of the varieties and genotypes of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 3662-3672.

Dismukes, W.E. 2000. Introduction to antifungical drugs. *Clinical Infectious Disease* 30: 653-657.

Ellerbroer, P.M., Walenkamo, A.M., Hoepelman, A.I., Coenjaerts, F.E. 2004. Effects of the capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans* on phagocyte migration and inflammatory mediators. *Current Medicinal Chemistry Schiphol* 11: 253-266.

Faganello, J., Arruda, W., Schrank, A., Vainstein, M.H. 2006. An alternative method to prepare samples of the pathogens yeast Cryptococcus neoformans for scanning electron microscopy analysis. *Journal of Microbiological Methods* 64: 416-419.

Ferreira, H.S. 1998. *Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil*. Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciência.

Filippin, F.B., Souza, L.C. 2006. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Brazilian Journal Pharmaceutical Sciences* 42: 167-194.

Filiú, W.F.O., Wanke, B., Aguena, S.M., Vilela, V.O., Macedo, R.C.L., Lazera, M. 2002. Cativeiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na Cida de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35: 591-595.

Fonseca, S.G.C., Leila, B.L.S., Rebeka, F.C., Santana, D.P. 2004. Validação de metodologia analítica para doseamento de soluções de Lapachol por CLAE. *Química nova* 27: 157-159.

Friedman, G.D., Fessel, W.J., Udalsova, N.V., Hurley, L.B. 2005. Cryptococcosis: The 1981-2000 epidemics. *Mycoses* 48: 122-125.

Gates, M.A., Thorkildson, P., Kozel, T.R. 2004. Molecular architecture of the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Molecular Microbiology* 52:13-24.

Gerbaud, E., Tamion, F., Girault, C., Clabault, K., Lepretre, S., Lerot, J., Bonmarchand, G. 2003. Persistent acute tubular toxicity after switch from conventional amphotericin B to lipossomal amphotericin B (AmBisome). *Journal Antimicrobial Chemotherapy* 51: 473-475.

Goldman, D.L., Khine, H., Abadi, J., Lindenberg, D.J., Pirofski, L., Niang, R.; Casadevall, A. 2001. Serologic evidence for Cryptococcus neoformans infection in early childhood. *Pediatric* 107: 55-66.

Gold, N., Stout, H.A., Pagano, J.F., Donovick, R. 1956. Amphotericin A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete *in vivo* studies. *Antibiotics Annual* 56: 579-586.

Graybill, J.R. 2000. The role of murine models in the development of antifungal therapy for systemic mycoses. *Drug Resistance Updates* 3: 364-383.

Guiraud, P., Steiman, R., Campos-Takaki, G., Seigle-Murandi, F., Simeon, B.M. 1994. Comparasion of antibacterial and antifungal activities of lapachol and beta-lapachone. *Planta Medica* 60: 373-374.

Hoang, L.M.N., Maguire, J.A., Doyle, P., Fyfe, M., Roscoe, D.L. *Cryptococcus neoformans* infections at Vancouver Hospital Sciences Centre (1997-2002):

epidemiology, microbiology and histopalogy. *Journal of Medical Microbiology* 53: 935-940.

Honsho, C.S.; Mine, S.Y., Oría, A.P., Benato, N., Camacho, A.A., Alessi, A.C., Laus, J.L. 2003. Generalized systemic cryptococosis in a dog after immunossupressive corticotheray. *Arq Bras Med Vet Zootec* 55: 155-159.

HOOG, G.S. 2000. *Atlas of Clinical Fungi*. 2ª edição. Centraalbureau voor Schimmelcultures: Universitat Rovira, Virgilia.

Horta, J.A., Faganello, J., Rosa-Silva, L.K., Oliveira, L.T., Santuario, J.M., Vainstein, M.H., Alves, S.H. 2005. Susceptibility to heat and antifungal agents of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) isolated from Eucalyptus spp. In Rio Grande do Sul, Brasil. *Brasilian Journal Microbiology* 36: 1-6.

Hsueh, P.R., Lau, Y.J., Chuang, Y.C., Wan, J.H., Huang, W.K., Shyr, J.M., Yan, J.J., Yu, K.W., Wu, J.J., Ko, W.C., Yang, Y.C., Liu, Y.C., Teng, L.J., Liu, C.Y., Luh, K.T. 2005. Antifungal susceptibilities of clinical isolates of Candida species, Cryptococcus neoformans, and Aspergillus species from Taiwan Program Data from 2003. *Antimicrobial Agents Chemoterapy* 49: 512-517.

Huang, G, W., Zhang, Z., Han, X., Tang, J., Wang, J., Dong, S., Wang, E. 2002. Ion channel behavior of amphotericin B in sterol-free and cholesterol -or ergosterol-containing supported bilary model membranes investigated by electrochemistry and spectroscopy. *Biophysical Journal* 83: 3245-3255.

Huffnagle, G.B., Traynor, T.R., McDonald, R.A. 2000. Leukocyte recruitment during pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *Immunopharmacology* 48: 231-236.

Hull, C.M., Heitman, J. 2002. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. *Annual Review Genetics* 36: 557-615.

Idnurm, A., Bahn, Y.S., Nielsen, K., Lin, X., Fraser, J.A., Heitman, J. 2005. Deciphering the Model Pathogenic Fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nature Review Microbiology* 3: 753-764.

Ikeda, R., Sugita, T., Jacobson, E.S., Shinoda, T. 2002. Laccase and melanization in clinically important *Cryptococcus* species other than *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 1214-1218.

Janbon, G. 2004. *Cryptococcus neoformans* capsule biosynthesis and regulation. *FEMS Yeast Research* 4: 765-771.

Lacaz, C.S., Heins-Vaccari, E.M., Hernández-Arriagada, G.L., Martinez, E.C., Prearo, C.A.L., Corim, S.M., Martines, M.A. 2002. Primary cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus neformans* var. *gattii* serotype B, in an immunocompetent patient. *Revista do Instituto de Medicina Tropical* 44: 225- 228.

Larsen, R.A., Bauer, M., Thomas, A.M., Graybill, J.R. 2004. Amphotericin B and Fluconazole, a Potent Combination Therapy for Cryptoccoccal Meningitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48: 985-991.

Larsson, C.E., Otsuka, M., Michalany, N.S., Barroa, P.S.M., Gambale, W., Safatle, A.M.V. 2003. Canine ocular cryptococosis: a case report. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 55: 533-538.

Lee, Y.A. 2004. First report of *Cryptococcus albidus* – induced disseminated cryptococcosis in a renal transplante recipient. *Korean Journal of Internal Medice* 19: 53-57.

Leite, A.G., Vidal, J.E., Bonasser, F. F., Nogueira, R.S., Oliveira, A.C. 2004. Cerebral infarction related to cryptococcal meningitis in HIV-infected patient: case report and literature review. *Brazilian Journal of Infection Disease* 8: 175-179.

Levitz, S.M., Boekhout, T. 2006. Cryptococcus: the once-sleeping giant is fully awake. *FEMS Yeast Research* 6: 461-462.

Li, Y., Li, C.J., Yu, D., Pardee, A.B. 2000. Potent induction of apoptosis by β-lapachone in human multiple myeloma cell lines and patient cells. *Trends in Molecular Medicine* 6: 1008-1015.

Lin, X., Heitman, J. 2006. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Microbiology* 60: 69-105.

Litvintseca, A.P., Thakur, R., Vilgalys, R., Mitchell, T.G. 2006. Multilocus sequense typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *Grubbi* (serotype A), including a unique population in Botswana. *Genetics* 172: 2223-2238.

Lizargo, J., Linares, M., Bedout, C., Restrepo, Á., Agudelo, C.I., Castañeda, E. 2007. Estúdio clínico y epidemiológico de La criptococosis in Colômbia resultados de nueve años de La encuesta nacional, 1997-2005. *Biomédica* 27: 94-106.

KawakamiI, M., Tohyama, Q., Xile, A. 1996. IL-2 protects mice against pulmonary and disseminated infection caused by *Cryptococccus neoformans*. *Clinical Experimental Immunology* 104: 208-214.

Keller, S. M., Viviani, M. A., Esposto, M. C., Cogliati, M., Wickes, B. L. 2003. Molecular and genetic characterization of a serotype A *MAT*a *Cryptococcus neoformans* isolate. *Microbiology* 149: 131–142.

Khawcharoenporn, T., Apisarnthanarak, A., Mundy, L.M. 2007. Non-neoformans cryptococcal infections: a systematic review. *Infection Munchen* 35: 51-58.

Klepser, M.E., Wolfe, E.J., Pfaller, M.A. 1998. Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazol and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. *Journal Antimicrobial Chemotherapy* .41: 397-401.

Kommers, G.D., Souza, T.M., Souto, M.A.M., Corte, F.D., Barros, C.S.L. 2005. Granulomatous cryptococcal pneumonia in a horse. *Ciência Rural* 35: .938-940.

Koyama, J. 2000. Ciclopentene dialdehydes from Tabebuia impetiginosa. *Photochemistry* .53: 869-872.

Kumar, P., Saran, R.K., Gondal, R., Malhotra, V. 2005. Smear morphology of cryptococcosis presenting as a subcutaneous swelling in healthy adults: a report of three cases. *Cytopathology* 16: 143-146.

Marcicci, M.C., Ferreres, F., Garcia-Viguera, C., Bankova, V.S., De Castro, S.L., Dantas, A.P., Valente, P.H.M., Paulino, N. 2001. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 74: 105-112.

Martinez, L.R., Garcia-Rivera, J., Casadevall, A. 2001. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) strains are more susceptible to heat than *Cryptococcus*

neoformans var. *gattii* (serotype A) strains. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 3365-3367.

McCurdy, L.H., Morrow, J.D. 2001. Ventriculitis due to *Cryptococcus uniguttulatus*. *South Medical Journal* 94: 65-66.

Menacho-Marquez, M.; Murgia, J.R. 2006. β-lapachone Activates a Mre11p-Tel1p G1/S Checkpoint in Budding Yeast. *Cell Cycle* 5: 2509-2516.

Menezes, E.A., Monteiro, M.N.R., Angelo, M.R.F., Santos, C.D., Freire, C.C.F., Cunha, F.A. 2002. *Cryptococcus neoformans* causing meningitis in AIDS patients. *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35: 537-539.

Miranda, F., Vilar, J., Alves, I., Cavalcanti, S., Antoniolli, A. 2001. Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of *Tabebuia avellanedae* Lor. Ex. Griseb. Inner bark aqueous extract. *BMC Pharmacology* 1: 6-11.

Mitchell, T.G., Perfect, J.R. 1995. Cryptococcosis in the Era of AIDS – 100 Years after the Discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical Microbiology Review* 8: 515-548.

Monari, C., Bistoni, F., Vecchiarelli, A. 2006. Glucuronoxylomannan exhibits potent immunosuppresive properties. *FEMS Yeast Research* 6: 537-542.

Mora-Duarte, J., Betts, R., Rotstein, C., Colombo, A.L., Thompson-Moya, L., Lupinacc, R., Sable, C., Kartsonis, N., Perfect, J. 2002. Comparison of Caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *New England Journal of Medicine* 347: 2020-2029.

Moreira, T.A., Ferreira, R.M.R., Borges, A.S. 2006. Cryptococosis: clinical epidemiologycal laboratorial study and fungi varieties in 96 patients. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39: 255-258.

Namiq, A.L., Tollefson, T., Fan. F. 2005. *Cryptococcal parotitis* presenting as a cystic parotid mass: Report of a case diagnosed by fine-needle aspiration cytology. *Diagnostic Cytolopathology* 33: 36-38.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2002. *Reference method for broth dilution testing of yeasts: Approved standard-second edition M27-A2*. Wayne, PA.

Nelson, R.W., Couto, C.G. 2001. *Doenças micóticas polissistêmicas: Medicina interna de pequenos animais.* 2ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1023-1030.

Nielsen K., De Obaldia, A. L., Heitman, J. 2007. *Cryptococcus neoformans* Mates on Pigeon Guano: Implications for the Realized Ecological Niche and Globalization. *Eukaryotic Cell* 6: 949–959.

Nishika, M.M., Lazera, M.S., Barbosa, G.G., Trilles, L., Balassiano, B.R., Macedo, R.C. L., Bezerra, C.C.F., Perez, M.A., Cardarelli, P., Wanke, B. 2003. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* Isolates from Clinical and Environmental Sources in Brazil: Analysis of Host and Regional Patterns. *Journal of Clinical Microbiology* 41:73–77.

Odom, A., Muir, S., Lim, E., Toffaletti, D.L., Perfect, J.R., Heitman, J. 1997. Calaneurin is required for virulence of Cryptococcus neoformans. *EMBO J*ournal 16:2576-2589.

Oliveira-Brett, A.M., Goulart, M.O.F., Abreu, F.C. 2002. Reduction of lapachones and their reaction with L-cysteine and mercaptoethanol on glassy carbon electrodes. *Bioelectrochemistry* 56: 53-55.

Olszewski, M.A., Noverr, M.C., Chen, G., Toews, G.B., Cox, G.M., Perfect, J.R., Huffnagle, G.B. 2004. Urease expression by Cryptococcus neoformans promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. *American Journal of Pathology Philadelphia* 161: 1761-1771.

Ordóñez, N., Castañeda, E. 2001. Varieties and serotypes of Cryptococcus neoformans clinical isolates in Colombia. *Revista Iberoamericana de Micologia* 18: 128-130.

PAL, M. 2005. Pathogenicity of environmental strains of *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* in murine model. *Revista Iberoamericana de Micologia* 22: 56-61.

Pappalardo, M.C.S.M., Melhem, M.S.C. 2003. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical* 45: 299-305.

Park, H.J., Chi, E.K., Chi, J., Ahn, K.J., Kim, E.J., Ji, I.M., Kook, S.D.A., Williams, B., Griffin, R., Boothman, D. A., Lee, C.K., Song, C.W. 2005. Heat-induced up-regulation of NAD (P):H: Quinone Oxidoreductase potentiates anticancer effects of β-lapachone. *Clinical Cancer Research* 11: 8866-8871.

Perea, S., Patterson, T.F. 2002. Antifungal resistance in pathogenic fungi. *Antimicrobial Resistance* 15: 1073-1080.

Pereira, A.P.C., Coutino, S.D.A. 2003. Criptococose em cães e gatos- revisão. *Revista Clinica Veterinária*, 8: 24-32.

Perfect, J.R. 2005 Cryptococcus neoformans: A sugar- coated killer with designer genes. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 45:395-404.

Perfect, J.R., COX, G.M. 1999. Drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. *Drug Resistance updates* 2: 259-269.

Queiroz, J.P.A.F., Sousa, F.D.N.; Lage, R.A., Izael, M.A., Santos, A.G. 2008. Criptococose- uma revisão bibliográfica. *Acta Veterinária Brasilica* 2: 32-38.

Queiroz, M.L.S., Valadares, M.C., Torello, C.O., Ramos, A.L., Oliveira, A.B., Rocha, F.D., Arruda, V.A., Accorci, W.R. 2008. Comparative studies of the effects of Tabebuia avellanedae bark extract and β- lapachone on the hematopoietic response of tumor- bearing mice. *Journal of Ethnopharmacology* 117: 228-235.

Reolon, A., Perez, L.R.R., Mezzari. 2004. A. Prevalência de Cryptococcus neoformans nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 40: 293-298.

Rivas, P., Serrano, R.Q. 2003. Utilidad clínica de las pruebas de susceptibilidad antimicótica. *Revista Colombiana de Cancerologia*, 2: 34-42.

Rogers, T.R. 2006. Antifungal drug resistance: limited data, dramatic, impact? *International Journal Antimicrobial Agents* 27: 7-11.

Rodrigues-Tudella, J.L., Martine-Difez, F., Cuenca-Estrella, M., Rodero, L., Carpinteiro, Y., Gorgojo, B. 2002. Influence of shaking on antifungal susceptibility testing of Cryptococcus neoformans: comparison of the NCCLS standard M27A medium, buffered yeast nitrogen base, and RPMI 2% glucose *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 44: 400-404.

Salas, C., Tapia, R.A., Cuidad, K., Armstrong, V., Orellana, M., Kemmeling, U., Ferreira, J., Maya, J.D., Morello, A. 2008. Trypanossoma cruzi: Activities of lapachona and β-lapachona derivates against epimastigote and trypomastigote forms. *Biorganic & Medicinal Chemistry* 16: 668-674.

Sanati, H., Messer, S.A., Pfaller, M., Witt, M., Espinell-Ingroff, A., Ghannoum, M. 2006. Multicenter evaluation of broth microdilution method for susceptibility testing of Cryptococcus neoformansagainst fluconazol. *Journal Clinical Microbiological* 34: 1280-1282.

Sanglard, D. 2002. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 20: 462-70.

Sanguinetti, M., Posteraro, B., La Sorda, M., Torelli, R., Fiori, B., Santangelo, R., Delogu, G., Fadda, G. 2006. Role of AFR1, an ABC transporter- encording gene, in the in vitro response to fluconazol and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Infection Immunity* 74: 1352-1359.

Santangelo, R., Zoellner, H., Sorrel, T., Wilson, C., Donald, C., Djordjevic, J., Shounan, Y., Wright, L. 2004. Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model. *Infection Immununity* 72: 2229-2239.

Segal, E., Baum, G.L. 1994. Pathogenic yeasts and yeasts infections. Boca Raton, CRC Press.

Severo, L.C., Oliveira, F.M., Silva, V.B. 1998. Diferenças clínicas, epidemiológicas, e ecológicas entre as duas variedades de *Cryptococcus neoformans*. *Revista Medical da Santa Casa Porto Alegre* 9: 1672-1686.

Severo, L.C., Zardo, I.B., Londero, A.T. 2001. Cutaneous Cryptococcus due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Revista Iberoamericana de Micologia* 18: 200-201.

Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G. 2004. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Silva, A.J.M., Buarque, C.D., Brito, F.V., Aurelian, L., Macedo, L.F., Malkas, L.H., Richey, J.R., Lopes, D.V.S., Noel, F., Murakami, Y.L.B., Silva, N.M.V., Melo, P.A., Caruso, R.R.B., Castro, N.G., Costa, P.R.R. 2002. Synthesis and preliminary pharmacological evaluation of new 1, 4 naphthoquinones structurally related to lapachol. *Bioorganic & Medical Chemistry* 10: 2731-2738.

Silva, M.N., Ferreira, V.F., Souza, M.C.B.V. 2203. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β-lapachona e derivados. *Química nova* 26: 407-416.

Silva, P.R., Rabelo, R.A.S., Terra, A.P.S., Texeira, D.N.S. 2008. Susceptibility to antifungal agents among *Cryptococcus neoformans* varieties isolated from patients at a university hospital. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41: 158-162.

Soares, M.C.B., Paula, C.R., Dias, A.L.T., Caseiro, M.M., Costa, S.O.P. 2005. Environmental straits of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. Revista do *Instituto de Medicina Tropical* 47: 31-36.

Song, C.W.; Chae, J.J., Choi, E.K., Hwang, T.S., Kim, C., Lim, B.U., Park, H.J. 2008. Anti-cancer effect of bio-reductive drug beta-lapachone is enhanced by activating NQO1 with heat shock. *Internation Journal Hyperthermia* 24:161-169.

Sorrel, T.C., Ellis, D.H. 1997. Ecology of Cryptococcus neoformans. *Revista Iberoamericana de Micologia* 14: 42-43.

Sorrel, T.C. 2001. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Medical Mycology* 39: 155-168.

Sperandeo, N.R. 2004. Synthesis, antiprotozoal, cytotoxic activities of new N-(3, 4-dimethyl-5-isoxazolyl)-1,2-naphthoquinone-4-amino derivates. *II Farmaco* 59: 431-435.

Steen, B.R., Zuyderduyn, S., Toffaletti, D.L., Marra M., Jones, S.S.J.M., Perfect, J.R., Kronstad, J. 2003. *Cryptococcus neoformans* Gene expressin during Experimental Cryptococcal Meningitis. *Eukaryotic Cell* 2:1336-1349.

Steenbergen, J.N., Casadevall, A. 2003. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes Infect* 5: 667-675.

Taboada, J. 2004. Systemic Mycoses. *Revista de Medicina Tropical* 47: 31-36.

Tandon, V.K., Singh, R.V., Yadav, D.B. 2004, Synthesis and evaluation of novel 1,4-naphthoquinone derivates as antiviral, antifungal and anticancer agents. *Revista de Medicina Tropical* 14: 2901-2904.

Thipine, M., Letscher-Bru, V., Herbrecht, R. 1999. Amphotericin B and its new formulations: pharmacologia characteristics, clinical efficacy, and tolerability. *Transplant Infectious Disease* 1: 273-283.

Torres-Rodrígues, J.M., Morera, Y., Baró, T., Corominas, J.M., Castañeda, E. 2003. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* var. *gatti* in an immunocompetent mouse model. *Medical Mycology* 41: 59-63.

Trilles, L., Fernadez-Torres, B., Lazéra, M.R., Wanke, B., Guarro, J. 2004. In Vitro Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus gattii*. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 4815-4817.

Tucker, S.C., Casadevall. 2002. A. Replication of Cryptococcus neoformans in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99: 3165-3170.

Vandeputte, J., Wachtel, J.L., Stiller, E.T. 1956. Amphotericin A and B antifungal antibiotics produced by a Streptomycete. II The isolation and properties of the crystalline Amphotericin. *Antibioics Annual* 56: 587-591.

Varlam, D.E., Siddiq, M.M., Parton, L.A., Russmann, H. 2001. Apoptosis contributes to amphotericin B-induced nephrotoxicity. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 45: 679-685.

Vilchez, R.A., Fung, J., Kusne, S. 2002. Cryptococcosis in organ transplant recipients: an overview. *American Journal Transplant* 2: 575-580.

Xiujiao, X., Xu Ai'e. 2005. Two cases of cutaneous cryptococcosis. *Mycoses* 48: 238-241.

Yamazumi, T., Pfaller, M.A., Messer, S.A., Houston, A.K., Boyken, L., Hollis, R.J.,; Futura, I., Jones, R.N. 2003. Characterization of Heteroressistance to fluconazol

among clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 267-272.

Walsh, T., Finberg, R.W., Arndt, C., Hiemenz, J., Schwartz, C., Bodensteiner, D., Pappas, P., Seibel, N., Greenberg, R.N., Dummers, S., Schuster, M., Holcenberg, J.S. 1999. Lipossomal amphotericin B por empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia. *New England Journal of Medicine* 340: 764-771.

Warashina, T. 2004. Constituintes from the barck of *Tabebuia impetigiosa*. *Phytochemistry* 65: 2003-2011.

Wickes, B.L., Kwon-Chung, K.J. 2002. Genetic basis of pathogenicity in *Cryptococcus neoformans* In: Fungal Pathogenesis: Principles and Clinical Applications, Marcel Dekker, New York, pp. 25-49.

Wiles, S., William, P.H., Frankel, G., Robertson, B. 2006. Modelling infectious disease time to think outside the box? *Nature Reviews Microbiology* 4: 307-312.

Zaragosa, O., Fries, B.C., Casadevall. 2003. A. Induction of capsule Growth in *Cryptococcus neoformans* by Mammalian Serum and CO_2. *Infection and Immunity* 71: 6155-6164.

Zaragosa, O., Mihu, C., Casadevall, A., Nosanchuk, J.D. 2005. Effect of amphotericin B on capsule and cell size in *Cryptococcus neoformans* during murine infection. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 49: 4358-4361.

Zaragosa O, Telzak A, Bryan R.A, Dadachova E, Casadevall, A. 2006. The polysaccharide capsule of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* enlarges by distal growth and is rearranged during budding. *Molecular Microbiology* 59: 67-83.

ANEXOS

Brazilian Journal of Medical and Biological Research (2010) 43: 345-349
ISSN 0100-879X Short Communication

Antifungal activity of the naphthoquinone beta-lapachone against disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in dexamethasone-immunosuppressed Swiss mice

C.S. Medeiros[1], N.T. Pontes-Filho[2], C.A. Camara[4], J.V. Lima-Filho[5], P.C. Oliveira[1], S.A. Lemos[1], A.F.G. Leal[1], J.O.C. Brandão[3] and R.P. Neves[1]

[1]Departamento de Micologia, [2]Departamento de Patologia, [3]Departamento de Energia Nuclear, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil
[4]Departamento de Química, [5]Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

Abstract

The *in vivo* antifungal activity of the naphthoquinone beta-lapachone against disseminated infection by *Cryptococcus neoformans* was investigated. Swiss mice were immunosuppressed daily with dexamethasone (0.5 mg per mouse) intraperitoneally for 3 days, the procedure was repeated 4 days later, and the animals were then challenged intravenously with *C. neoformans* (10^6 CFU/mL) 1 week later. Seven days after infection, the mice were divided into groups and treated daily with beta-lapachone (10 mg/kg, *iv*) for 7 (N = 6) and 14 days (N = 10). Amphotericin B (0.5 mg/kg) was used as comparator drug and an additional group received PBS. Treatment with beta-lapachone cleared the yeast from the spleen and liver, and the fungal burden decreased approximately 10^4 times in the lungs and brain 14 days after infection when compared to the PBS group ($P < 0.05$). This result was similar to that of the amphotericin B-treated group. Protection was suggestively due to *in vivo* antifungal activity of this drug and apparently not influenced by activation of the immune response, due to similar leukocyte cell counts among all groups. This study highlights the prospective use of beta-lapachone for treatment of disseminated cryptococcosis.

Key words: Beta-lapachone; *Cryptococcus neoformans*; Cryptococcosis; Immunosuppression; Experimental infection; Amphotericin B

Introduction

Cryptococcosis is an opportunistic systemic mycosis that especially affects immunocompromised patients (1). Patients infected with HIV, cancer patients, diabetics, patients submitted to transplants or invasive procedures, or people taking corticosteroids are especially susceptible to the disease. Primary cryptococcal infection starts in the lungs and commonly disseminates to several organs (2). However, the yeast shows tropism for the central nervous system, where it survives and proliferates, causing meningitis and meningoencephalitis, both of which can be fatal if not treated properly (3). Two major strains of *Cryptococcus neoformans* have been described: *C. neoformans* var. *neoformans*, which is most commonly detected in immunodeficient hosts, and *C. neoformans* var. *gattii*, which is more frequently isolated from immunocompetent hosts (4). Cryptococcosis is treated with amphotericin B/azoles as the main therapeutic choice (5). Nevertheless, the high lethality rate among immunocompromised patients indicates that new therapeutic options are necessary.

Natural products or derived substances with antifungal properties have been used to manage cryptococcosis. Some examples are plant essential oils, which have been extensively tested due to their antimicrobial properties (6). Beta-lapachone is synthesized from lapachol derived from *Tabebuia avellanedae* (popular name: Ipê roxo), a plant of the Bignoneaceae family commonly found in many regions of Brazil. This naphthoquinone was reported to have anticancer, anti-*Trypanosoma* and antibacterial properties (7-9).

Correspondence: J.V. Lima-Filho, Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Departamento de Biologia, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Campus Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE, Brasil. E-mail: jvitor@db.ufrpe.br and rejadel@yahoo.com.br

Received May 23, 2009. Accepted February 18, 2010. Available online March 5, 2010. Published April 12, 2010.

Previous studies showing antifungal activity of lapachol and beta-lapachone against *C. neoformans* are to some extent contradictory because of the different experimental protocols used (10). Nevertheless, these data indicate that new studies are necessary before proposing antifungal tests on humans.

In the present study, the role of the naphthoquinone beta-lapachone in controlling disseminated cryptococcosis was evaluated in a murine model of dexamethasone-immunosupressed Swiss mice.

Material and Methods

Synthesis of beta-lapachone

Beta-lapachone was synthesized from naturally occurring lapachol derived from *T. avellanedae* (Bignoneaceae) using sulfuric acid according to a method from Cavalcante et al. (11).

C. neoformans URM5811

We have tested 16 yeast isolates of *C. neoformans* stored in the Culture Collection of the URM Micoteca of Pernambuco Federal University for *in vitro* sensitivity to beta-lapachone by standard methods (12) (data not shown). The minimum inhibitory concentration and minimum fungicidal concentration for beta-lapachone was 4 and 64 mg/L, respectively. *C. neoformans* var. *neoformans* URM5811 was obtained from an AIDS patient and used due to its high virulence and *in vitro* sensitivity to beta-lapachone.

Animals and immunosuppression protocol

Adult male Swiss mice, 30 g, were obtained from the Keizo-Azami Immunopathology Laboratory (LIKA/UFPE). The animals were handled according to established experimental procedures following approval by the Animal Ethics Committee of the Pernambuco Federal University (protocol #013968/2007-1). The immunosuppression protocol was adapted from Capilla et al. (13). The mice received 0.5 mg/mouse dexamethasone (Teuto®, Brazil) intraperitoneally for 3 days and then 4 days thereafter in all experiments. Total leukocyte enumeration in the blood of the immunosupressed (IS) mice in comparison to the immunocompetent (IC) animals was used to confirm immunosuppression.

C. neoformans infection model

Seven days after the beginning of immunossupression, the animals (N = 6) were challenged with 0.2 mL *C. neoformans* URM5811 (10^6 cells/mL) by the tail vein. IC mice (N = 6) were used as control and inoculated under the same experimental conditions. The animals were observed daily for clinical signs and for mortality for 14 days.

Cytotoxicity assay on dexamethasone-immunosuppressed mice

The beta-lapachone doses were chosen based on 12.25 and 25% of the lethal dose of 80 mg/kg determined for IC rats (14). The drug was dissolved in 10% DMSO plus 3% Tween 80 (v/v in PBS) to produce stock solutions of 100 g/L. Then, 0.2 mL of a suspension containing 10 or 20 mg/kg was administered daily by the tail vein to IS Swiss mice (N = 6) for 1 week. The control animals (N = 6) received only the solvent (10% DMSO plus 3% Tween 80; v/v in PBS) devoid of beta-lapachone. The animals were observed each day and their liver and kidneys were submitted to histological examination at the end of the experiment.

Treatment of disseminated cryptococcosis with beta-lapachone

Seven days after infection, 0.2 mL beta-lapachone (10 mg/kg) was administered daily by the tail vein to IS mice according to two independent schedules: 1) 7 days of treatment (N = 6), or 2) 14 days of treatment (N = 10). Amphotericin B (0.5 mg/kg) was used for comparison and the untreated animals received only PBS. The animals were observed for clinical signs and for mortality every day until the end of the experiments.

C. neoformans enumeration and histological examination

An aliquot of blood was collected by cardiac puncture after euthanasia with halothane. The spleen, liver, lungs, and brain were weighed and macerated in PBS (1:10 or 1:100, w/v). All samples were submitted to serial dilutions and 0.1-mL aliquots were added to plates containing SDA plus chloramphenicol (50 mg/mL) and incubated at 37°C for 24-72 h. Data are reported as colony forming units (CFU)/g organ or per mL blood. Tissues were fixed in 10% formaldehyde and processed for paraffin embedding. Sections (5 µm) were stained with hematoxylin-eosin and slides were coded and examined by a single pathologist, who was unaware of the experimental conditions of each group.

Statistical analysis

Data regarding white cell counts and CFU counts were analyzed statistically by the Student *t*-test or ANOVA, with the level of significance set at $P < 0.05$.

Results

Immunosuppression protocol and *C. neoformans* infection model

The immunosuppression protocol applied to the Swiss mice (IS group) resulted in total leukocyte cell counts of approximately 45 and 61% lower than for the IC group, after 7 and 14 days of infection, respectively ($P < 0.05$). In addition, *C. neoformans* URM5811 produced a disseminated infection in IS mice that ranged from 10^4 to 10^6 CFU/g spleen, liver, lung, and brain 14 days post-infection, whereas IC mice were resistant to cryptococcosis ($P < 0.05$).

In vivo cytotoxicity of beta-lapachone

Beta-lapachone at 10 mg/kg was not highly toxic to IS

mice after daily inocula for 1 week since all animals were healthy and survived during the experiment. Conversely, a dosage of 20 mg/kg provoked motor imbalance and abdominal contractions after inoculation and lesions in the tail that became necrotic during the experiments, leading to death of some of the animals (33%). Histological examination of the liver and kidneys showed no morphological alterations at 10 mg/kg but hydrotropic degeneration of the liver was observed at a dosage of 20 mg/kg.

Treatment of disseminated cryptococcosis with beta-lapachone

Beta-lapachone treatment (10 mg/kg) significantly reduced the *C. neoformans* population in the spleen, liver and lungs 7 days after infection (Figure 1A). In addition, the yeast was cleared from the spleen and liver, and fungal burden was reduced approximately 10^4 times in the lungs and brain 14 days post-infection when compared to the PBS group. These results were similar to those obtained with 0.5 mg/kg amphotericin B treatment ($P < 0.05$; Figure 1B). Histological examination showed liquefactive necrosis and cell infiltration in the brain of the beta-lapachone and amphotericin-B groups, but less intense than observed in the brain slides of the PBS group (Figure 1C). On the other hand, 4 of 10 mice from the beta-lapachone group died during the experiments against 1 of 10 in the other groups.

Leukocyte cell counts in beta-lapachone-treated mice

As expected, the total and differentiated cell counts showed a decrease after 14 days of infection (except for monocyte counts, which remained the same as during the first week) because of dexamethasone administration (Table 1). There were no differences

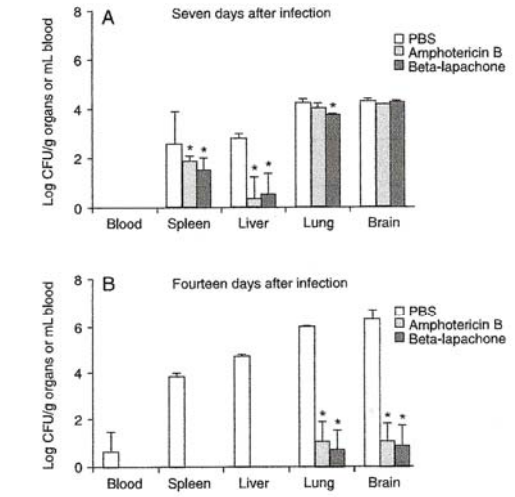

Figure 1. Protective effect of beta-lapachone administration in immunosuppressed Swiss mice challenged with *Cryptococcus neoformans* URM5811. Seven days after infection, mice were treated daily with PBS, 10 mg/kg beta-lapachone or 0.5 mg/kg amphotericin B for 7 (A) or 14 days (B). *$P < 0.05$ compared to the PBS group (*t*-test and ANOVA). The histological damage in the brain 14 days thereafter is shown in Panel C. Liquefactive and coagulative necrosis are indicated by white and black stars, respectively. The arrow indicates inflammatory infiltrates near the lesion.

Table 1. Leukocyte cell counts in dexamethasone-immunosuppressed mice infected with *Cryptococcus neoformans* strain URM5811 and treated with beta-lapachone.

Animal groups	Total leukocyte counts/mL blood		Segmented		Monocytes		Lymphocytes	
	7 days*	14 days	7 days*	14 days	7 days*	14 days	7 days*	14 days
PBS	2666 ± 152.75	2166 ± 173.20	230 ± 61.33	118 ± 32.5	165 ± 4.2	172 ± 41.05	2309 ± 95.44	1913 ± 131.16
Amphotericin B	2680 ± 208.16	2255 ± 224.22	237 ± 58.55	148 ± 36.16	151 ± 35.26	178 ± 29.86	2312 ± 118.76	1973 ± 239.15
Beta-lapachone	2700 ± 200.0	2133 ± 163.29	218 ± 59.57	106 ± 12.67	162 ± 48.81	152 ± 15.13	2320 ± 132.89	1875 ± 163.83

*$P < 0.05$, 7 days compared to 14 days of treatment per cell group (ANOVA).

in the cell counts of the different groups.

Discussion

In the present study, a reliable infection model for experimental cryptococcosis was developed to investigate the ability of the naphthoquinone beta-lapachone to control the disease. However, the lack of pharmacokynetic studies of this drug makes it impossible to anticipate its antifungal properties or toxicity *in vivo*. Previously, Pereira et al. (8) reported that beta-lapachone was toxic to eukariotic BSC-40 African green monkey kidney cell cultures at concentrations higher than 2 mg/L. Furthermore, one study reported *in vivo* toxic effects of beta-lapachone in immunocompetent rats (14). Our data show that beta-lapachone at 10 mg/kg was not notably toxic after 1 week of daily exposure, supporting its use in a *C. neoformans* infection model. In addition, treatment with beta-lapachone reduced the *C. neoformans* population 10,000 times in the lungs and brain and cleared the yeast from the spleen and liver, suggesting that long-term treatment could enhance sterilization in all organs. This protective effect was confirmed by histological examination, which showed that organ damage was less intense than in the PBS group. Conversely, we attributed the animals' death in the beta-lapachone group to some progressively toxic side effect of this drug, since these animals were not especially susceptible to disease, having leukocyte cell counts similar to those of the PBS and amphotericin B groups.

Howland (15) reported that the mechanisms of action of naphthoquinone seem to involve uncoupling oxidative phosphorylation and/or inhibition of cell electron transport. In addition, beta-lapachone increases superoxide anions and hydrogen peroxides, inducing cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi* (7). On the other hand, natural control of *C. neoformans* infection is due to the immune system and depends on T cell activation in resistant mouse strains (16). Although the mechanism of action of beta-lapachone against cryptococcosis remains unclear, it appears not to be related to activation of the immune system, which could enhance organ clearance. This idea was corroborated by the immune status of Swiss mice during the present experiments, since dexamethasone is known to abrogate B and T cell activation, thereby substantially decreasing humoral and cellular immunity (17). Also, the influence of beta-lapachone on the inhibition of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase expression and attenuation of proinflammatory cytokines such as interleukin-1beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha have been recently reported (18).

Experimental treatments against disseminated cryptococcosis have been proposed by many investigators. For example, 10 mg/kg of the triazole SCH56592 significantly decreased the fungal burden of the lungs of laboratory animals, and administration of 4 mg/kg SPK-843, a new polyene, increased survival and reduced *C. neoformans* colonization in organs (19,20). The present study shows a prospective application of the naphtoquinone beta-lapachone for the management of disseminated cryptococcosis. Although this drug possibly produced localized toxic effects, different dosages and new treatment schedules could be employed. In addition, we believe that beta-lapachone has a protective effect directly against *C. neoformans* cells. These mechanisms of action are under investigation by our research group.

Acknowledgments

We thank MSc. Maria Helena Madruga Lima Ribeiro (Lika/UFPE) for providing the animals used in this study. The authors thank CNPq for research funding. J.V. Lima-Filho was the recipient of a scholarship from the Programa de Educação Tutorial (PET-MEC/SESu).

References

1. Perfect JR, Casadevall A. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am* 2002; 16: 837-874.
2. Barbosa FM, Fonseca FL, Holandino C, Alviano CS, Nimrichter L, Rodrigues ML. Glucuronoxylomannan-mediated interaction of *Cryptococcus neoformans* with human alveolar cells results in fungal internalization and host cell damage. *Microbes Infect* 2006; 8: 493-502.
3. Chen SH, Stins MF, Huang SH, Chen YH, Kwon-Chung KJ, Chang Y, et al. *Cryptococcus neoformans* induces alterations in the cytoskeleton of human brain microvascular endothelial cells. *J Med Microbiol* 2003; 52: 961-970.
4. Chakrabarti A. Epidemiology of central nervous system mycoses. *Neurol India* 2007; 55: 191-197.
5. van der Horst CM, Saag MS, Cloud GA, Hamill RJ, Graybill JR, Sobel JD, et al. Treatment of cryptococcal meningitis associated with the acquired immunodeficiency syndrome. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group and AIDS Clinical Trials Group. *N Engl J Med* 1997; 337: 15-21.
6. Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Salvatore G, Cassone A. *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic yeasts. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 1223-1229.
7. Salas C, Tapia RA, Ciudad K, Armstrong V, Orellana M, Kemmerling U, et al. *Trypanosoma cruzi*: activities of lapachol and alpha- and beta-lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. *Bioorg Med Chem* 2008; 16: 668-674.
8. Pereira EM, Machado TB, Leal IC, Jesus DM, Damaso CR, Pinto AV, et al. *Tabebuia avellanedae* naphthoquinones: activity against methicillin-resistant staphylococcal strains, cytotoxic activity and *in vivo* dermal irritability analysis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2006; 5: 5.
9. Blanco E, Bey EA, Dong Y, Weinberg BD, Sutton DM,

Boothman DA, et al. Beta-lapachone-containing PEG-PLA polymer micelles as novel nanotherapeutics against NQO1-overexpressing tumor cells. *J Control Release* 2007; 122: 365-374.
10. Guiraud P, Steiman R, Campos-Takaki GM, Seigle-Murandi F, Simeon de BM. Comparison of antibacterial and antifungal activities of lapachol and beta-lapachone. *Planta Med* 1994; 60: 373-374.
11. Cavalcante FA, Silva JLV, Carvalho VMN, Camara CA, Silva TM, Pinto AC, et al. Spasmolytic activity of lapachol and its derivatives, alpha and beta-lapachone, on the guinea-pig ileum involves blockade of voltage-gated calcium channels. *Rev Bras Farmacog* 2008; 18: 183-189.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard M27-A3. CLSI.* 3rd edn. Villanova: NCCLS; 2002.
13. Capilla J, Maffei CM, Clemons KV, Sobel RA, Stevens DA. Experimental systemic infection with *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* in normal and immunodeficient mice. *Med Mycol* 2006; 44: 601-610.
14. Santana CF, Lima OG, D'Albuquerque IL, Lacerda AL, Martins DG. Observações sobre as propriedades antitumorais e toxicológicas do extrato do líber e de alguns componentes do cerne do Pau d'arco (*Tabebuia avellanedae*). *Rev Inst Antib* 1968; 8: 89-94.
15. Howland JL. The reversibility of inhibition by 2-heptyl-4-hydroxyquinoline-n-oxide and 2-hydroxy-3(3-methylbutyl)-1,4-naphthoquinone of succinate oxidation. *Biochim Biophys Acta* 1963; 73: 665-667.
16. Schop J. Protective immunity against *Cryptococcus neoformans* infection. *Mcgill J Med* 2007; 10: 35-43.
17. Franchimont D, Galon J, Gadina M, Visconti R, Zhou Y, Aringer M, et al. Inhibition of Th1 immune response by glucocorticoids: dexamethasone selectively inhibits IL-12-induced Stat4 phosphorylation in T lymphocytes. *J Immunol* 2000; 164: 1768-1774.
18. Moon DO, Choi YH, Kim ND, Park YM, Kim GY. Anti-inflammatory effects of beta-lapachone in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. *Int Immunopharmacol* 2007; 7: 506-514.
19. Hossain MA, Maesaki S, Mitsutake K, Kakeya H, Sasaki E, Tomono K, et al. *In-vitro* and *in-vivo* activities of SCH56592 against *Cryptococcus neoformans*. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 827-829.
20. Kakeya H, Miyazaki Y, Senda H, Kobayashi T, Seki M, Izumikawa K, et al. Efficacy of SPK-843, a novel polyene antifungal, in a murine model of systemic cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 1871-1872.

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Ofício nº 07/08 Recife, 04 de janeiro de 2008

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: **Profa. Rejane Pereira Neves**
Departamento Micologia Médica - UFPE
Processo nº 013968/2007-01

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram a resposta de V. Sa. referente ao primeiro parecer da CEEA sobre o projeto de pesquisa intitulado **"Criptococose experimental e efeito de drogas antifúngicas"**.

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,

Prof. Silene Carneiro do Nascimento
UFPE
Presidente CEEA