

Características histomorfológicas e histoquímicas determinantes no diagnóstico da criptococose em animais de companhia¹

Glaucio J.N. Galiza², Taiara M. Silva³, Rafaela A. Caprioli³, Camila Tochetto², Fábio B. Rosa², Rafael A. Fighera⁴ e Glauca D. Kommers^{4*}

ABSTRACT- Galiza G.J.N., Silva T.M., Caprioli R.A., Tochetto C., Rosa F.B., Fighera R.A. & Kommers G.D. 2014. [Determining histomorphological and histochemical characteristics in the diagnosis of cryptococosis in companion animals.] Características histomorfológicas e histoquímicas determinantes no diagnóstico da criptococose em animais de companhia. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 34(3):261-269. Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: glaukommers@yahoo.com

Seven cases of cryptococosis (six cats and one dog) were studied to establish the determining histomorphological and histochemical characteristics in the histopathological diagnosis of this condition. Additional data related to the epidemiology, clinical aspects, sites of the lesions, and gross findings were obtained from the necropsy and biopsy protocols. Histologically, yeasts were observed inside macrophages or free in the parenchyma, associated with scarce to severe lymphohistioplasmacytic inflammatory reaction. In the hematoxylin-eosin (HE) sections, the yeasts were round, with a central cell containing a nucleus, surrounded by a clear halo (usually non-stained capsule). The techniques of periodic Schiff acid (PAS), Grocott (GMS), and Fontana-Masson (FM) were utilized and demonstrated the wall of the yeast cells. The FM stain showed the melanin present in these cells. The Alcian blue and Mayer's mucicarmine stains showed mainly the yeast polysaccharide capsule. The diameter of the cells ranged from 1.67 to 10.00µm and the full diameter of the encapsulated yeasts varied between 4.17 e 34.16µm. Yeast buddings were better observed through the PAS stain and were narrow based, simple or multiple, mainly in the opposite poles of the cells or forming chains. The definitive diagnosis of cryptococosis was established through the histopathological exam, based on the specific morphology of the agent (encapsulated yeast) and on histochemical properties, mostly in the cases without fungal culture.

INDEX TERMS: Fungal infections, *Cryptococcus* spp., cryptococosis, histomorphology, histochemistry, veterinary pathology, cats, dog.

RESUMO.- Sete casos de criptococose (seis gatos e um cão) foram estudados para estabelecer as características histomorfológicas e histoquímicas determinantes no diagnóstico

histopatológico dessa condição. Os dados complementares relacionados à epidemiologia, aos aspectos clínicos, à localização das lesões e às alterações macroscópicas foram obtidos dos protocolos de necropsias e biópsias. Na histologia, as leveduras foram observadas no interior de macrófagos ou livres no parênquima, associadas à reação inflamatória linfo-histioplasmocítica que variou de escassa a acentuada. Pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) as leveduras eram arredondadas, com célula central contendo um núcleo, circundada por um halo claro (cápsula geralmente não corada). As técnicas histoquímicas do ácido periódico de Schiff (PAS), Grocott e Fontana-Masson (FM) foram utilizadas e evidenciaram a parede das células das leveduras. Pelo FM observou-se a melanina presente nessas células. As téc-

¹ Recebido em 4 de dezembro de 2013.

Aceito para publicação em 6 de março de 2014

Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor.

² Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia e Patologia Clínica Veterinária, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil.

³ Curso de Medicina Veterinária, CCR-UFSM, Santa Maria, RS.

⁴ Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, UFSM, Santa Maria, RS. *Autor para correspondência: glaukommers@yahoo.com

nicas do azul Alciano e da mucicarmina de Mayer evidenciaram principalmente a cápsula polissacarídica das leveduras. O diâmetro das células das leveduras variou de 1,67 a 10,00µm e o diâmetro total das leveduras encapsuladas variou entre 4,17 e 34,16µm. Os brotamentos foram melhor visualizados através do PAS e ocorreram em base estreita, de forma única ou múltipla, principalmente em polos opostos das células das leveduras ou formando uma cadeia. O diagnóstico definitivo de criptococose foi estabelecido através do exame histopatológico, baseando-se na morfologia característica do agente (levedura encapsulada) e em suas propriedades tintoriais (histoquímicas), principalmente nos casos em que a cultura micológica não foi realizada.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Infecções fúngicas, *Cryptococcus* spp., criptococose, histomorfologia, histoquímica, patologia veterinária, felinos, canino.

INTRODUÇÃO

Criptococose é a micose sistêmica mais comum no gato, mas que também afeta cães, cavalos, bovinos e muitas outras espécies animais, além de humanos (Caswell & Williams 2007). As duas espécies associadas com a doença em humanos e animais são *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*. Essas duas espécies apresentam diferenças com relação ao habitat natural, à epidemiologia, às características fenotípicas, às manifestações clínicas e à resposta a terapia antifúngica (Sorrel 2001, Bovers et al. 2008). A criptococose não é considerada uma doença zoonótica ou uma antropozoonose, tendo em vista que *Cryptococcus* spp. não podem se disseminar no ambiente a partir de lesões no tecido (Malik et al. 2006). No entanto, casos descritos em humanos e em animais podem resultar de uma fonte ambiental comum (Malik et al. 2006, MacDougall et al. 2007).

Cryptococcus spp. são fungos pertencentes à classe Blastomycetes, que no tecido animal e em condições ideais de laboratório, apresentam-se em forma de leveduras com uma cápsula polissacarídica mucoide (Castellá et al. 2008). Quatro sorotipos são descritos, sendo os sorotipos A e D pertencentes a *C. neoformans* var. *neoformans*, *C. neoformans* var. *grubii*, respectivamente, e os sorotipos B e C pertencentes a *C. gattii* (Bovers et al. 2008, Guarner & Brandt 2011). Alguns isolados possuem características de ambos os sorotipos A e D, e têm sido classificados como um quinto sorotipo, o sorotipo híbrido AD (Sorrel 2001). *C. neoformans* apresenta distribuição cosmopolita, sendo frequentemente isolado de excretas dessecadas de aves, especialmente pombos urbanos (Farias & Xavier 2009). *C. gattii* é encontrado principalmente em áreas de plantações de eucalipto em climas tropicais (Caswell & Williams 2007, MacDougall et al. 2007, Datta et al. 2009).

No Brasil há relatos de *C. neoformans* e *C. gattii* isolados em áreas urbanas e de mata, assim como casos clínicos em humanos (Côrrea et al. 1999, Severo et al. 1999, Montenegro & Paula 2000, Fortes et al. 2001) e animais (Kommers et al. 2005, Martins et al. 2008, 2010, Riet-Correa et al. 2011). A infecção ocorre principalmente pelo trato respiratório, através da inalação de leveduras ou basidiósporos e as lesões ocorrem principalmente na cavidade nasal e nos pul-

mões (Castellá et al. 2008). A disseminação do fungo ocorre via hematogênica para o encéfalo, os olhos, a pele e outros órgãos (Rodrigues et al. 1999, Farias & Xavier 2009). No entanto, a infecção pode ocorrer na forma de lesões solitárias na pele ou no tecido subcutâneo, decorrentes de inoculação direta do agente (Malik et al. 2006, McGill et al. 2009).

A epidemiologia da criptococose depende diretamente da espécie envolvida, sendo *C. neoformans* o principal causador da doença em indivíduos imunocomprometidos (Rodrigues et al. 1999, Pappalardo & Melhem 2003). No entanto, *C. gattii*, além de afetar hospedeiros imunossuprimidos, causa a doença em indivíduos imunocompetentes (Duncan et al. 2006). Vários fatores de virulência são descritos para os fungos pertencentes ao gênero *Cryptococcus*. Dentre eles destacam-se: a cápsula mucinosa composta por polissacarídeos, que bloqueia a interação entre anticorpos e receptores da superfície de macrófagos; a produção de melanina e manitol, que apresentam atividades antioxidantes e favorecem o neurotropismo; e a capacidade de se desenvolver em temperaturas fisiológicas, em torno de 37°C (Kozel 1995, Rodrigues et al. 1999, Steenbergen & Casadevall 2003, Malik et al. 2006).

Infecções micóticas muitas vezes não apresentam alterações clínicas e lesões macroscópicas características que permitam um diagnóstico presuntivo (Kaufman 1992, Jensen et al. 1996), o qual possa ser confirmado pela cultura micológica, que é a técnica padrão-ouro (Lima et al. 1977). Consequentemente, o agente causal pode ser encontrado ou suspeitado somente durante o exame histopatológico dos tecidos afetados (Jensen et al. 1996). Nesses casos, o reconhecimento detalhado das características histomorfológicas e histoquímicas desses fungos constitui-se na principal ferramenta de diagnóstico etiológico. Com esse objetivo, foram analisados e discutidos os aspectos histomorfológicos e histoquímicos de sete casos de criptococose diagnosticados em animais de companhia no Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Aspectos clínico-epidemiológicos também foram apresentados.

MATERIAL E MÉTODOS

Sete casos de criptococose (seis gatos e um cão), diagnosticados no LPV-UFSM, foram selecionados para este estudo. Avaliaram-se os dados epidemiológicos (incluindo raça, sexo e idade), sinais clínicos, alterações macroscópicas e histológicas descritas nos protocolos de necropsias (quatro casos; Felinos 1-3 e Canino 1) ou de exames histopatológicos a partir de biópsias (três casos; Felinos 4-6). Os espécimes provenientes de necropsias ou biópsias haviam sido fixados em formol a 10% e processados rotineiramente para histopatologia. Seções de 3µm, coradas pela hematoxilina e eosina (HE), foram avaliadas visando principalmente classificar e quantificar a resposta inflamatória em cada caso e nos diferentes órgãos afetados. Utilizaram-se também técnicas histoquímicas como a impregnação pela prata de Grocott (GMS), ácido periódico de Schiff (PAS), azul Alciano (AA), mucicarmina de Mayer (MM) e Fontana-Masson (FM). As imagens e as dimensões das leveduras (incluindo a célula da levedura, a espessura da cápsula e o diâmetro total da levedura) foram obtidas através de um microscópio Olympus BX51, com câmera digital DP21, controlada pelo programa Olympus CellSens®.

RESULTADOS

A epidemiologia, os sinais clínicos e o desfecho dos casos analisados encontram-se no Quadro 1 e a localização das lesões e as alterações macroscópicas observadas nas necropsias e nos tecidos obtidos de biópsias encontram-se no Quadro 2. Dos sete casos estudados, somente em dois (Felinos 1 e 3) houve suspeita clínica de criptococose. No Felino 1 foi enviado material para cultura micológica, sendo cultivado *Cryptococcus neoformans*. Nos demais casos não houve suspeita clínica de criptococose e o diagnóstico definitivo foi realizado com base nas alterações histológicas, pela demonstração do agente e de suas características através de diversas técnicas histoquímicas.

Na coloração de HE as leveduras de *Cryptococcus* sp. estavam associadas a infiltrado inflamatório constituído predominantemente por macrófagos (com citoplasma abundante), linfócitos e plasmócitos. A intensidade da reação inflamatória variou conforme o tecido analisado. Resumidamente, na pele a reação foi moderada a acentuada, na faringe acentuada, nos linfonodos leve a acentuada, no rim, no encéfalo e no cerebelo variou de ausente a moderada, nos pulmões foi leve e no fígado ausente.

Nos casos em que havia acentuada reação inflamatória as leveduras podiam ser visualizadas principalmente no citoplasma de macrófagos e raramente livres no tecido. No citoplasma de macrófagos as leveduras ocorreram de forma única ou em grupos. Em casos com reação inflamatória leve as leveduras eram observadas formando aglomerados que, por vezes, eram circundados por escasso infiltrado inflamatório linfo-histiocítico. Em lesões cutâneas ulceradas, além do infiltrado linfo-histiocítico, havia moderado infiltrado inflamatório neutrofilico subjacente às úlceras.

O aspecto morfológico característico e as propriedades tintoriais padrão estão ilustrados na Figura 1 (A-F). As leveduras de *Cryptococcus* sp. eram arredondadas, compostas por um halo claro, que geralmente não corou pelo HE (cápsula da levedura), circundando uma estrutura levemente basofílica, que era redonda, levemente alongada ou, às vezes, em forma de foice (célula da levedura). No interior de algumas células era possível observar material granular, por vezes arredondado, levemente eosinofílico (núcleo da

célula da levedura). As cápsulas das leveduras tinham diferentes espessuras e, por não corarem, conferiam ao tecido um aspecto vacuolizado, conhecido como “lesão em bolha de sabão” (Fig.1A).

O tamanho das leveduras de *Cryptococcus* sp. e as propriedades histoquímicas do fungo estão resumidos no Quadro 3. O diâmetro das células das leveduras variou de 1,67 a 10µm. A espessura da parede celular variou de 0,17 a 1,18µm.

A cápsula das leveduras foi evidenciada pelas técnicas histoquímicas de AA e MM. Na coloração de AA, a cápsula apresentava-se fortemente azulada e com aspecto radiado (Fig.1B). A espessura da cápsula apresentou variações de acordo com a localização da levedura no tecido em alguns casos. A cápsula era mais delgada em leveduras visualizadas no citoplasma de macrófagos (variando de 0,94 a 7,41µm), enquanto que leveduras livres nos tecidos apresentavam cápsulas mais abundantes (1,87 a 11,34µm). O diâmetro total das leveduras (incluindo a cápsula) variou de 4,17 a 34,16µm. Além da cápsula, a parede das células das leveduras era, muitas vezes, fortemente corada por essas duas técnicas. Raras leveduras não apresentavam coloração na cápsula pelo AA e pelo MM e a parede apresentava-se levemente azulada no AA. Pela MM a cápsula apresentou aspecto radiado, semelhante ao descrito no AA (Fig.1C). Em algumas leveduras as células eram circundadas por material levemente avermelhado e a parede das células era fortemente corada.

As cápsulas de raras leveduras coraram-se levemente na coloração de HE (Felinos 2, 4, 6 e Canino 1) e apresentaram aspecto levemente radiado basofílico (Fig.2A). No PAS (Felinos 2, 5, 6 e Canino 1) a cápsula de poucas leveduras apresentou aspecto radiado com coloração rósea (Fig.2B).

As células das leveduras coraram fortemente pelo PAS e foram fortemente impregnadas pela prata no GMS. No PAS, a parede das células era fortemente positiva, apresentando coloração rósea com bordos levemente mais corados (Fig.1D). Em algumas leveduras era possível observar núcleos no interior das células.

Os brotamentos foram melhor visualizados no PAS do que no HE e ocorreram em base estreita, principalmente

Quadro 1. Dados epidemiológicos, sinais clínicos e desfecho de casos de criptococose em felinos e um canino

Espécie	Animal (nº)	Raça	Sexo	Idade (anos)	Sinais clínicos	Desfecho
Felina	1*	SRD	M	2	Linfadenopatia submandibular	EUT
	2	Persa	F	5	bilateral, disfagia e dispneia	Tosse ME
	3	SRD	F	1,7	Emagrecimento acentuado	ME
	4	SRD	F	NI	Anorexia, abdômen abaulado, sinais neurológicos	ME
	5	SRD	M	2	Lesão no dígito do membro pélvico esquerdo	NI
	6	SRD	M	NI	Feridas ulceradas em cabeça, pescoço, região periorbital, comissura labial e membros	NI
Canina	1	Labrador	M	1	Anorexia, incoordenação motora e cegueira	ME

* Foi isolado *Cryptococcus neoformans* na cultura micológica dos linfonodos; SRD = sem raça definida; M = macho; F = fêmea; NI = não informado. ME = morte espontânea; EUT = eutanásia.

Quadro 2. Localização e macroscopia das lesões em casos de criptococose em felinos e um canino

Espécie	Animal (n ^o)	Localização das lesões	Macroscopia
Felina	1	Linfonodos, palato mole e faringe	Massas brancoacinentadas
	2	Coração, linfonodos, baço, pulmões, língua, fígado, rins e cerebelo	Linadenomegalia com superfície esbranquiçada, exsudato fibrinopurulento nos seios nasais, pulmões consolidados e pálidos. Úlceras no palato mole e nódulos na língua. Nódulos esbranquiçados nos rins
	3	Pele, fígado, baço, pulmão, encéfalo e linfonodos	Nódulos ulcerados na pele da cabeça, membros e regiões torácica e abdominal. Linadenomegalia com superfície esbranquiçada
	4	Rim e pulmão	Áreas esbranquiçadas e circulares no rim
	5	Pele	Sem descrição
	6	Pele	Pele hirsuta com crostas
Canina	1	Encéfalo	Sem alteração

de forma única, mas também múltipla, em polos opostos das células das leveduras ou formando cadeias (Fig.3A-D). No GMS apenas a parede da célula das leveduras apresentou forte impregnação enegrecida (Fig.1E). Não foram observadas diferenças tintoriais entre as células de tamanho grande e pequeno ou com cápsula (não corada) abundante ou escassa.

Na coloração de FM, todos os casos apresentaram forte evidência da melanina na parede das células das leveduras (Fig.1F). A intensidade da coloração variou de marrom-acinzentada a enegrecida. Independentemente do tamanho das células e da quantidade de cápsula, todas as paredes foram positivas para melanina.

Além de permitirem uma melhor visualização dos componentes estruturais das leveduras, sejam eles a cápsula ou a célula, as colorações de PAS, GMS, AA, MM e FM facilitaram a visualização da invasão/disseminação do agente em diversos órgãos e tecidos.

Em três casos foram observadas alterações nos aspectos morfológicos e histoquímicos padrão das leveduras. Em dois casos com lesões cutâneas (Felinos 5 e 6) as leveduras apresentavam uma grande quantidade de células pequenas (“células filhas”), com diâmetro que variou de 1,03 a 2,27µm. As células filhas eram visualizadas no interior do mesmo halo da célula mãe e muitas vezes eram visualizadas mais de uma célula filha. Nesses dois casos, a grande maioria das leveduras estava no citoplasma de macrófagos, eram eosinofílicas e tinham núcleos abundantes, que, por vezes, ocupavam quase toda a célula (Fig.4A). No AA e na MM essas leveduras apresentavam pouca cápsula e parede fortemente corada (Fig.4B). A parede das células filhas também era positiva no PAS, no GMS e no FM.

Em um caso com envolvimento pulmonar (Felino 2), algumas leveduras localizadas em áreas de hemorragia apresentaram-se com células grandes de parede acentuadamente espessa e eosinofílica (Fig.5A). Em algumas era possível identificar três padrões de coloração: um halo interno levemente basofílico, seguido de uma camada fortemente eosinofílica e bordos basofílicos a anofílicos. A espessura da parede variou de 0,66 a 3,06µm. Nas colorações de AA e MM essas leveduras apresentavam cápsula fortemente corada (Fig.5B) e a parede espessa apenas corada pela contracoloração. No PAS a parede apresentou halo central intensamente corado circundado por uma camada levemente violácea. No GMS e no FM apenas a célula apresentou-se enegrecida e a camada circundante corou-se

apenas com as contracolorações de cada técnica (verde e rosa, respectivamente) (Fig.5C,D). Nas áreas adjacentes a hemorragia nos pulmões e nos demais órgãos não foi observado esse espessamento da parede da célula.

DISCUSSÃO

A dificuldade na formulação de um diagnóstico presuntivo de criptococose pode estar diretamente associada à diversidade na sua apresentação clínica e na distribuição das lesões (Faria & Xavier 2009), como visto nos casos aqui estudados. Na maioria desses casos os sinais clínicos foram inespecíficos e não permitiram um direcionamento no diagnóstico. Os achados macroscópicos, bem como a distribuição das lesões em diversos órgãos, muitas vezes mimetizaram alterações neoplásicas, dificultando o diagnóstico presuntivo de criptococose. O diagnóstico definitivo foi realizado com base nas alterações histopatológicas em seis dos sete casos, pois somente em um gato foi realizada a cultura micológica. Situação semelhante tem sido descrita por outros autores em infecções micóticas que, muitas vezes, não apresentam alterações clínicas características que permitam um diagnóstico presuntivo (Kaufman 1992, Jensen et al. 1996), seguido da ausência de cultura micológica, que é a técnica padrão-ouro (Lima et al. 1977), e que permite a identificação definitiva do agente etiológico. Consequentemente, o agente causal de doenças micóticas (e oomicóticas) pode ser encontrado ou suspeitado somente durante o exame histopatológico dos tecidos afetados (Jensen et al. 1996). Nesses casos, nos quais não é possível a cultura e a identificação do fungo, o reconhecimento das características morfológicas e histoquímicas das leveduras de *Cryptococcus* spp. são as principais ferramentas de diagnóstico (Guarner & Brandt 2011). Neste estudo, essas características morfológicas e histoquímicas das leveduras foram semelhantes nos casos sem cultura e no caso com cultura bem sucedida.

No exame histopatológico, o padrão morfológico do fungo observado neste estudo foi semelhante ao descrito por outros autores (Malik et al. 2006, Faria & Xavier 2009, Guarner & Brandt 2011). Em todos os casos as leveduras apresentavam uma célula central, com presença de um núcleo, circundada por uma cápsula espessa (polissacarídica) que geralmente não se corava pelo HE. Esse padrão morfológico das leveduras de *Cryptococcus* spp. tem sido descrito como característico por diversos autores (Bose et al. 2003, McFadden et al. 2006, Okagaki et al. 2010, Guarner & Brandt 2011, Kronstad et al. 2011).

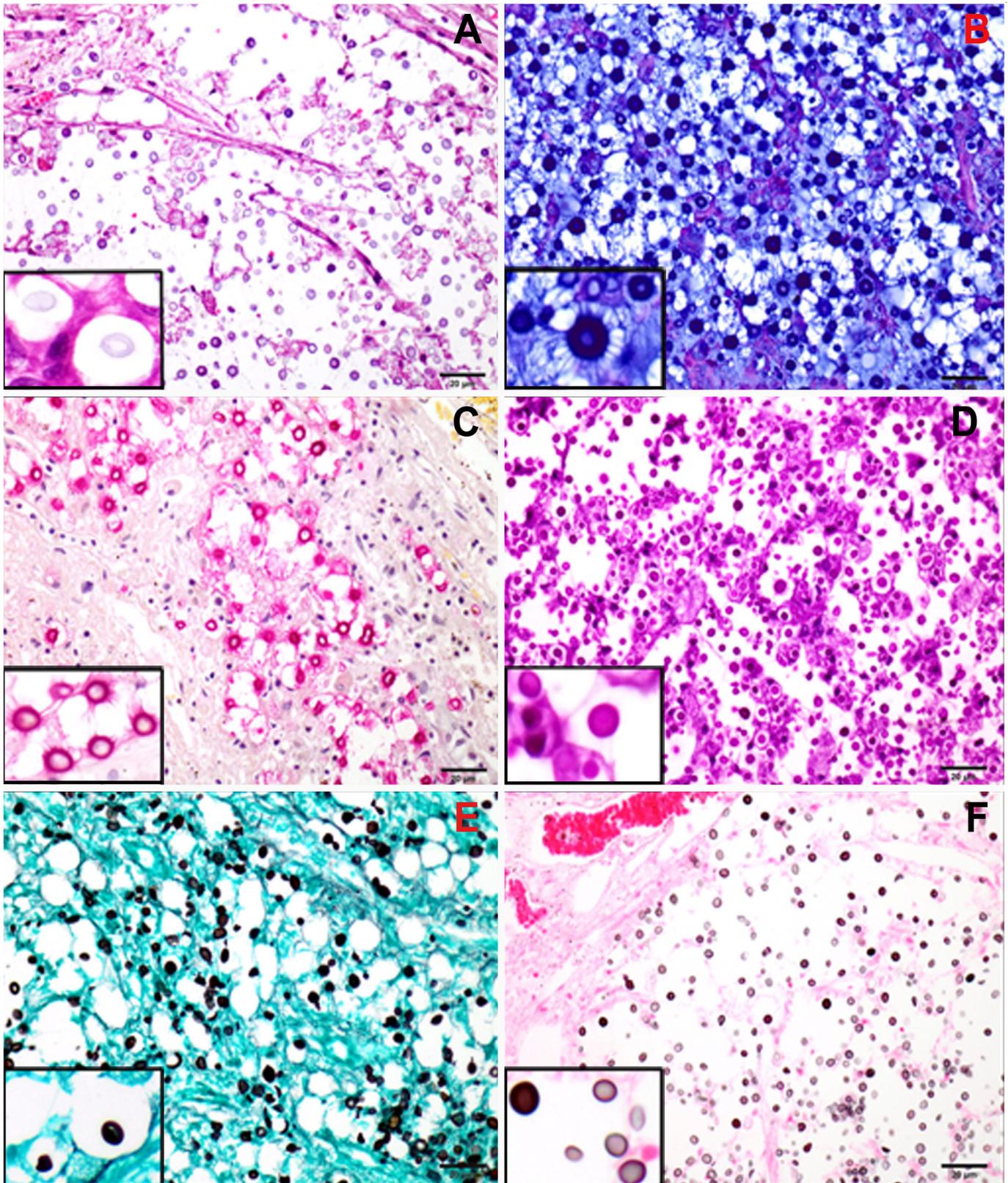


Fig.1. Criptococose em caninos e felinos. (A) Leveduras de *Cryptococcus* sp. arredondadas com célula central circundada por uma cápsula que não se cora, conferindo ao tecido um aspecto de "lesão em bolha de sabão". No detalhe a célula da levedura levemente basofílica circundada por uma cápsula espessa não corada (hematoxilina e eosina). (B) Leveduras fortemente coradas em azul. No detalhe a levedura apresentou cápsula com aspecto radiado externamente e parede fortemente corada (azul Alciano). (C) Leveduras fortemente coradas em vermelho. No detalhe a levedura apresentou cápsula com aspecto radiado externamente e parede fortemente corada (mucicarmina de Mayer). Somente as células das leveduras coraram fortemente nas colorações do ácido periódico de Schiff (D), Grocott (E) e Fontana-Masson (F). Barra = 20µm.

Quadro 3. Tamanho e propriedades histoquímicas das leveduras em casos de criptococose em felinos e um canino

Espécie (n ^o)	Diâmetro (µm)		Histoquímica											
	Levedura*	Célula	HE		AA		MM		PAS		GMS		FM	
			CE	CA	CE	CA	CE	CA	CE	CA	CE	CA	CE	CA
Felina														
1	5,50-7,82	2,00-4,64	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
2	5,99-34,16	2,22-5,23	+	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+	-	+	-
3	6,72-21,11	2,55-5,23	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
4	16,33-23,70	4,78-10,00	+	+/-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
5	5,19-7,58	2,64-3,71	+	-	+	+	+	+	+	+/-	+	-	+	-
6	4,17-18,95	2,16-8,67	+	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+	-	+	-
Canina														
1	13,77-22,98	1,67-7,28	+	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+	-	+	-

* Compreende célula + cápsula polissacarídica. CE = célula da levedura; CA = cápsula da levedura; HE = hematoxilina e eosina; AA = azul Alciano; MM = mucicarmina de Mayer; PAS = ácido periódico de Schiff; GMS = Grocott; FM = Fontana-Masson; (+) positiva; (+/-) raras estruturas fracamente positivas; (-) negativas.

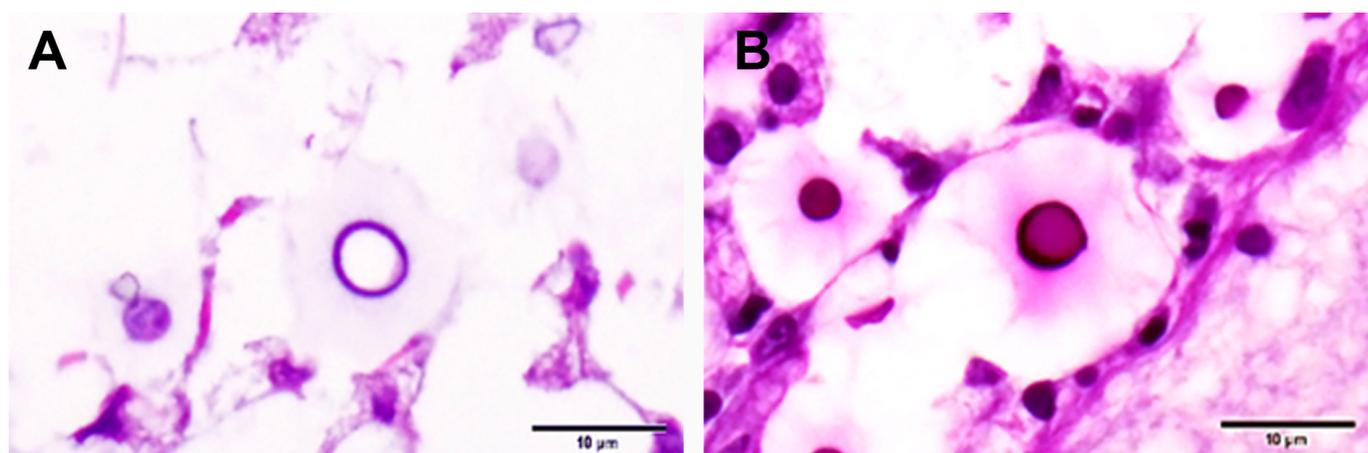


Fig.2. Criptococose em caninos e felinos. Levedura de *Cryptococcus* apresentou (A) leve coloração basofílica radiada na cápsula na coloração de hematoxilina e eosina e (B) rósea na coloração de ácido periódico de Schiff. Barra = 10µm.

Variações no tamanho da célula das leveduras, na espessura da cápsula e no diâmetro total das leveduras podem ser associadas à infecção por sorotipos diferentes. Estudos realizados em casos de criptococose humana e infecções experimentais em animais têm também demonstrado variações na espessura da cápsula, na parede e no diâmetro da célula das leveduras de acordo com o órgão analisado e o tempo de infecção (Feldmesser et al. 2001, Del Poeta 2004, Charlier et al. 2005, Xie et al. 2012). Diversos autores têm sugerido que o espessamento da cápsula ocorre principalmente em leveduras maduras devido à adição de novos polissacarídeos e nanoproteínas à estrutura pré-existente (Charlier et al. 2005, McFadden et al. 2006). Apesar de haver variação na espessura da cápsula das leveduras nos casos de criptococose deste estudo, não foram observadas leveduras totalmente sem cápsula. Em alguns pacientes humanos as leveduras de *Cryptococcus* spp. podem apresentar-se pouco (Guarner & Brandt 2011) ou não encapsuladas (Gazzoni et al. 2008), tornando-as semelhantes a *Candida* spp. ou *Histoplasma* spp. A coloração positiva para melanina identifica que as leveduras são de *Cryptococcus* spp. em situações como essa (Guarner & Brandt 2011).

O tamanho das leveduras variou de acordo com a sua localização. Leveduras menores foram observadas, na sua

grande maioria, no interior de macrófagos, enquanto que leveduras maiores eram visualizadas principalmente livres no parênquima dos órgãos. Essa diferença na localização entre leveduras pequenas e grandes pode estar relacionada principalmente com relação a abundância de cápsula, tamanho da célula ou localização da levedura em determinados órgãos. Estudos têm demonstrado que leveduras menores e com pouca cápsula foram observadas principalmente no interior de macrófagos devido à facilidade de opsonização e formação de fagolisossomas no interior de macrófagos (Xie et al. 2012), enquanto que leveduras grandes, com cápsula abundante, eram observadas principalmente livres nos tecidos (Feldmesser et al. 2001, Okagaki et al. 2010).

A variação no tamanho da célula das leveduras é um achado constante nas infecções em humanos e em animais (Feldmesser et al. 2001, Okagaki et al. 2010, Xie et al. 2012). No entanto, neste estudo não foram observadas leveduras com células de tamanho gigante (denominadas “células titãs”), como descritas em alguns casos de criptococose com envolvimento pulmonar (em humanos e camundongos), as quais podem atingir até 100µm de diâmetro (Feldmesser et al. 2001, Okagaki et al. 2010).

Os brotamentos das leveduras, na sua maioria, apresentavam características morfológicas semelhantes às descri-

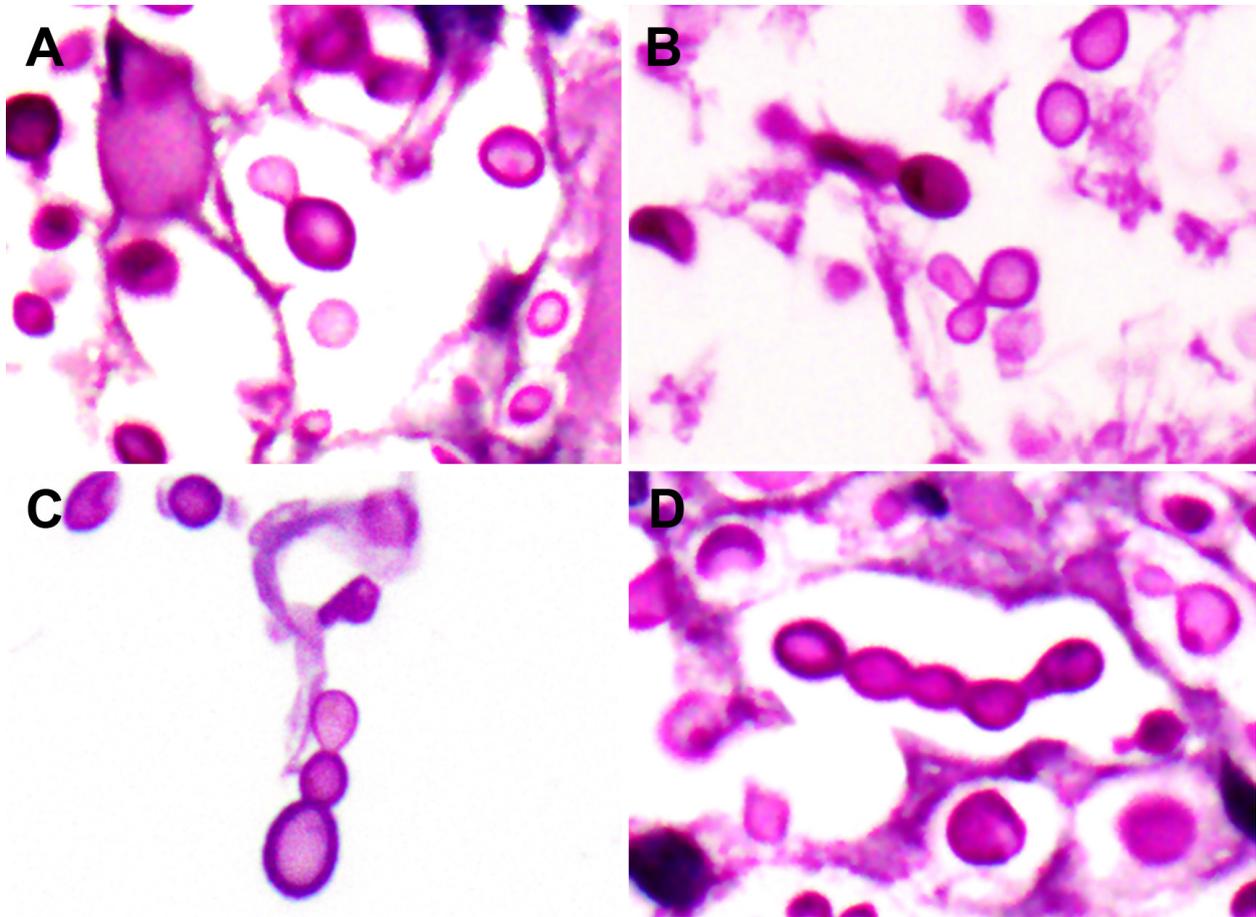


Fig.3. Criptococose em caninos e felinos. (A) Observa-se brotamento único em base estreita. (B) Uma célula com dois brotamentos. (C,D) Brotamentos em base estreita formando uma cadeia (ácido periódico de Schiff).

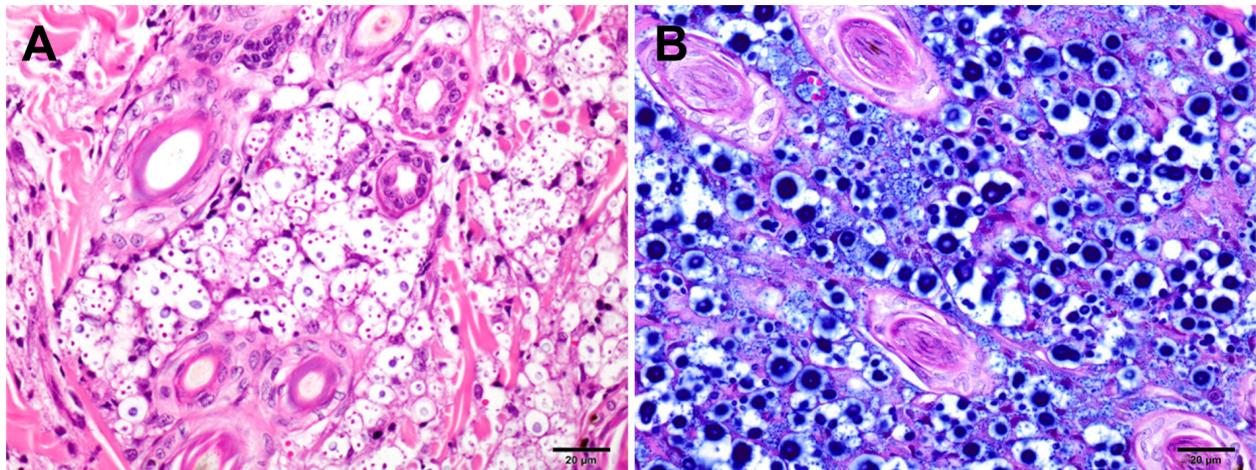


Fig.4. Criptococose cutânea em felinos. (A) Numerosas "células filhas" (células menores) próximas de uma "célula mãe" (células maiores) (hematoxilina e eosina). (B) A cápsula e a parede das células filhas e das células mães coraram-se fortemente na coloração de azul Alciano. Barra = 20µm.

tas por outros autores (McFadden et al. 2006, Guarner & Brandt 2011). No entanto, variações na quantidade de brotamentos e no ponto de origem na célula foram observadas em alguns casos. Em casos com brotamentos múltiplos, dando um aspecto em cadeia às leveduras, é fundamental realizar a diferenciação entre esse tipo de brotamento e infecções por fungos que podem apresentar-se como le-

veduras ou estruturas filamentosas nos tecidos, como *Candida* spp. (Guarner & Brandt 2011). *Cryptococcus* spp. apresentam forma filamentosa quando localizados no meio ambiente ou em condições especiais de cultura, associada à fase de reprodução sexuada (Bovers et al. 2008, Kronstad et al. 2011).

A abundância de células filhas observada nos casos de

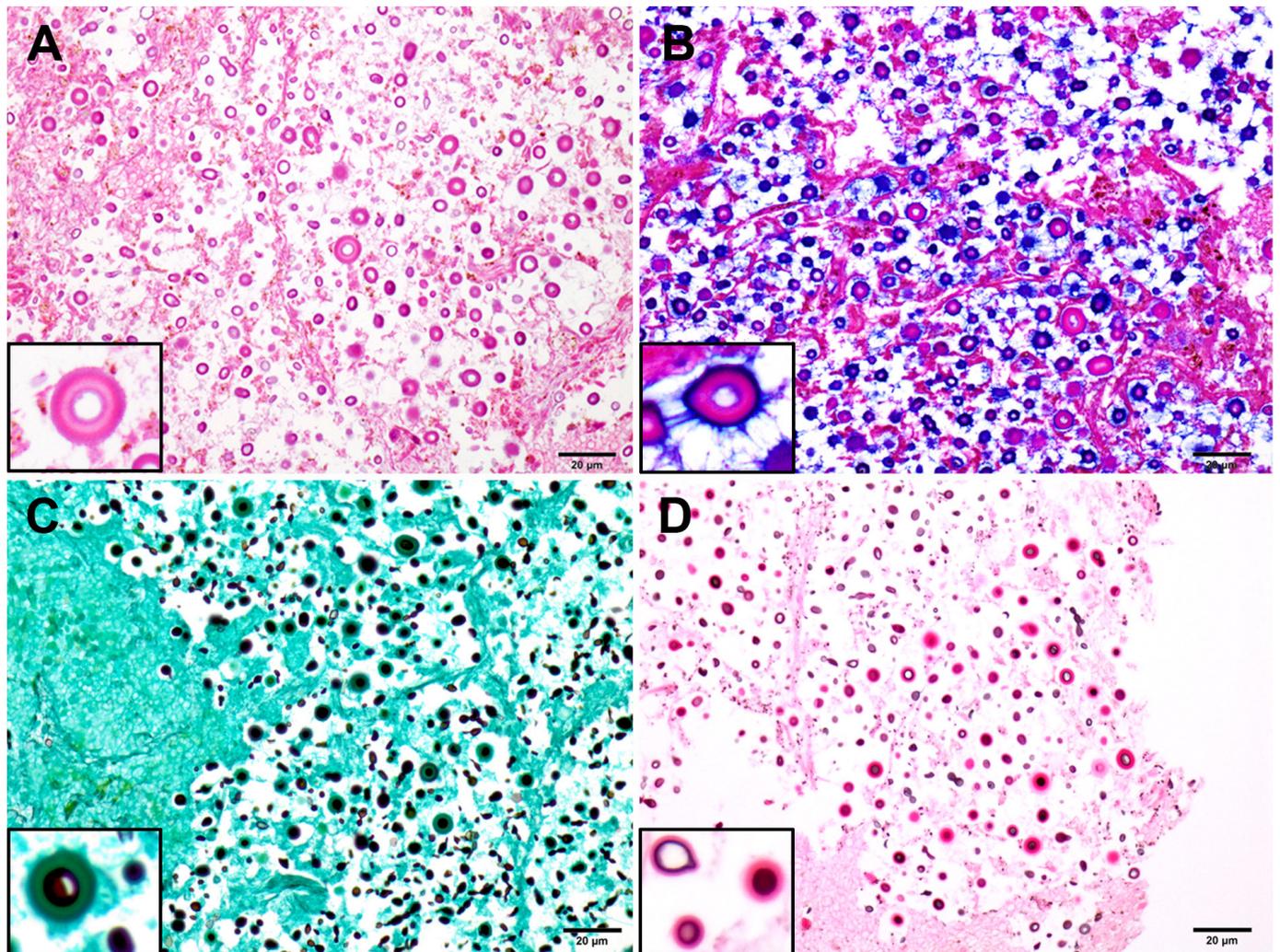


Fig.5. Criptococose pulmonar em um felino. (A) Leveduras apresentaram acentuado espessamento da parede da célula. No detalhe a parede da célula foi fortemente eosinofílica (hematoxilina e eosina). (B) Na coloração de azul Alciano, o espessamento da parede da célula apresentou apenas a contracoloração enquanto a cápsula está fortemente corada. (C) Nas colorações de Grocott e (D) Fontana-Masson apenas a célula apresentou-se enegrecida enquanto que a camada circundante corou-se apenas com as respectivas contracolorações. Barra = 20µm.

envolvimento cutâneo em felinos pode estar associada ao local primário da infecção e ao período inicial de multiplicação do agente no tecido. Casos de leveduras com grande quantidade de células filhas pequenas não podem ser confundidos com o estágio de reprodução baseado na formação de micélios com basidiósporos, tendo em vista que essa forma de reprodução sexuada só tem sido descrita no meio ambiente e em condições especiais de laboratório (Kronstad et al. 2011), não existindo relatos da forma sexuada de reprodução da levedura de *Cryptococcus* spp. em tecidos infectados.

As propriedades histoquímicas das leveduras de *Cryptococcus* spp. foram conforme descritas na literatura (Malik et al. 2006, Faria & Xavier 2009, Guarner & Brandt 2011). No entanto, em alguns casos ocorreu leve coloração radiada da cápsula nas técnicas de HE e PAS; isso sugere que alguns componentes da parede da célula da levedura podem também estar presentes na cápsula em menores quantidades. Situação semelhante também foi observada em todos os casos utilizando-se AA e MM, que coram fortemente a

cápsula e a parede da célula das leveduras, reforçando uma possível semelhança de alguns componentes presentes nessas duas estruturas. Estudos com leveduras mutantes, com alterações nos componentes da parede celular, principalmente glucagon, têm resultado em células com paredes defeituosas e sem cápsula, indicando possível associação necessária da cápsula com a parede, embora ainda não se saiba se essa interação é direta ou indireta através de outro componente celular (Doering 2009).

Em um caso de infecção pulmonar em um felino observou-se, pelo HE, um espessamento eosinofílico circundando a parede da célula, com características morfológicas semelhantes às descritas por Xie et al. (2012) em infecções de humanos. Diferentemente desses autores, que propõem espessamento da cápsula, através das técnicas histoquímicas evidenciou-se que o espessamento era na verdade na parede, tendo em vista que, nas colorações específicas para a cápsula, o espessamento corou-se apenas pela coloração de fundo.

CONCLUSÃO

O diagnóstico etiológico da criptococose em cães e gatos pode ser realizado através do exame histopatológico, baseando-se na morfologia específica do agente e em suas características histoquímicas típicas, principalmente naqueles casos em que a cultura micológica não está disponível. Para isso é necessário o conhecimento do padrão morfológico e histoquímico da infecção por *Cryptococcus* spp., assim como suas variações morfológicas e histoquímicas nos tecidos afetados. A presença da cápsula polissacarídica e a produção de melanina diferenciam esse agente de outros fungos leveduriformes que afetam animais domésticos.

Agradecimentos.- G.J.N. Galiza e C. Tochetto (doutorado), T.M. Silva e R.A. Caprioli (iniciação científica - PIBIC) são bolsistas do CNPq. F.B. Rosa (doutorado) é bolsista da CAPES. G.D. Kommers é bolsista de Produtividade do CNPq (PQ-2). O projeto é financiado pelo CNPq - Edital Universal (Proc. 474839/2012-5).

REFERÊNCIAS

- Bose I., Reese A.J., Ory J.J., Janbon G. & Doering T.L. 2003. A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* 2(4):655-663.
- Bovers M., Hagen F. & Boekhout T. 2008. Diversity of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. *Revta Iberoam. Micol.* 25:S4-S12.
- Charlier C., Chrétien F., Baudrimont M., Mordelet E., Lortholary O. & Dromer F. 2005. Capsule structure changes associated with *Cryptococcus neoformans* crossing of the blood-brain barrier. *Am. J. Pathol.* 166(2):421-432.
- Castellá G., Abarca M.L. & Cabañes F.J. 2008. Criptococose y animales de compañía. *Revta Iberoam. Micol.* 225:S19-S24.
- Caswell J.L. & Williams K.J. 2007. Infectious diseases of the respiratory system, p.579-650. In: Maxie M.G. (Ed.), *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. Vol.2. 5th ed. Saunders Elsevier, St Louis.
- Côrrea M.P.S.C., Oliveira E.C., Duarte R.R.B.S., Pardo P.P.O., Oliveira F.M. & Severo L.C. 1999. Criptococose em crianças no Estado do Pará, Brasil. *Revta Soc. Bras. Med. Trop.* 332(5):505-508.
- Datta K., Bartlett K.H., Baer R., Byrnes E., Galanis E., Heitman J., Hoang L., Leslie M.J., MacDougall L., Magill S.S., Morshed M.G. & Marr K.A. 2009. Spread of *Cryptococcus gattii* into Pacific Northwest Region of the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 15(8):1185-1191.
- Del Poeta M. 2004. Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* 3(5):1067-1075.
- Doering T.L. 2009. How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. *Annu. Rev. Microbiol.* 63:223-247.
- Duncan C., Stephen C. & Campbell J. 2006. Clinical characteristics and predictors of mortality for *Cryptococcus gattii* infection in dogs and cats of southwestern British Columbia. *Can. Vet. J.* 47:993-998.
- Farias R.O. & Xavier M.O. 2009. Criptococose, p.191-203. In: Meireles M.C.A. & Nascente P.S. (Eds), *Micologia Veterinária*. Ed. Universitária UFPel, Pelotas, RS.
- Feldmesser M., Kress Y. & Casadevall A. 2001. Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. *Microbiol.* 147:2355-2365.
- Fortes S.T., Lazéra M.S., Nishikawa M.M., Macedo R.C.L. & Wanke B. 2001. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest. *Mycoses* 44:137-140.
- Gazzoni A.F., Pegas K.L. & Severo L.C. 2008. Técnicas histopatológicas no diagnóstico de criptococose por *Cryptococcus* deficientes de cápsula: relato de caso. *Revta Soc. Bras. Med. Trop.* 41(1):76-78.
- Guarner J. & Brandt M. 2011. Histopathologic Diagnosis of Fungal Infections in the 21st Century. *Clin. Microbiol. Rev.* 24(2):247-280.
- Jensen H.E., Schönheyder H.C., Hotchi M. & Kaufman L. 1996. Diagnosis of systemic mycoses by specific immunohistochemical tests. *Acta Pathol., Microbiol. Immunol. Scand.* 104(4):241-258.
- Kaufman L. 1992. Immunohistologic diagnosis of systemic mycoses: an update. *Eur. J. Epidemiol.* 8(3):377-382.
- Kommers G.D., Souza T.M., Souto M.A.M., LaCorte F.D. & Barros C.S.L. 2005. Criptococose pulmonar granulomatosa em um equino. *Ciência Rural* 35(4):938-940.
- Kozel T.R. 1995. Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol.* 3(8):295-298.
- Kronstad J.W., Attarian R., Cadieux B., Choi J., D'Souza C.A., Geddes J.M.H., Hu G., Jung W.H., Kretschmer M., Salkia S. & Wang J. 2011. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic Box. *Nature* 9:193-203.
- Lima A.O., Soares J.B., Greco J.B., Galizi J. & Cançado J.R. 1977. Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica. 5^a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- MacDougall L., Kidd S.E., Galanis E., Mak S., Leslie M.J., Cieslak P.R., Kronstad J.W., Morshed M.G. & Bartlett K. 2007. Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the Pacific Northwest, USA. *Emerg. Infect. Dis.* 13(1):42-50.
- Malik R., Krockenberger M., O'Brien C.R., Martin P., Wigney D. & Medleau L. 2006. Cryptococcosis, p.584-598. In: Greene C.E. (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3rd ed. Saunders Elsevier, St Louis.
- Martins D.B., Barbosa A.L.T., Cavalheiro A., Lopes S.T.A., Santurio J.M., Schossler J.E. & Mazzanti C. 2008. Diagnóstico de criptococose canina pela citologia por agulha fina. *Ciência Rural* 38(3):826-829.
- Martins D.B., Zanette R.A., França R.T., Howes F., Azevedo M.I., Botton S.A., Mazzanti C., Lopes S.T.A. & Santurio J.M. 2010. Massive cryptococcal disseminated infection in an immunocompetent cat. *Vet. Dermatol.* 22:232-234.
- McFadden D., Zaragoza O. & Casadevall A. 2006. The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol.* 14(11):497-505.
- Mcgill S., Malik R., Saul N., Beetson S., Secombe C., Robertson I. & Irwin P. 2009. Cryptococcosis in domestic animals in Western Australia: a retrospective study from 1995-2006. *Med. Mycol.* 47:625-639.
- Montenegro H. & Paula C.R. 2000. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil. *Med. Mycol.* 38:385-390.
- Pappalardo M.C.S.M. & Melhem M.S.C. 2003. Cryptococcosis: A review of the Brazilian experience for the disease. *Revta Inst. Med. Trop. São Paulo* 45(6):299-305.
- Okagaki L.H., Strain A.K., Nielsen J.N., Charlier C., Baltés N.J., Chrétien F., Heitman J., Dromer F. & Nielsen K. 2010. Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. *Plos Pathogens* 6(6):1-15.
- Riet-Correa F., Krockenberger M., Dantas A.F.M. & Oliveira D.M. 2011. Bovine cryptococcal meningoencephalitis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 23(5):1056-1060.
- Rodrigues M.L., Alviano C. & Travassos L.R. 1999. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*: virulence factors and immunological mechanisms. *Microbes Infect.* 1(4):293-301.
- Severo L.C., Oliveira F.M. & Londero A.T. 1999. Cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Brazilian patients with AIDS. Report of three cases. *Revta Iberoam. Micol.* 16:152-154.
- Sorrel T.C. 2001. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med. Mycol.* 39:155-168.
- Steenbergen J.N. & Casadevall A. 2003. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes Infect.* 5:667-675.
- Xie S., Saob R., Brauna A. & Bottonea E.J. 2012. Difference in *Cryptococcus neoformans* cellular and capsule size in sequential pulmonary and meningeal infection: a postmortem study. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 73:49-52.