

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas**

Alexandra Flávia Gazzoni

Análise descritiva da histopatologia criptocócica

Porto Alegre, 2009

Alexandra Flávia Gazzoni

Análise descritiva da histopatologia criptocócica

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Pneumológicas à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Severo

Porto Alegre, 2009

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

FICHA CATALOGRÁFICA

G291A **GAZZONI, ALEXANDRA FLÁVIA**

Análise descritiva da histopatologia criptocócica / Alexandra Flávia Gazzoni; orient. Luiz Carlos Severo. – 2009.
96f. : il. color.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas. Porto Alegre, BR-RS, 2009.

1. Padrão reativo 2. Infecção paucireativa 3. Coloração pela prata 4. Índice de brotamento 5. Coloração de Mucicarmim de Mayer 6. Índice carminofílico 7. Coloração de Fontana-Masson. I. Severo, Luiz Carlos II. Título.

NLM: WC 475

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

“O maior infortúnio do homem letrado, não é quiçá o fato de ser vítima das intrigas, a inveja dos seus colegas e o ser ver desprezado dos homens poderosos, senão de ser ver julgado pelos néscios”

Voltaire

À MINHA FAMÍLIA

"QUE FORÇA É ESTA, EU NÃO SEI, TUDO O QUE SEI, É QUE EXISTE E ESTÁ DISPONÍVEL APENAS QUANDO ALGUÉM ESTÁ NUM ESTADO EM QUE SABE EXATAMENTE O QUE QUER, E ESTÁ TOTALMENTE DETERMINADO A NÃO DESISTIR ATÉ CONSEGUIR."

Ao meu orientador

“Inventor é um homem que olha para o mundo em torno de si e não fica satisfeito com as coisas como elas são. Ele quer melhorar tudo o que vê e aperfeiçoar o mundo. É perseguido por uma idéia, possuído pelo espírito da invenção e não descansa enquanto não materializa seus projetos”

Alexander Graham Bell

RESUMO

GAZZONI, AF. Análise descritiva da histopatologia criptocócica. 2009 96f. Tese (Doutorado)- Programa de Pós-graduação em Ciências Pneumológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

A identificação histopatológica dos agentes fúngicos é um método excelente de diagnóstico, devido ao fato de que as estruturas são facilmente identificadas por meio das técnicas histoquímicas. Até o momento, não dispõem-se de métodos aceitáveis para quantificação da atividade da infecção. Esta investigação protocola um método de estimativa para atividade biológica da criptococose através da determinação dos índices de brotamentos e carminofílico do *Cryptococcus*. **Objetivos:** Descrever os aspectos histopatológicos da criptococose através das técnicas histoquímicas básicas e especiais da micologia. **Métodos:** Foram avaliados 33 pacientes com diagnóstico histopatológico prévio da criptococose. **Resultados:** Houve predominância do sexo masculino. A idade variou entre 10 a 81 anos, com média de 45,6 anos. A criptococose é doença definidora dos casos de Aids, sendo considerado seu principal fator predisponente, seguido de transplantes. O trato respiratório é o mais envolvido. O microrganismos tem tropismo para o sistema nervoso central e apresenta disseminação para outros órgãos. Resultados falso-negativos é reflexo da deficiência de material capsular. A mortalidade foi de 36%, sendo o maior índice observado até os 3 primeiros meses após o diagnóstico. A criptococose apresenta-se sob duas formas, reativa e paucireativa. Na infecção reativa, os organismos foram menos abundantes e predominantemente intracelulares aos histiócitos e às células gigantes. Na infecção paucireativa, há um grande número de leveduras, que proliferam-se extracelularmente e estão associadas a destruição do tecido afetado. Ambos infecções, reativas e paucireativas mostraram grande variação no índice de brotamento. O índice carminofílico foi menor nas infecção reativas, quando comparados a infecção paucireativa. **Discussão:** A coloração de Hematoxilina-Eosina é usada para visualizar as alterações estruturais das lesões, bem como da reação tecidual. A coloração da prata é a mais utilizada para identificação dos organismos fúngicos como o *Cryptococcus*. A coloração de

Mucicarmim de Mayer detecta a cápsula mucopolissacarídica circundante corada na cor magenta. A coloração de FM oferece diagnóstico diferencial nos casos inconclusivos à coloração de Mucicarmim de Mayer. A quantificação de IB e IC é uma escala útil na interpretação da resposta inflamatória do hospedeiro e atividade biológica da criptococose.

Palavras-chaves: Padrão reativo. Infecção paucireativa. Coloração pela prata. Índice de brotamento. Coloração de Mucicarmim de Mayer. Índice carminofílico. Coloração de Fontana-Masson.

ABSTRACT

GAZZONI, AF. Analisis descritiva of the cryptococcal histopatology. 2009 96f. Tese (Doutorado)- Programa de Pós-graduação em Ciências Pneumológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

The histopathologic identification from the fungal agents that's a method excellent of diagnostic, due the fact of what the structures são easily identified for histochemical techniques. So far, there is no methods you accepted about to measurement of biologic activity. This investigation aponta to an method of estimate of the activity biologic of cryptococcal infection by determination of the Budding Index and Carminophilic Index of the Cryptococcus. **Objectives:** Describes the histologic features of cryptococcosis by basic and special histochemical techniques of mycology. **Methods:** Have been evaluated 33 patients with previous cryptococcosis histopathologic diagnostic. **Results:** There is an predominance of the males. The age of the patients ranged from 10 to 81 years with a median value 45,4 years. The HIV infection was the main risk factor for disease, followg of transplants. The respiratory tract is the most frequently involved among the organ systems organs. The false-negative latex test are due to capsular deficiency. The moratlity rate was 36%, The high rate of 50% was observed between of 1 to 3 months. The cryptococcal infections is divided into two major histologic categories, reactive and paucireactive, based upon the host reaction. In reactive infection, the organisms were lessa abundant and were predominantly intracellular within histiocytes and giant cells. In paucireactive infection, thre is large numbers of yeats in the lesions, cryptococci proliferate extracellularly within the involved tissues, associated histologically with mucoid degeneration of the surrounding tissue. Both reactice and paucireactive infections showed great variation in Budding Index. The Carminophilic Inded was lower in the reactive infections, when compared with the paucireactive infection. In this Carminophilic Index presented higher measurements.. **Discussion:** The Hematoxilin-Eosin stain is used to look for strucutural changes of the infectd lesion, as well tissues reactions. The Gomori's methenamine-silver stain is the more commonly used in identifiatifying these organisms. The mucicarmine stain detecting the

surrounding mucopolisacharides capsule of the magenta color. The Fontana-Masson staining offers differential diagnostic. The determination of IB and IC is an scale that relied, because it provides an interpretation of the host response and biological activity of the cryptoccosis.

Key-words: Reactive pattern. Paucireactive infection. Grocott's methenamine silver stain. Budding index. Mucicarmine stain. Carminophilic index. Fontana-Masson stain.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição e percentual dos sexos (n=33).....	21
Figura 2 - Distribuição das frequências de idade em intervalo de classe na amostra estudada (n=33).	22
Figura 3- Fatores predisponentes para criptococose na amostra estudada (n=33).	23
Figura 4 – Visão perspectiva das condições predisponentes para criptococose (n=33).	23
Figura 5 – Porcentagem da criptococose como primeira manifestação da Aids (n=13).	24
Figura 6 – Órgãos acometidos submetidos ao diagnóstico histopatológico.	25
Figura 7 – Tipo de envolvimento na amostra estudada (n=33).	26
Figura 8 – Potencial disseminação da criptococose na amostra avaliada (n=33).	26
Figura 9 – Procedimentos para obtenção do espécime clínico submetidos a exame histopatológico (n=36).....	27
Figura 10 – Porcentagem de realização do Látex na amostra estudada (n=33).	28
Figura 11 – Frequência e porcentagem dos casos com e sem identificação de espécies (n=33).	28
Figura 12 – Mortes por criptococose em intervalos de tempo (n=33).	30
Figura 13 - Categoria paucireativa e reativa na criptococose.....	33
Figura 14 - Fibrose na criptococose.	33
Figura 15 - Padrão inflamatório na criptococose.	34
Figura 16 - Presença de halo na criptococose.	34
Figura 17 - Destruição total da arquitetura tecidual na criptococose.	35
Figura 18 - Tamanho do halo perinuclear na criptococose	37
Figura 19 - Criptococose por fungo totalmente deficiente de cápsula.	37
Figura 20 - Formas não-clássicas do <i>Cryptococcus</i>	38
Figura 21 - Cápsula corada na cor magenta pela coloração de MM.	40
Figura 22 - Coloração de Fontana-Masson na criptococose.	41
Figura 23 – Quantificação de elementos fúngicos em fragmento pulmonar corado pelo GMS, evidenciando-se o padrão correspondente ao escore +++.	45
Figura 24 - Índice carminofílico na criptococose reativa.	45
Figura 25 - Número de micro-organismos e IB por meio da coloração da prata.	46
Figura 26 - IC por meio da coloração de MM na criptococose paucireativa.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Finalidades e limitações das técnicas histoquímicas no diagnóstico da criptococose.....	16
Tabela 2 – Óbitos como consequência direta da criptococose na amostra estudada (n=33).	29
Tabela 3 - Distribuição dos parâmetros histológicos revelados ao HE na criptococose, Laboratório de Micologia, Santa Casa/Complexo Hospitalar, 1981-2009(n=33).....	32
Tabela 4 - Distribuição das características micromorfológicas reveladas pela coloração da prata no Laboratório de Micologia, Santa Casa/Complexo Hospitalar, 1981-2009.....	36
Tabela 5 - Distribuição da quantificação dos elementos fúngicos realizados pela coloração de GMS.....	36
Tabela 6 – Frequência entre os caos e escala pela coloração de MM.	39
Tabela 7 - Atividade biológica na criptococose reativa por meio de IB e IC.....	43
Tabela 8 - Atividade biológica na criptococose paucireativa por meio de IB e IC.....	44
Tabela 9 - Características micromorfológicas das leveduras.	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABTO – Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos

Aids – Síndrome da imunodeficiência adquirida

ED – Exame direto

FM - Fontana-Masson

GMS – Coloração pela prata

HE – Hematoxilina-Eosina

HIV – Vírus da imunodeficiência adquirida

IB – Índice de brotamento

IC – Índice carminofílico

LCR – Líquor cefalorraquidiano

MM – Mucicarmim de Mayer

OMS – Organização Mundial da Saúde

RBT – Registros Brasileiros de Transplantes

SNC – Sistema nervoso central

Obs.: Algumas abreviaturas, devido ao seu uso consagrado, foram mantidas de acordo com o original na língua inglesa.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 JUSTIFICATIVA	4
3 OBJETIVOS	5
3.1 GERAL	5
3.2 ESPECÍFICOS	5
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	6
4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	6
4.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO	6
4.3 CASUÍSTICA	6
4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	6
4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	7
4.6 ASPECTOS ÉTICOS	7
4.7 OBTENÇÃO DAS INFORMAÇÕES	7
4.8 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	8
4.9 DEFINIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS	8
4.9.1 Idade, média de idade e sexo	8
4.9.2 Definição do órgão acometido	9
4.9.3 Doença predisponentes	9
4.9.4 Criptococose como doença definidora de Aids	9
4.9.5 Tipo de envolvimento	10
4.9.6 Espécime clínico proveniente de	10
4.9.7 Sorologia pelo teste de aglutinação das partículas de látex	10
4.9.8 Definição das espécies do complexo <i>Cryptococcus</i>	11
4.9.9 Número de óbitos	11
4.9.10 Hematoxilina-Eosina (HE)	11
4.9.11 Avaliação da Coloração pela prata (GMS)	12
4.9.12 Formas não-clássicas	12
4.9.13 Avaliação do Mucicarmim de Mayer (MM)	13
4.9.14 Avaliação do Fontana-Masson (FM)	13
4.9.15 Atividade biológica	13
5.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA	14
6 EMBASAMENTO TEÓRICO	15
6.1 MICROMORFOLOGIA	15
6.2 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	15
6.2.1 Histopatologia	16

6.3 DIFERENÇAS HISTOLÓGICAS ENTRE PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS E IMUNOCOMPETENTES	18
6.4 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL	19
7 RESULTADOS	21
7.1 POPULAÇÃO AMOSTRAL	21
7.2 PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO	21
7.3 PERFIL HISTOLÓGICO	30
7.3.1 Coloração de Hematoxilina- Eosina	30
7.3.2 Coloração pela prata	35
7.3.3 Coloração de Mucicarmim de Mayer	38
7.3.4 Coloração de Fontana-Masson	41
7.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	42
7.4.1 Criptococose reativa e paucireativa	42
8 DISCUSSÃO	47
8.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE DADOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS ESTUDADOS	47
8.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE A AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	49
8.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE ATIVIDADE BIOLÓGICA	51
9 CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
APÊNDICES	62
ANEXOS	64

1 INTRODUÇÃO

A criptococose é uma infecção fúngica sistêmica, predominantemente oportunística, provocada pelo basidiomiceto naturalmente encapsulado do gênero *Cryptococcus*, o qual tem como porta de entrada o sistema respiratório, possuindo um importante tropismo pelo sistema nervoso central (SNC) (CASADEVALL & PERFECT, 1998). Esta levedura causa doença em humanos que varia desde a colonização assintomática pulmonar a meningite e infecção disseminada (MITCHELL & PERFECT, 1995).

A infecção criptocócica é causada por duas espécies distintas do complexo *Cryptococcus*: *Cryptococcus gattii*, tipicamente encontrado em zonas climáticas tropicais e subtropicais, usualmente causa doença em indivíduos aparentemente imunocompetentes, enquanto presentes em fezes de pombos urbanos, *Cryptococcus neoformans* tem distribuição mundial e comporta-se como uma comum infecção oportunística (BOVERS et al., 2008; SEVERO, et al., 1998; SEVERO et al., 1999).

Especificamente, condições que predispõe a uma alteração na imunidade celular associa-se a um aumento significativo do risco da doença, que incluem desordens linfoproliferativa, transplantes de órgãos e naqueles receptores de terapia imunossupressiva (PERFECT & CASADEVALL, 2002). A criptococose é a umas das mais comuns infecções fúngicas oportunísticas em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids) – considerado o seu principal fator predisponente (MITCHELL & PERFECT, 1995). Neste subgrupo, a infecção criptocócica apresenta a altos índices de mortalidade, nos quais a sua incidência é inversamente proporcional a contagem de linfócitos CD4. (KWON-CHUNG & BENNETT, 1984; PERFECT & CASADEVALL, 2002).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a taxa mundial das infecções oportunísticas, causadas pelo *Cryptococcus*, tenha uma frequência média de 11% (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998) e que a criptococose cause provavelmente cerca de 5% de todas as mortes associadas ao HIV (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002). Em regiões como os Estados Unidos, Europa, Austrália e América do Sul, a criptococose acomete de 6 a 10% dos pacientes com Aids, enquanto no continente africano essa taxa eleva-se para 15% a 35% (MITCHELL & PERFECT, 1995; WORLD HEALTH

ORGANIZATION, 1998). O índice de mortalidade global geralmente é elevado (TRILLES et al, 2004). Segundo MITCHELL & PERFECT (1995), a mortalidade durante a terapia inicial é de 10 a 25%, e em 12 meses eleva-se a 30 - 60%.

No Brasil, a estimativa da prevalência da criptococose em pacientes com HIV/Aids é de 5%, necessitando de infraestrutura de suporte médio para diagnosticar e tratar a infecção. Sem tratamento, a esperança de vida do paciente é provavelmente inferior a um mês (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998). A taxa de mortalidade entre pacientes com criptococose, com ou sem doença predisponente, fica em torno de 40 a 66% (CALVO et al., 1991; CÔRREA et al., 1999; PAPPALARDO & MELHEM, 2003)

Em relação ao HIV, a sua prevalência é elevada, sendo estimada no final de 2006, pela OMS, que cerca de 40 milhões de pessoas estavam contaminadas com o HIV no mundo, sendo 37 milhões de adultos. A mortalidade global está se elevando, sendo estimada em 2.8 milhões no ano de 2002 para 6.5 milhões no ano de 2030 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007).

No Brasil, a estimativa de adultos e crianças vivendo com HIV/Aids no período de 2003 a 2005 equivale a 620.000 pacientes em média, (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006). Em 2007, a prevalência do HIV em adultos maiores que 15 anos aumentou, apresentando índice de 454/100.000 habitantes. A estimativa da taxa de mortalidade do HIV/Aids é 8%/100.000 habitantes ao ano, o que corresponde a aproximadamente 15.000 óbitos no período (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007).

Segundo PERFECT & CASADEVALL (2002), a criptococose ocorre em 2,8% dos pacientes receptores de órgãos com um índice de mortalidade acima de 42%. Pacientes submetidos a transplantes renais, hepáticos e pulmonares apresentam alto risco para a doença, bem como as maiores prevalências. Conforme os Registros Brasileiros de Transplantes (RBT) (2007), em comparação com o ano anterior, houve incremento nos transplantes de pulmão (9%), de fígado (5%) e rim (3%). O estado do Rio Grande do Sul (RS) coloca-se entre os principais estados, apresentando equipes transplantadoras ativas, ocupando a primeira posição nos transplantes pulmonares (14 procedimentos); o segundo lugar no transplante hepáticos (54 procedimentos), já nos transplantes renais, ocupa a terceira posição com 168 procedimentos. No transplante renal, a causa infecciosa é

responsável por 50% dos óbitos; no transplante pulmonar apresenta porcentagem ainda maior - 62%; já no transplante hepático ela corresponde a 45%. Conforme a Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos (ABTO) (2008), embora tenha havido crescimento nas taxas de transplantes de órgãos em 2008, este foi inferior ao planejado e as medidas para acelerar esse crescimento devem ser ampliadas.

Nesse contexto, a crescente taxa de prevalência dos casos de HIV/Aids no mundo e no Brasil com a sua elevada taxa de mortalidade, bem como a era dos transplantes, transformam as doenças oportunistas, em especial a criptococose, em um importante alvo de estudo.

2 JUSTIFICATIVA

Diante do aumento do número nos casos de infecções fúngicas motivado pelos eventos imunossupressores descritos anteriormente, justifica-se o estudo:

- 1) A imersão dos fragmentos em formol causa morte dos elementos fúngicos, restringindo-se o diagnóstico aos achados micromorfológicos e tintoriais da histopatologia.
- 2) Investigação de um método para estimar a atividade biológica da criptococose visto que, não existe métodos aceitáveis para quantificar a atividade da infecção.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Descrever aspectos histopatológicos da criptococose através das técnicas de colorações histoquímicas de Hematoxilina-Eosina (H&E), Coloração pela prata (GMS), Mucicarmim de Mayer (MM), Fontana-Masson (FM).

3.2 ESPECÍFICOS

- Levantar dados epidemiológicos dos casos de criptococose previamente diagnosticados pelo exame anátomo-patológico.
- Estabelecer o tipo de reação tecidual (reativa, paucireativa, sem reação; granulomatosa, necrose, sarcóide, supurativa; existência ou ausência de halo; presença de células inflamatórias como: macrófagos, linfócitos, eosinófilos, neutrófilos, histiócitos, células epitelióides e célula gigante; presença de fagocitose: disposição intracelular ou extracelular do elemento fúngico.
- Determinar o aspecto tecidual histopatológico visualizado pela coloração pela prata.
- Descrever as características micromorfológicas oferecidas pela técnica de MM como a presença de cápsula.,
- Caracterizar a presença de aspectos histopatológicos proporcionados pela técnica de FM, como o objetivo de avaliar a presença de melanina na parede celular do elemento fúngico.
- Determinar o índice de brotamento (IB) e índice carminofílico (IC) das leveduras com a finalidade de estimar a atividade biológica da criptococose.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trabalho descritivo que tem como caráter fundamental um estudo qualitativo de uma série de casos de criptococose diagnosticados previamente por métodos histoquímicos.

4.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Na população de estudo incluíram-se todas as amostras da casuística que somaram 910 casos da doença, no período compreendido entre 1981 a 2009. Foram incluídos na análise blocos de parafina provenientes do arquivo do Laboratório de Micologia da Santa Casa-Complexo Hospitalar e do Laboratório Geyer, ambos na cidade de Porto Alegre-RS.

4.3 CASUÍSTICA

Avaliaram-se aspectos histopatológicos e retrospectivamente, os epidemiológicos, de 33 casos previamente diagnosticados com criptococose. O estudo foi realizado no período de janeiro de 2008 a março de 2009.

4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Os critérios de inclusão foi:

- Ter diagnóstico histopatológico prévio de criptococose anterior a março de 2009.

4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Os critérios de exclusão foram:

- Não ter blocos de parafina disponíveis no Laboratório de Micologia, Santa Casa-Complexo Hospitalar ou no Laboratório Geyer.
- Não ter espécime clínico suficiente - incluso em blocos de parafina - para confecção dos cortes seqüenciados e posterior realização das técnicas histoquímicas.

4.6 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa-Complexo Hospitalar (processo n° 1151/2006).

4.7 OBTENÇÃO DAS INFORMAÇÕES

As informações de cada paciente foram obtidas por meio da análise das fichas, bem como do sistema eletrônico de dados do Laboratório de Micologia; e outras recuperadas através da revisão dos prontuários médicos pertencentes a Santa Casa-Complexo Hospitalar.

Posteriormente, as informações compuseram o Instrumento de coleta de dados (Apêndice A) pertinentes ao estudo.

4.8 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

No estudo foram confeccionadas 10 lâminas correspondentes a cada caso. Cada uma delas foram coradas por meio de 4 técnicas histoquímicas: Hematoxilina-eosina (Anexo A) (ARTAL, 2004; CHANDLER & WATTS, 1989; GAZZONI et al., 2008; LACAZ, 1998), Coloração da prata (Anexo B) (BAKER & HAUGEN 1955; GAZZONI et al., 2008; GROCOTT, 1955; KWON-CHUNG et al., 1981; LACAZ, 1998), Mucicarmim de Mayer (Anexo C) (GAZZONI et al., 2008; LACAZ, 1998; LAZCANO et al., 1991; LAZCANO et al., 1993) e Fontana-Masson (Anexo D) (GAZZONI et al., 2008; LACAZ, 1998).

As amostras, que continham mais de um bloco ou os casos, que possuíam mais de um sítio infeccioso foram ambos analisados e também integraram o estudo.

Dessa forma, foram confeccionadas, coradas e analisadas um total de 1320 lâminas correspondente aos casos da série.

Em casos especiais, foram realizadas colorações adicionais, resultando em uma adição de 100 lâminas.

4.9 DEFINIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS

4.9.1 Idade, média de idade e sexo

4.9.1.1 Idade

- Coletada como variável contínua, tomando como base a idade na data do primeiro diagnóstico da criptococose.
- A média de idade foi obtida através de cálculo adequado.
- A idade foi apresentada através de gráficos de distribuição de frequência utilizando-se intervalos de classes.

4.9.1.2 Sexo

- Masculino
- Feminino

4.9.2 Definição do órgão acometido

- Determinação da porcentagem e do número de casos provenientes dos diferentes sítios infecciosos acometidos.

4.9.3 Doença predisponentes

- Definição dos fatores de risco.
- Determinação do número de casos e da porcentagem das condições predisponentes.

4.9.4 Criptococose como doença definidora de Aids

- Definiu-se esta variável como desenvolver criptococose como primeira manifestação oportunística de Aids.

4.9.5 Tipo de envolvimento

- Caracterização de envolvimento como:
 - ❑ Pulmonar;
 - ❑ Extra-pulmonar;
 - ❑ Sistema Nervoso Central;
 - ❑ Extra-neural;
 - ❑ Disseminada;
 - ❑ Extra-pulmonar e extra-neural;
- Definição do número de casos e da porcentagem.

4.9.6 Espécime clínico proveniente de:

- Biópsia cirúrgica;
- Necropsia;
- Biópsia transbrônquica;
- Punção por agulha fina;

4.9.7 Sorologia pelo teste de aglutinação das partículas de látex

- Determinação da porcentagem e do número de casos relacionados a presença e ausência do teste.
- Determinação de porcentagem de casos positivos e negativos.

4.9.8 Definição das espécies do complexo *Cryptococcus*

- *C. gattii*;
- *C. neoformans*;
- Determinação do número de casos e da porcentagem das variedades causadoras da infecção criptocócica.

4.9.9 Número de óbitos

- Determinação do casos e da porcentagem de óbitos.
- Ocorrência de óbito em três pontos no tempo após o diagnóstico da criptococose: 3 meses, 6 meses, 1 ano ou período superior a 1 ano.

4.9.10 Hematoxilina-Eosina (HE)

Categorias histológicas incluídas no estudo:

- Reativa, paucireativa

Variáveis estudadas:

- Granulomatosa com necrose, sarcóide ou supurativa;
- Fibrose;
- Presença ou ausência de halo disposto pericelular ao fungo;
- Presença de células inflamatórias como: macrófagos, linfócitos, eosinófilos, neutrófilos, células gigante e célula epitelióide;
- Presença de fagocitose: fungo disposto intracelular ou extracelular;

4.9.11 Avaliação da Coloração pela prata (GMS)

- Presença de espaço claro pericelular indicativo de presença de material capsular.
- Determinação da porcentagem e do número de casos positivos na técnica de GMS.
- Quantificação dos microrganismos (SCHWARTZ, 1988).
- Determinação do índice de brotamento: consiste em 5 contagens de 100 microrganismos cada; a média das cinco contagem é expressada em um número sem unidade (SCHWARTZ, 1988).

4.9.12 Formas não-clássicas

- Definidas como:
 - Estruturas deficientes de cápsula;
 - Pseudo-hifa;
 - Estruturas semelhantes a tubo germinativo;
 - Formação de brotamentos em cadeia;
- Determinação do número de casos com suas apresentações teciduais;

4.9.13 Avaliação do Mucicarmim de Mayer (MM)

- Presença ou ausência de cápsula;
- Determinação da porcentagem e do número de casos positivos pela técnica de MM;
- Determinação do índice carminofílico: consiste na contagem de 100 microrganismos com indicação dos escores (SCHWARTZ, 1988).
- Escores:
 - 25% ou menos: +
 - 26% a 50%: ++
 - 51% a 75%: +++
 - Superior a 75%: ++++

4.9.14 Avaliação do Fontana-Masson (FM)

- Visualização da melanina presente na parede celular do elemento fúngico.
- Determinação da porcentagem e do número de casos com presença de melanina pela técnica de Fontana-Masson.

4.9.15 Atividade biológica

- Quantificação de índice de brotamento (IB) e índice carminofílico (IC) culminado da determinação da atividade biológica do *Cryptococcus* nas lesões reativas e paucireativas.

5.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Neste estudo foi realizado o método de triangulação sequenciada (NEVES, 1996), na qual há o uso ao mesmo tempo de métodos qualitativos e quantitativos. Dessa forma, os resultados do método qualitativo serviram de base para o planejamento do emprego do método quantitativo, complementando-os. A combinação da análise qualitativa e quantitativa realizadas em três momentos tornou a pesquisa mais forte e reduziu os problemas da adoção exclusiva de somente um desses grupos (MORSE, 1991)

A indicação dos testes estatísticos foi feita com a colaboração e orientação do Departamento de Matemática da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A interpretação estatística foi feita pela própria pesquisadora com a colaboração da disciplina de Bioestatística da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Para realização dos testes estatísticos foi utilizado o programa Pacote R, adotando-se o nível de significância de 0,05 ($\alpha=5\%$).

Para verificar as seguintes relações: a) sexo e aparecimento da doença; b) disseminação e espécies do *Cryptococcus* foi utilizado o Teste Binomial (não-paramétrico).

Para verificar a seguinte relação: a) presença ou não de fatores de risco e espécies do *Cryptococcus* foi utilizado o Teste Exato de Fisher (não-paramétrico).

6 EMBASAMENTO TEÓRICO

6.1 MICROMORFOLOGIA

Microscopicamente, o agente fúngico apresenta-se como leveduras esféricas a ovais com cápsula carminofílica circundante (GAZZONI et al., 2008) O envelope capsular é altamente antigênico e considerado determinante da virulência deste microrganismo (EDWARDS et al., 1967). As estruturas fúngicas variam de tamanho com 5 a 10 μm de diâmetro e exibem brotamentos únicos ou múltiplos (PERFECT & CASADEVALL, 2002; GAZZONI et al., 2009; LITMMAN & ZIMERRMAN, 1956).

As formas não-clássicas deste basidiomiceto são encontradas no exame direto (ED), na histopatologia e em cultivos, e incluem: pseudo-hifa, brotamentos em cadeia, e estruturas semelhantes a tubo germinativo, bem como elementos fúngicos desprovidos de material capsular (GAL et al., 1986). Estas estruturas não-clássicas foram relatadas pela literatura causando infecção em humanos e em modelos animais (ALFONSO et al., 1994; BOTTONE et al., 1986; COX & TOLHURST, 1946; FREED et al., 1971; GAZZONI et al., 2008; GAZZONI et al., 2009; GORDON, 1970; HEENAN et al., 1981; KIMURA et al., 1998; LEVINSON et al., 1974; LURIE & SHADOMY, 1971; MILCHGRUB et al.1989; ,MOORE, 1946; NEILSON et al., 1981; NEILSON et al., 1987; PASCHOAL et al., 2007; SCHWARTZ, 1988; SEVERO et al., 1981; SHADOMY & UTZ, 1966; SHADOMY & LURIE, 1971; TORRES et al., 2005; WATTS & CHANDLER et al.1987., WILLIAMSON et al., 1996).

6. 2 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial da criptococose inclui métodos convencionais como a microscopia (exame direto e histopatologia) (BOVERS et al., 2008; GAZZONI et al., 2008;

GAZZONI et al., 2009; GORDON & DEVINE, 1970; ÔHARA, 1986), usualmente associados a soromicologia (pesquisa do antígeno capsular através do teste de aglutinação das partículas de látex (BERLIN & PINCUS, 1989; BLOMMFIELD et al., 1963; HELOU et al., 1999) e ao isolamento do microrganismo em cultivos (BERLIN & PINCUS, 1989; BOVERS et al., 2008).

6.2.1 Histopatologia

A identificação histopatológica baseia-se nas características micromorfológicas do *Cryptococcus*, sendo composta pelas técnicas histoquímicas básicas de hematoxilina-eosina (H&E) e Coloração pela prata (GMS), bem como as técnicas especiais de mucicarmim de Mayer (MM) e de Fontana-Masson (FM) (ARTAL, 2004; GAZZONI et al., 2008; GAZZONI et al., 2009; GROCOTT et al., 1955; KWON-CHUNG, et al., 1981; LAZCANO et al., 1991; LAZCANO et al., 1993; RO et al., 1987; SEVERO et al., 1981). A Tabela 1 apresenta as finalidades e limitações destas técnicas histoquímicas.

Tabela 1 - Finalidades e limitações das técnicas histoquímicas no diagnóstico da criptococose.

	Finalidades	Limitações
H&E	Reação tecidual	Não evidencia as estruturas fúngicas
GMS	Cora parede celular dos fungos	Complexidade no procedimento Alto custo
MM	Cora envelope capsular	Insuficiente no diagnóstico de <i>Cryptococcus</i> deficientes de cápsula
FM	Cora melanina na parede celular fúngica	Complexidade no procedimento Alto custo

Fonte: Gazzoni et al., 2008

Segundo a Classificação de Schwartz, a criptococose é dividida em duas categorias histológicas baseadas nas reações teciduais, reveladas ao HE (CASADEVALL & PERFECT, 1998; SCHWARTZ, 1988). A categoria reativa - resultado de resposta imune celular ativa - apresenta intensa resposta inflamatória composta por macrófagos, células gigantes multinucleadas e linfócitos; as leveduras encontram-se intracelulares (fagocitadas) (CASADEVALL & PERFECT, 1998; GAZZONI et al., 2008, SCHWARTZ, 1988).

A categoria paucireativa é resultado da falta de habilidade do hospedeiro em desencadear a resposta inflamatória. A imunidade celular tem papel importante nos mecanismos de defesa; na sua ausência os microrganismos proliferam-se extracelularmente (CASADEVALL & PERFECT, 1998; SCHWARTZ, 1988). Portanto, as estruturas exibem-se sob esta disposição e estão associadas a mínima ou ausente resposta inflamatória e a destruição total da arquitetura tecidual (SCHWARTZ, 1988). Alguns estudos fundamentam que a reação paucireativa indica mau prognóstico (CASADEVALL & PERFECT, 1998).

A coloração da prata é largamente utilizada na pesquisa dos elementos fúngicos tanto em cortes de tecido, quanto em esfregaços (GAZZONI et al., 2008). Observa-se características morfológicas como parede celular e brotamentos, além de sugerir a presença dos halos claros perinucleares circundantes aos micro-organismos. As lesões ativas contêm numerosas estruturas fúngicas brotantes. Brotamentos únicos ou múltiplos com estreita base são comuns. As formas micromorfológicas não-usuais são facilmente evidenciadas por esta coloração (GAZZONI et al., 2009).

A coloração de MM é considerada um método específico de visualização do envelope mucopolissacarídico do *Cryptococcus* (CHANDLER & WATTS, 1997; GAZZONI et al., 2008, GAZZONI et al., 2009; PERFECT & CASADEVALL, 2002; SEVERO et al., 1981). Através da coloração magenta da cápsula é possível diferenciar a levedura de outros fungos similares em tamanho e forma (GAZZONI et al., 2008; GAZZONI et al., 2009).

A coloração de FM evidencia a melanina presente na parede celular fúngica (GAZZONI et al., 2008; PERFECT & CASADEVALL, 2002). Sua utilização fica restrita a casos em que há resultados insuficientes na técnica de MM. Dessa forma, ela é considerada

a alternativa diagnóstica para casos de infecções por organismos deficientes de envelope capsular mucopolissacarídico, morfologicamente sugestivos de *Cryptococcus* (GAZZONI et al., 2008).

6.2.1.1 Índice de brotamento e índice carminofílico

Caracteriza-se a atividade biológica do *Cryptococcus* através de uma escala confiável desenvolvida para determinar o índice de brotamento (IB) e carminofílico (IC) da levedura (CASADEVALL, 1998; SCHWARTZ, 1988). O IB é calculado através da porcentagem de micro-organismos que exibem 1 ou mais brotamentos, sendo indicativo de replicação *in vivo* (SCHWARTZ, 1988). O IC é calculado pela determinação da porcentagem de micro-organismos com cápsula, corada pela técnica histoquímica de MM, sendo indicativo de síntese capsular (CASADEVALL, 1998). A escala é potencialmente útil na interpretação da resposta inflamatória do hospedeiro, prognóstico e atividade biológica.

6.3 DIFERENÇAS HISTOLÓGICAS ENTRE PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS E IMUNOCOMPETENTES

As características histológicas da criptococose diferem entre indivíduos imunocomprometidos e imunocompetentes - reflexo do grau da integridade da resposta imune celular (JARVIS & HARRISON, 2008). Achados em pacientes imunocompetentes variam de nódulos bem definidos a massas, apresentando infiltrado inflamatório circundante ao local da lesão (JARVIS & HARRISON, 2008; SHIBUYA et al., 2001; SHIBUYA et al., 2002). É marcante a presença de formação granulomatosa com visualização de extensos infiltrados linfocitários e de células gigantes (BAKER, 1976; GAZZONI et al., 2008; KERKERING et al., 1981).

Em contraste a resposta imunológica normal em pacientes imunocompetentes, pacientes imunocomprometidos usualmente desenvolvem doença difusa (JARVIS & HARRISON, 2008). Nestes, os achados compreendem-se na expansão dos septos alveolares associados à agregação macrofágica, a ausência de granuloma e a destruição da arquitetura tecidual (GAZZONI et al., 2009; SHIBUYA et al., 2002; SHIBUYA et al., 2005). Características em pacientes HIV positivos são mais agudas, com a observação de numerosas leveduras brotantes, sem a presença de inflamação significativa (JARVIS & HARRISON, 2008).

6.4 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

A identificação histopatológica dos agentes fúngicos é um excelente método de diagnóstico, devido ao fato de que as estruturas são facilmente detectadas através das técnicas histoquímicas (GAZZONI et al., 2008; GAZZONI et al., 2009).

No *Cryptococcus* com cápsula íntegra, as características micromorfológicas são diferenciadas e o diagnóstico é único, desde que os micro-organismos sejam usualmente associados a mínima resposta inflamatória (CHANLDER & WATTS, 1997). No fungo deficiente de cápsula, as características histológicas são bastante inespecíficas encontrando-se em outras patologias de origem infecciosa (GAZZONI et al., 2008).

O uso das colorações especiais justifica-se pelo fato de que o *Cryptococcus* mimetiza outros fungos leveduriformes devido a sua variável micromorfologia (TRAVIS et al., 2002). O reconhecimento da cápsula pela coloração de MM é o primeiro passo para distinguir a levedura de outros fungos similares em tamanho e forma (CHANDLER & WATTS, 1997; GAZZONI et al., 2008; TRAVIS et al., 2002). A maior dificuldade ocorre com micro-organismos deficiente de cápsula, pois eles confundem-se - devido ao seu menor tamanho - com *Histoplasma capsulatum*, esférulas imaturas de *Coccidioides immitis*, formas pequenas de *Blastomyces dermatitidis* e de *Paracoccidioides brasiliensis*, *Candida glabrata* e *Sporothrix schenckii* (TRAVIS et al, 2002; GUTIERREZ et al, 1975; HARDING et al., 1979; FARMER et al., 1973; LOVE et al., 1985). Nesses casos, a

coloração histoquímica especial de FM é utilizada proporcionando diagnóstico diferencial entre as formas micromorfológicas não usuais do *Cryptococcus* e as estruturas fúngicas que simulam esta levedura (GAZZONI et al., 2008; TRAVIS et al., 2002).

7 RESULTADOS

7.1 POPULAÇÃO AMOSTRAL

Participaram deste estudo 33 pacientes com diagnóstico prévio da criptococose por meio de exame histopatológico

No que diz respeito ao perfil epidemiológico, todos os 33 pacientes foram incluídos na análise. Dentre estes, 7 casos enquadraram-se em alguns dos critérios de exclusão. Por sua vez, a descrição histopatológica realizou-se nos 26 casos restantes.

7.2 PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO

Figura 1- Distribuição e percentual dos sexos (n=33).

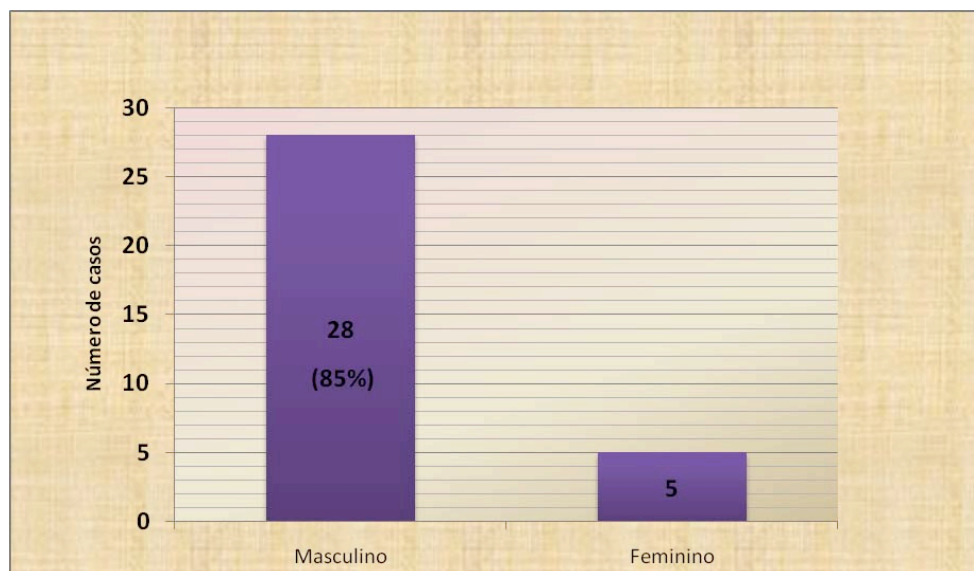
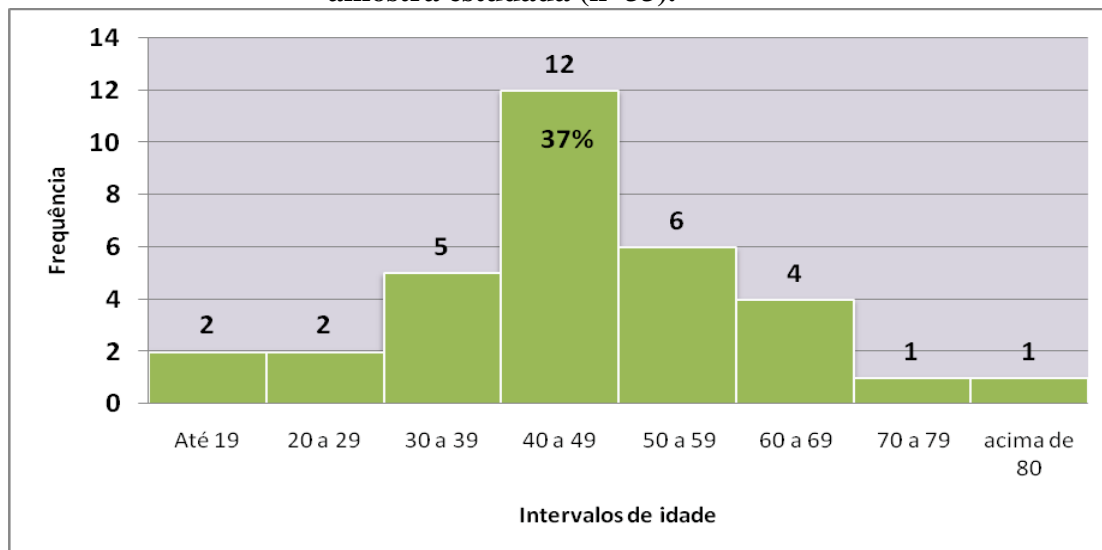


Figura 2 - Distribuição das frequências de idade em intervalo de classe na amostra estudada (n=33).

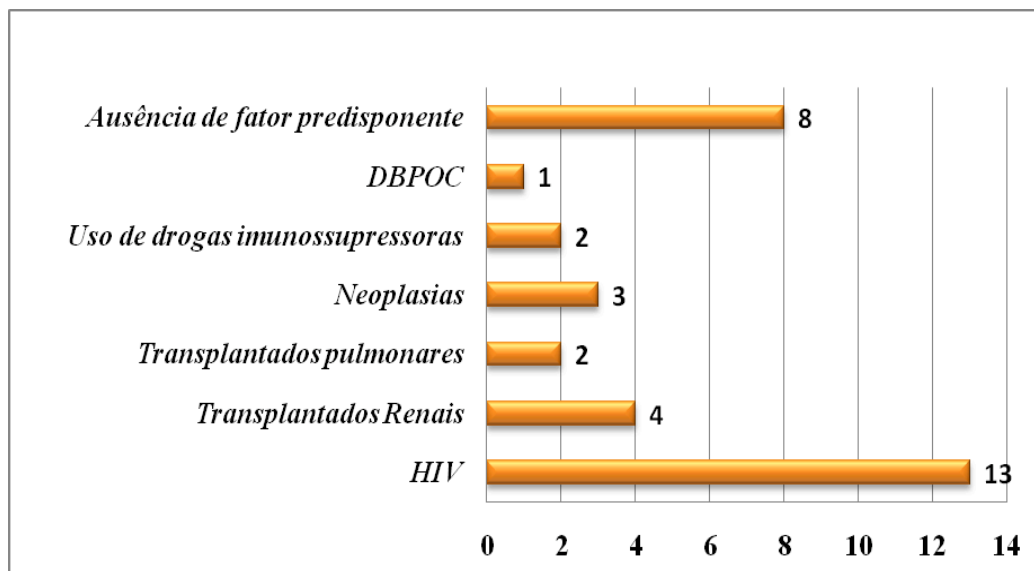


Cada intervalo de classe apresenta limites mínimo e máximo.

Houve predominância do sexo masculino 85% (28 casos) sobre o feminino (15%, 5 pacientes). De acordo com o Teste Binomial, quando verificamos as diferenças entre a variável sexo, a proporção de sexo masculino é significativamente diferente ($p=0.0003241$) da proporção do sexo feminino. Estes dados indicam que a proporção de sexo masculino é maior, sugerindo estar a criptococose relacionada ao sexo masculino nesta amostra. A Figura 1 apresenta o percentual dos sexos na amostra estudada.

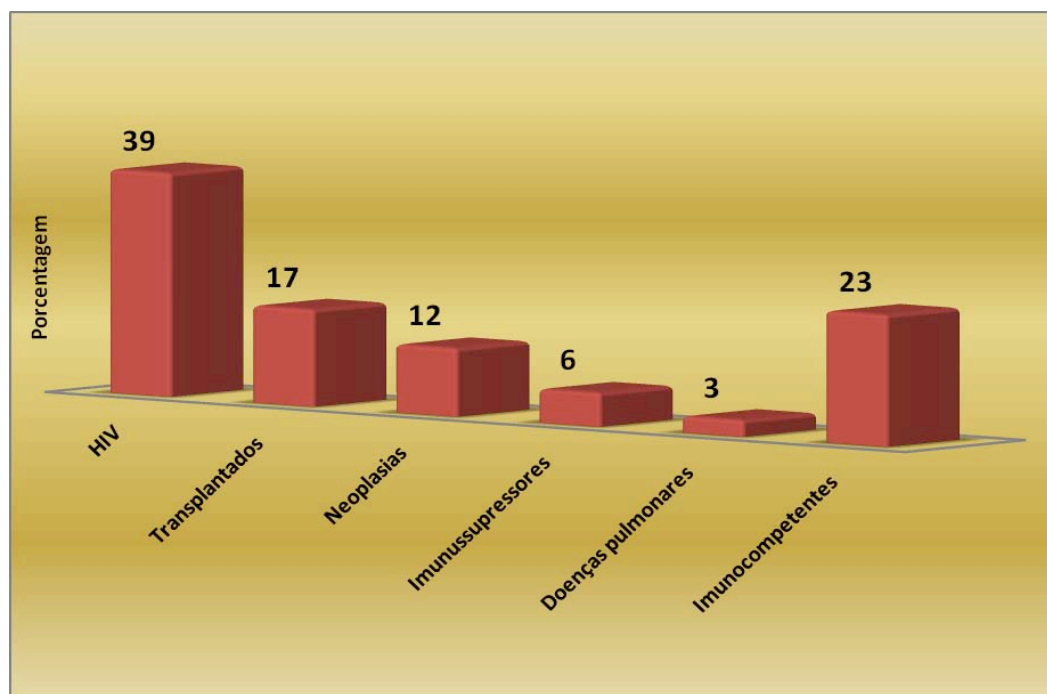
O intervalo 40 - 49 anos demonstrou maior frequência - 12 entre os 33 pacientes. A maioria - 37% - enquadraram-se neste intervalo. A média de idade foi 45,4 anos, com variação de 10 a 81 anos. A Figura 2 demonstra a distribuição das frequências de cada intervalo de classe.

Figura 3- Fatores predisponentes para criptococose na amostra estudada (n=33).



DBOPC: Doença Bronco Pulmonar Obstrutiva Crônica; HIV: Vírus da imunodeficiência adquirida.

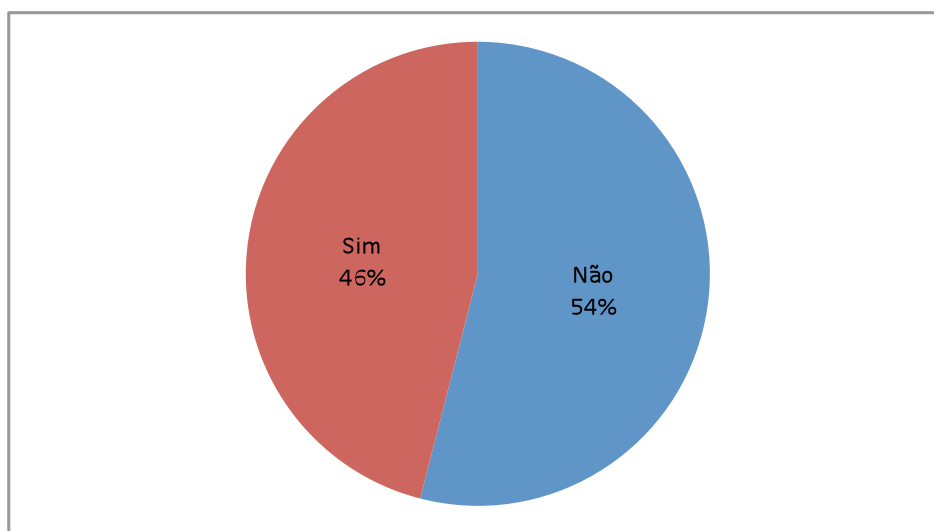
Figura 4 – Visão perspectiva das condições predisponentes para criptococose (n=33).



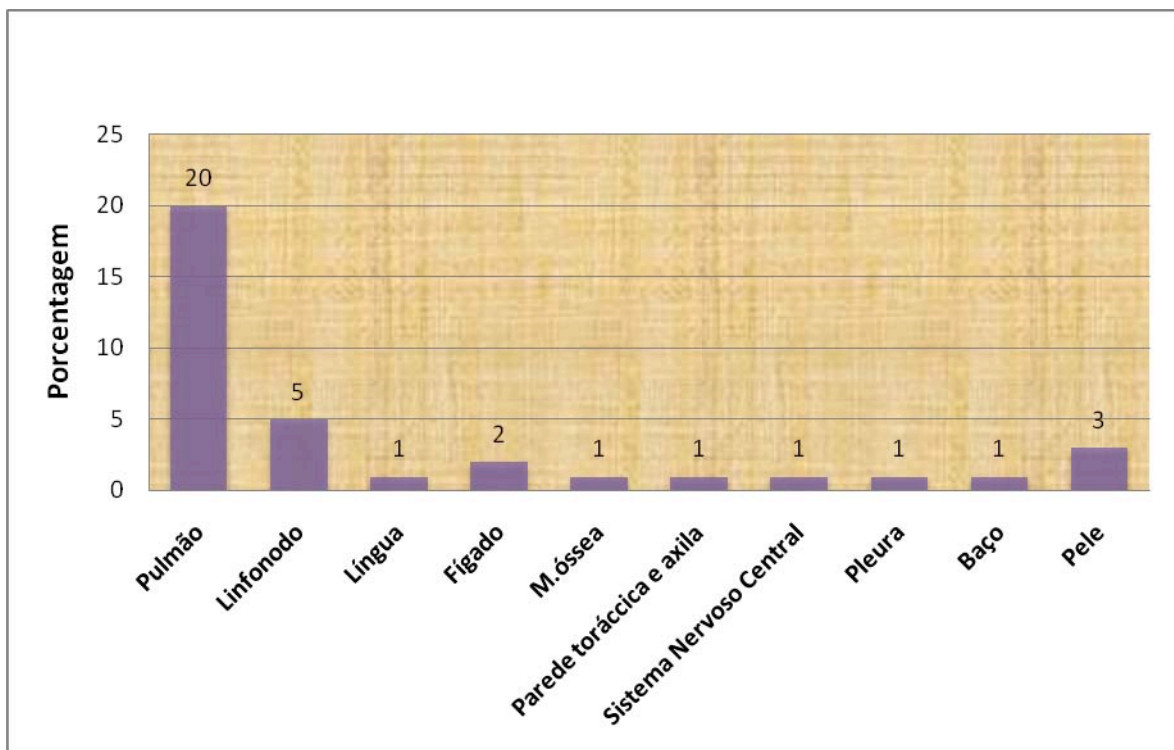
HIV: Vírus da imunodeficiência adquirida

A presença da infecção pelo HIV foi o principal fator de risco para a criptococose (Figura 3) - sendo observada em 13 (39%) dos pacientes (Figura 4). Transplante, que incluíram 4 renais e 2 pulmonares, ocupa o segundo lugar no estudo (17%) (Figura 3 e 4). Entre os pacientes transplantados, o tempo médio de aparecimento da infecção fúngica foi de 43,8 meses, com variação de 35 a 53 meses. Destaca-se a alta frequência de pacientes sem fator identificável (Figura 3 e 4). A Figura 3 informa a frequência dos fatores predisponentes no estudo. A Figura 4 apresenta o cenário em perspectiva das condições de risco desta infecção fúngica.

Figura 5 – Porcentagem da criptococose como primeira manifestação da Aids (n=13).



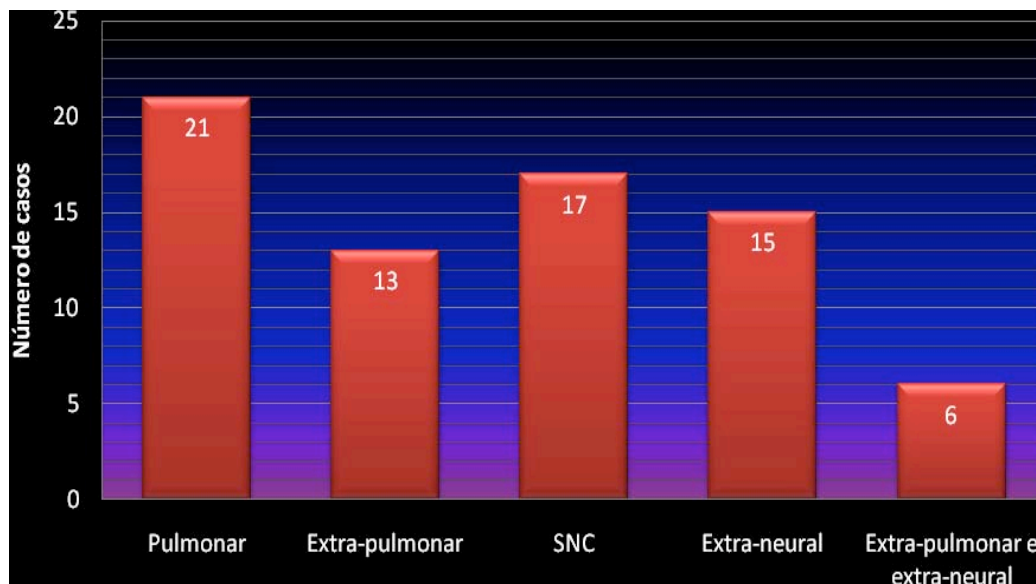
Em seis dos 13 (46%) pacientes HIV positivos, a criptococose apresentou-se como doença definidora da Aids. A Figura 5 demonstra a porcentagem entre os casos.

Figura 6 – Órgãos acometidos submetidos ao diagnóstico histopatológico.

Alguns pacientes demonstraram mais de um órgão acometido.

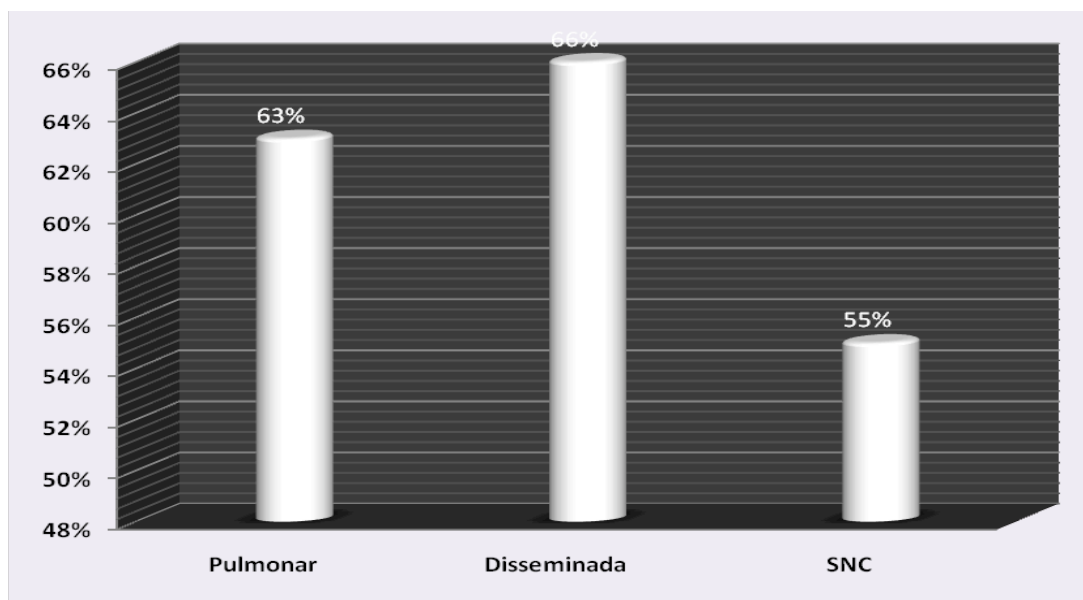
Permite-se verificar que o órgão acometido que apresentou maior frequência à histopatologia foi o pulmão (20 casos), seguido de linfonodo (5), pele (3) e fígado (2). Medula óssea, baço, SNC (Sistema Nervoso Central), língua e axila esquerda/parede torácica anterior apresentaram 1 casos cada. A Figura 6 revela o cenário dos sítios acometidos tendo como base o espécime clínico submetido a histopatologia.

Figura 7 – Tipo de envolvimento na amostra estudada (n=33).



Alguns pacientes apresentaram mais do que um sítio infeccioso.

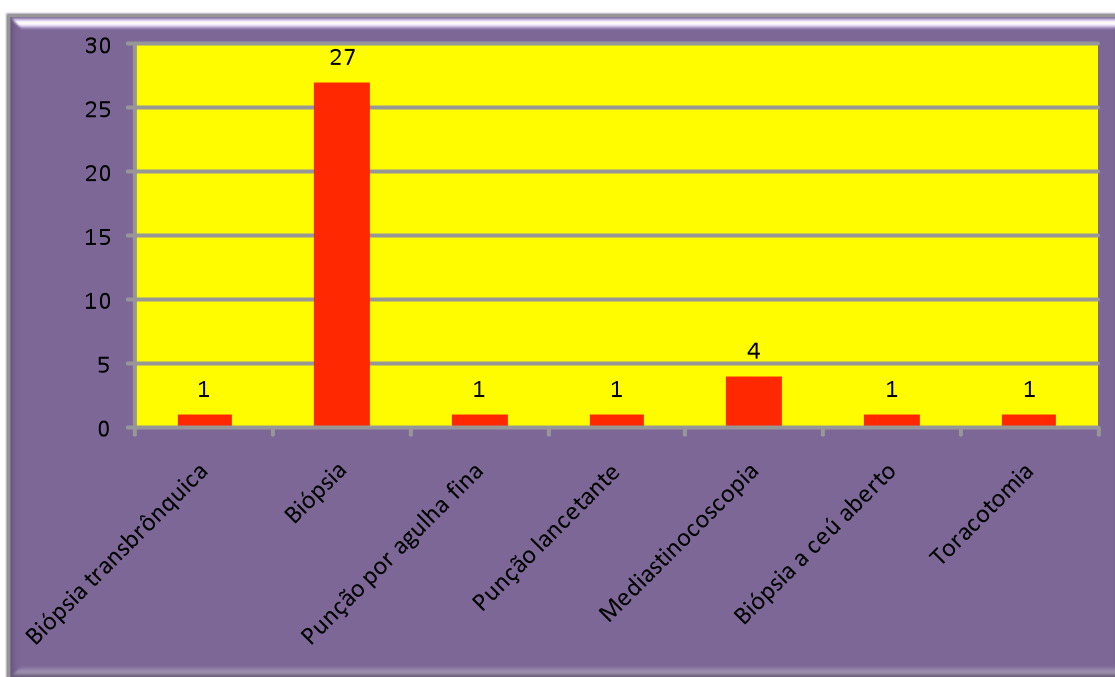
Figura 8 – Potencial disseminação da criptococose na amostra avaliada (n=33).



A Figura 7 permite-nos informar que o envolvimento pulmonar foi o tipo mais frequente (21 casos), seguido de comprometimento do SNC (17 casos). Envolvimento extra-pulmonar, extra-neural e extra-pulmonar/extra-neural revelaram 13, 15 e 6 casos respectivamente.

A Figura 8 revela que 66% dos pacientes apresentaram doença disseminada, revelando o SNC como principal sítio de disseminação (55% entre os 33 pacientes do estudo).

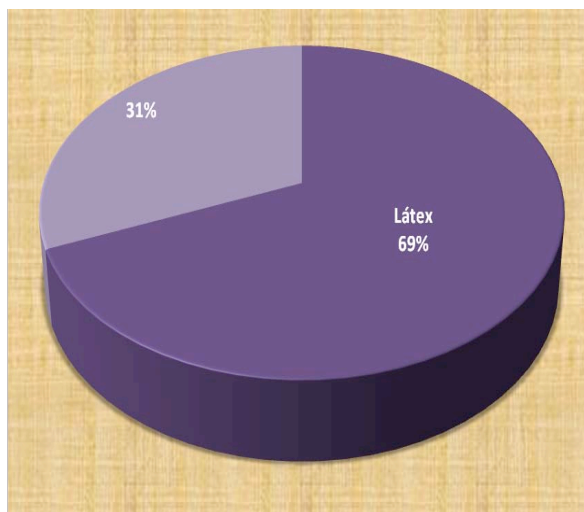
Figura 9 – Procedimentos para obtenção do espécime clínico submetidos a exame histopatológico (n=36)



Alguns pacientes apresentaram mais do que uma identificação do fungo por meio da histopatologia.

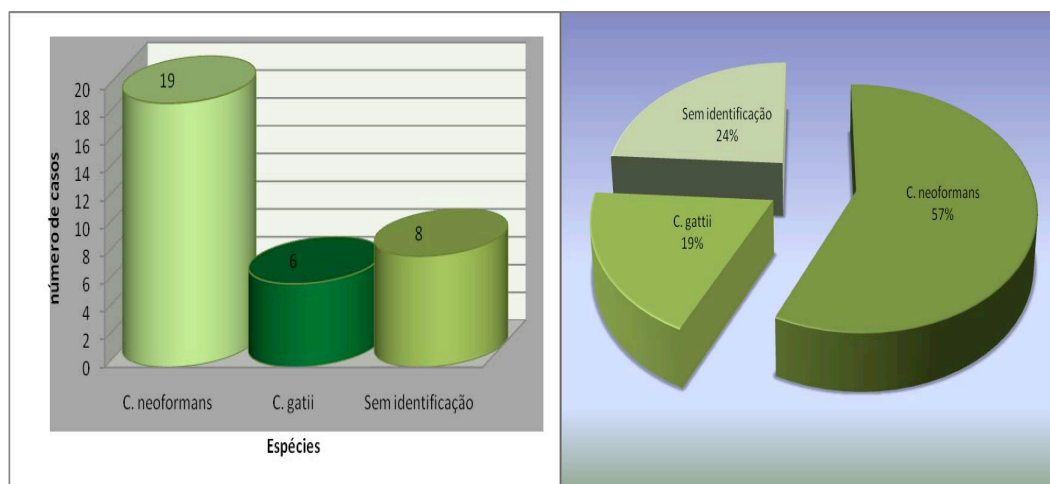
Em relação a obtenção do espécime clínico, em 27 casos os fragmentos de tecido foram provenientes de biópsia cirúrgica. O restante inclui, biópsia transbrônquica (1 caso), punção por agulha fina (1 caso), punção lancetante (1 caso), mediastinoscopia (4 casos), biópsia a céu aberto (1 caso) e toracotomia (1 caso). A Figura 9 apresenta a distribuição dos procedimentos utilizados para obtenção do espécime clínico.

Figura 10 – Porcentagem de realização do Látex na amostra estudada (n=33).



Sessenta e nove por cento (69%) dos casos apresentaram diagnóstico da criptococose também pela sorologia. Entre estes, 16 (79%) pacientes apresentaram teste positivo e 7 (21%) demonstraram resultados negativos. A Figura 10 revela a porcentagem da realização do látex na amostra analisada (n=33).

Figura 11 – Frequência e porcentagem dos casos com e sem identificação de espécies (n=33).



Entre os 33 pacientes, 25 tinham teste diagnóstico para diferenciar as espécies do complexo *Cryptococcus*. Destes, 19 casos foram identificados como *C. neoformans* e 6 casos como *C. gattii*. Oito casos não possuíram teste diagnóstico. A Figura 11 demonstra a frequência e a porcentagem dos pacientes com e sem teste diagnóstico para discriminação das espécies.

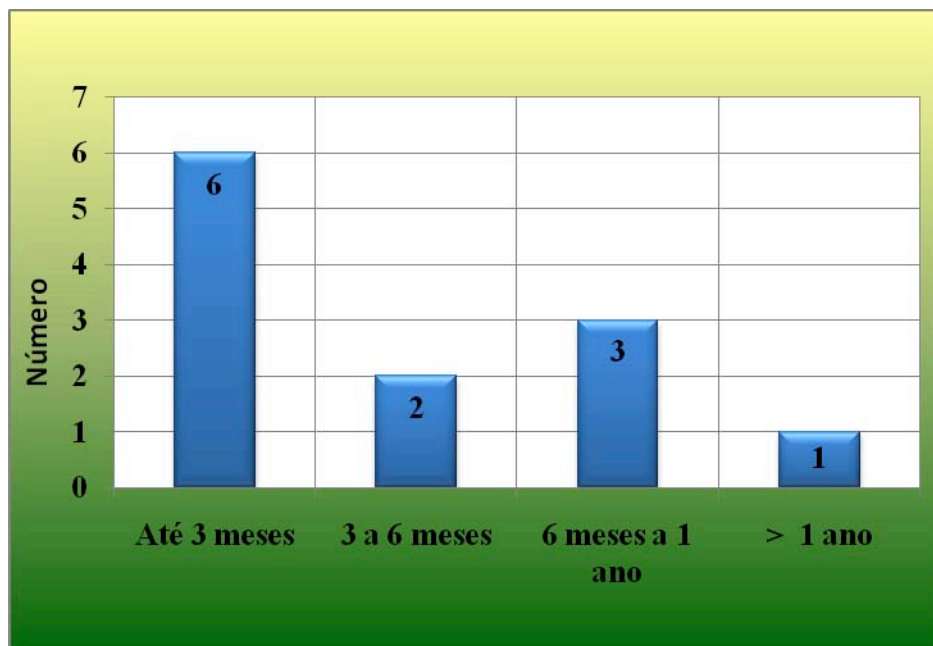
Verificou-se a relação existente entre as espécies do complexo *Cryptococcus* e a possibilidade de disseminação da doença. De acordo com o Teste Binomial, a proporção de ocorrência de doença disseminada por *C. neoformans* é significativamente diferente ($p=0.04139$) da proporção de ocorrência de doença disseminada por *C. gattii*. Estes dados indicam que a proporção de doença disseminada por *C. neoformans* é maior nesta série analisada.

Verificou-se a associação existente entre *C. neoformans/C. gattii* e imunocompetente/imunocomprometido. De acordo com o Teste Exato de Fisher, a condição *neoformans/gattii* é significativamente associada ($p=0.008696$) com a condição imunocompetente/imunocomprometido. Estes dados indicam que a espécie *neoformans* está associada a imunocomprometidos e que a espécie *gattii* apresenta evidências de estar associada a imunocompetente nos casos estudados.

Tabela 2 – Óbitos como consequência direta da criptococose na amostra estudada (n=33).

Condição	Frequência/Porcentagem
Não óbito	21 (64%)
Óbito	12 (36%)

Figura 12 – Mortes por criptococose em intervalos de tempo (n=33).



Na série analisada (n=33), a taxa de mortalidade foi de 36% (12 pacientes). A Tabela 2 revela a frequência e porcentagem dos óbitos.

O intervalo de 0 a 3 meses revelou índice equivalente a 50% (6 entre os 12 pacientes). Os intervalos 3 a 6 meses, 6 meses a 1 ano e > 1 ano apresentaram taxa de mortalidade igual a 6% (2), 9% (3) e 3% (1). A Figura 12 apresenta o número de óbitos por intervalo de tempo.

7.3 PERFIL HISTOLÓGICO

7.3.1 Coloração de Hematoxilina- Eosina

De acordo com a tabela 3, verifica-se que 22 (61%) pacientes apresentaram padrão histológico paucireativo (Figura 13A). O padrão reativo foi observado em 14 (39%) casos

(Figura 13B). Cryptococcoma, uma variante morfológica do padrão reativo esteve presente em 3 (8%) destes 14 casos.

A criptococose apresentou-se sob duas formas: gelatinosa na maioria (24, 66%) e granulomatosa (12, 34%). Padrões inflamatórios como necrose, sarcóide e supurativo foram visualizados em 20 (56%), 14 (38%) e 2 (6%) casos, respectivamente. Áreas marginais de fibrose foram presentes em 28 (77%) pacientes (Figura 14). Infiltrados inflamatórios foram observados em 100% dos casos, sendo linfocitário o mais freqüente (31, 86%) (Figura 15A), seguido de macrofágico (5, 14%) e neutrofílico (4, 11%). Revelou-se células epitelióides em 16 (44%) pacientes (Figura 15A). Detectaram-se células gigantes bem definidas em 12 (33%) casos (Figura 15B). Por sua vez, as do tipo mal definidas foram observadas em 3 (8%); todos estes apresentaram como condição predisponente a infecção pelo HIV.

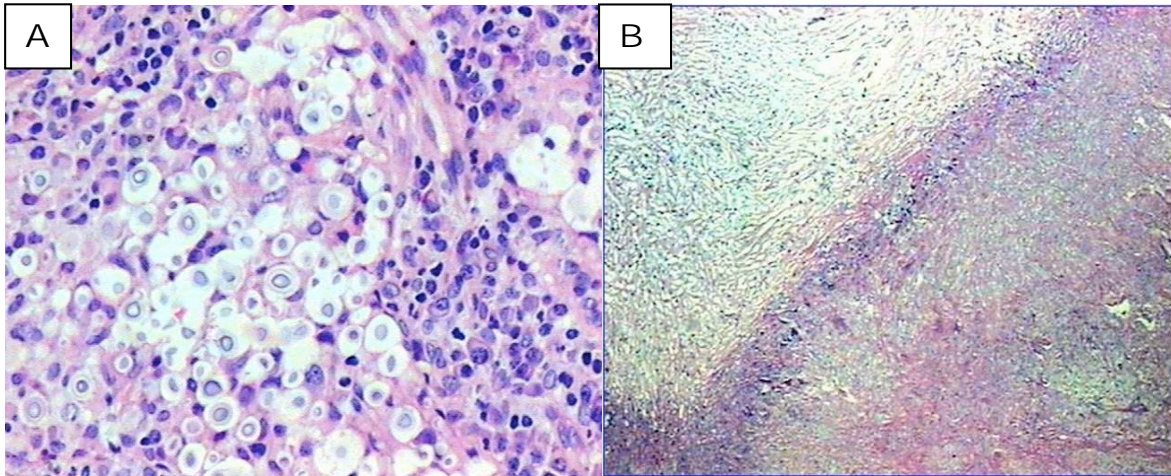
Em relação ao halo pericelular, a presença foi relatada em 23 (64%) (Figura 16A e 16B). A visualização desta característica morfológica é representativa de fungo com cápsula íntegra. Logo, em 13 (36%) casos não detectou-se halo circundante, sendo indicativo de fungo desprovido de envelope capsular. Quanto a disposição fúngica, 26 (78%) casos apresentaram localização extracelular, com elementos fúngicos dispersos pelo tecido, ou ainda em locais isolados. Em 7 (19%) as estruturas fúngicas estavam dispostas intracelulares às células gigantes (fagocitadas). Em três (8%) pacientes os agentes fúngicos foram encontrados ora no interior dos fagócitos, ora dispersos pelo tecido. Visualizou-se destruição da arquitetura tecidual em 6 (16%) casos (Figura 17).

Tabela 3 - Distribuição dos parâmetros histológicos revelados ao HE na criptococose, Laboratório de Micologia, Santa Casa/Complexo Hospitalar, 1981-2009.

Parâmetro histológico	N	(%)
Paucireativa	22	(36%)
Reativa	14	(64%)
Cryptococcoma	3	(8%)
Gelatinosa	24	(66%)
Granulomatosa	12	(34%)
Necrose	20	(56%)
Sarcóide	14	(38%)
Supurativa	2	(6%)
Fibrose	28	(77%)
Células inflamatórias		
Macrófagos	5	(14%)
Linfócitos	31	(86%)
Neutrófilos	4	(11%)
Células gigante		
Definidas	12	(33%)
Mal definidas	3	(8%)
Células epitelióides	16	(44%)
Halo pericelular		
Presença	23	(64%)
Ausência	13	(36%)
Disposição fúngica		
Intracelular	7	(19%)
Extracelular	25	(72%)
Intracelular/Extracelular	3	(8%)
Destruição tecidual	6	(16%)

Alguns pacientes tem mais de um espécime clínico, positivo para criptococose, identificado por exame histopatológico.

Figura 13 - Categoria paucireativa e reativa na criptococose.



A) Fragmento de linfonodo: paucireativa - ausência de células inflamatórias; B) Fragmento de pulmão: reativa – presença de necrose e granuloma em paliçada.

Figura 14 - Fibrose na criptococose.

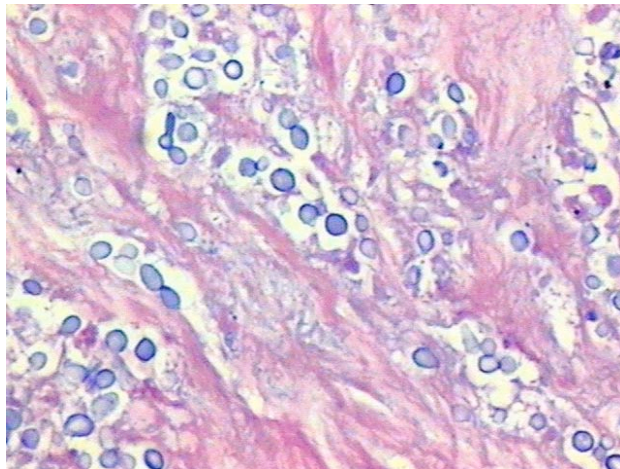
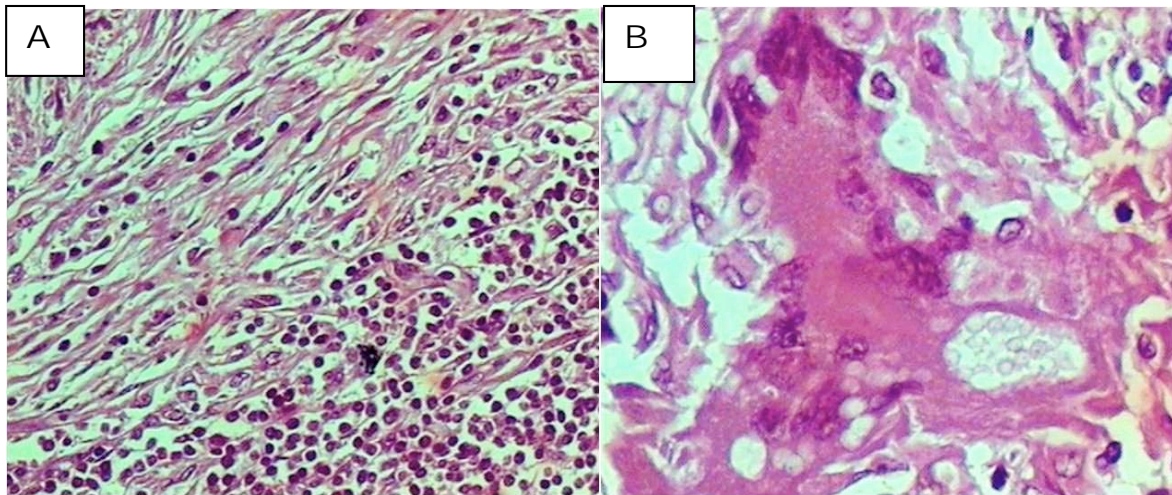
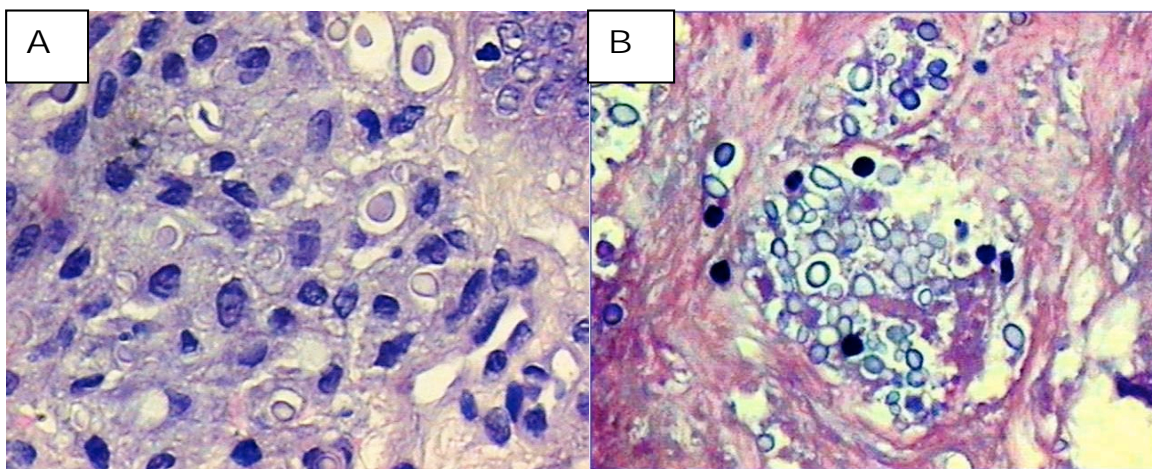


Figura 15 - Padrão inflamatório na criptococose.



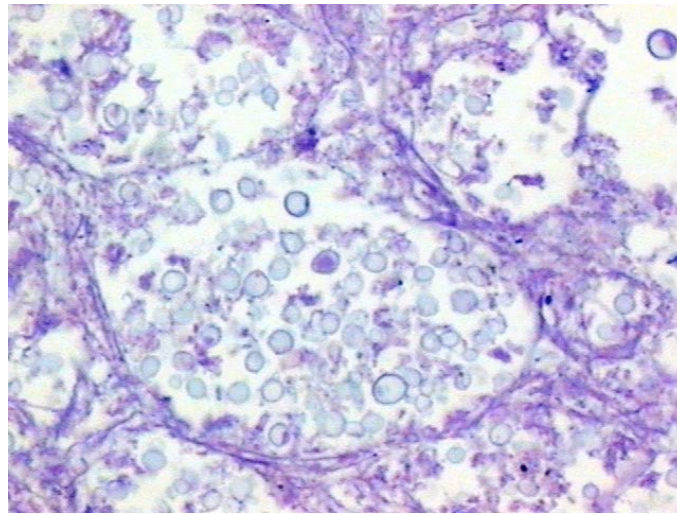
Fragmento pulmonar: A) Células epitelióides e infiltrado linfocitário; B) Célula gigante multinucleada com leveduras fagocitadas no interior

Figura 16 - Presença de halo na criptococose.



**A) Fragmento de língua apresentando estruturas com halo perinuclear de tamanho grande;
B) Fragmento pulmonar demonstrando estruturas com claro pericelular de tamanho pequeno.**

Figura 17 - Destruição total da arquitetura tecidual na criptococose.



7.3.2 Coloração pela prata

Todos os casos foram positivos pela coloração da prata.

De acordo com a Tabela 4, características indicativas da presença de cápsula foi observada em 28 (77%) casos. Detecção de cápsula íntegra com tamanho normal ocorreu em 19 (52%) pacientes (Figura 18A). A observação de halos circundantes de tamanho pequeno, sugerindo infecção por cepas deficientes de cápsula, foi detectada em 9 (35%) casos (Figura 18B). Verificou-se que em 8 (22%) pacientes há ausência total de estrutura mucopolissacarídica circundante, sugerindo presença da infecção por fungos totalmente ausentes de envelope capsular (Figura 19).

Pseudo-hifa, cadeia de leveduras brotantes, elementos semelhantes a tubo germinativo foram bem delineadas por esta coloração (Figura 20A, Figura 20B e Figura 20C; Tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição das características micromorfológicas reveladas pela coloração da prata no Laboratório de Micologia, Santa Casa/Complexo Hospitalar, 1981-2009.

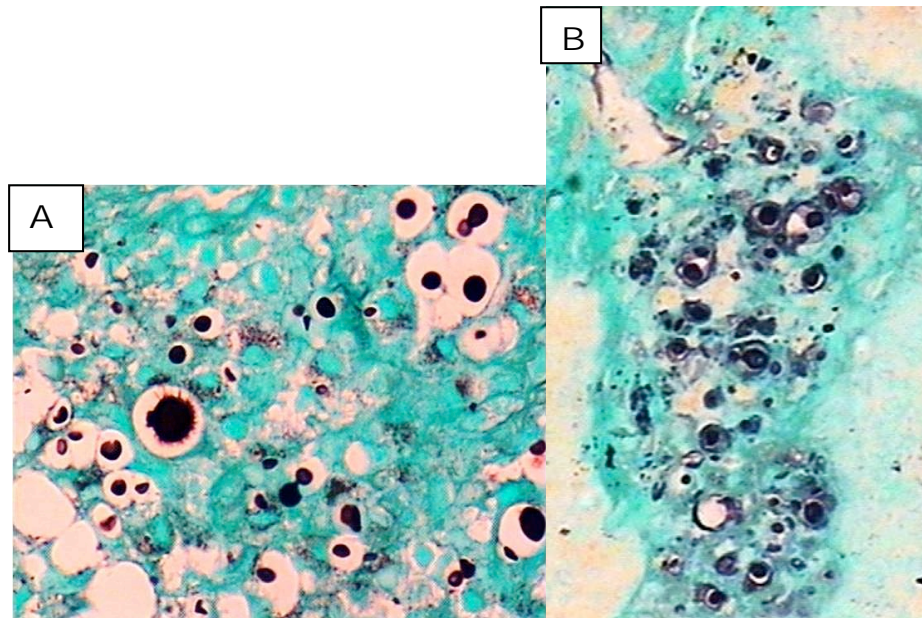
Aspectos micromorfológicos		N	(%)
Cápsula mucopolissacarídica	Presença	19	52%
	Deficiência	9	25%
	Ausência total	8	22%
Formas não-clássicas	Pseudo-hifa	3	(8%)
	Cadeia de leveduras brotantes	1	(3%)
	Tubo germinativo	1	(3%)

A escala de quantificação fúngica nos cortes corados pela coloração pela prata utilizada para quantificação do número de micro-organismos variou de + a +++++. O IB calculado apresentou valor de 0 a 22. A tabela 5 expressa a distribuição da quantificação dos elementos fúngicos.

Tabela 5 - Distribuição da quantificação dos elementos fúngicos realizados pela coloração de GMS.

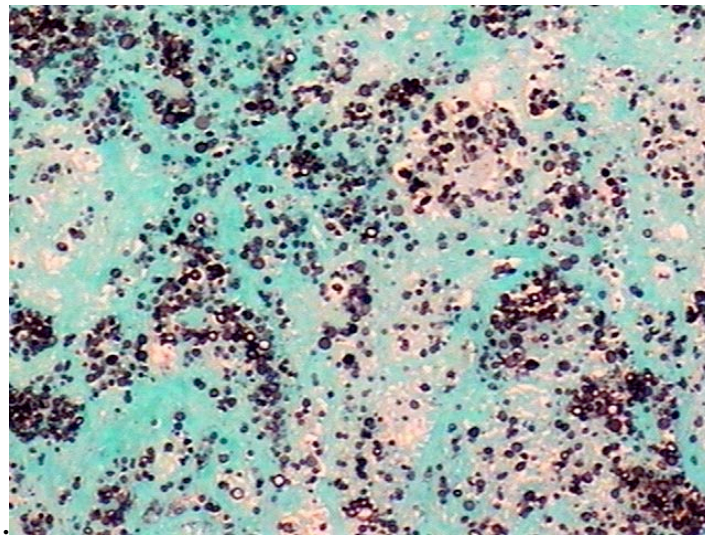
Escala	Ocorrência dos casos
+	4 (11%)
++	11 (30%)
+++	9 (25%)
++++	12 (33%)

Figura 18 - Tamanho do halo perinuclear na criptococose



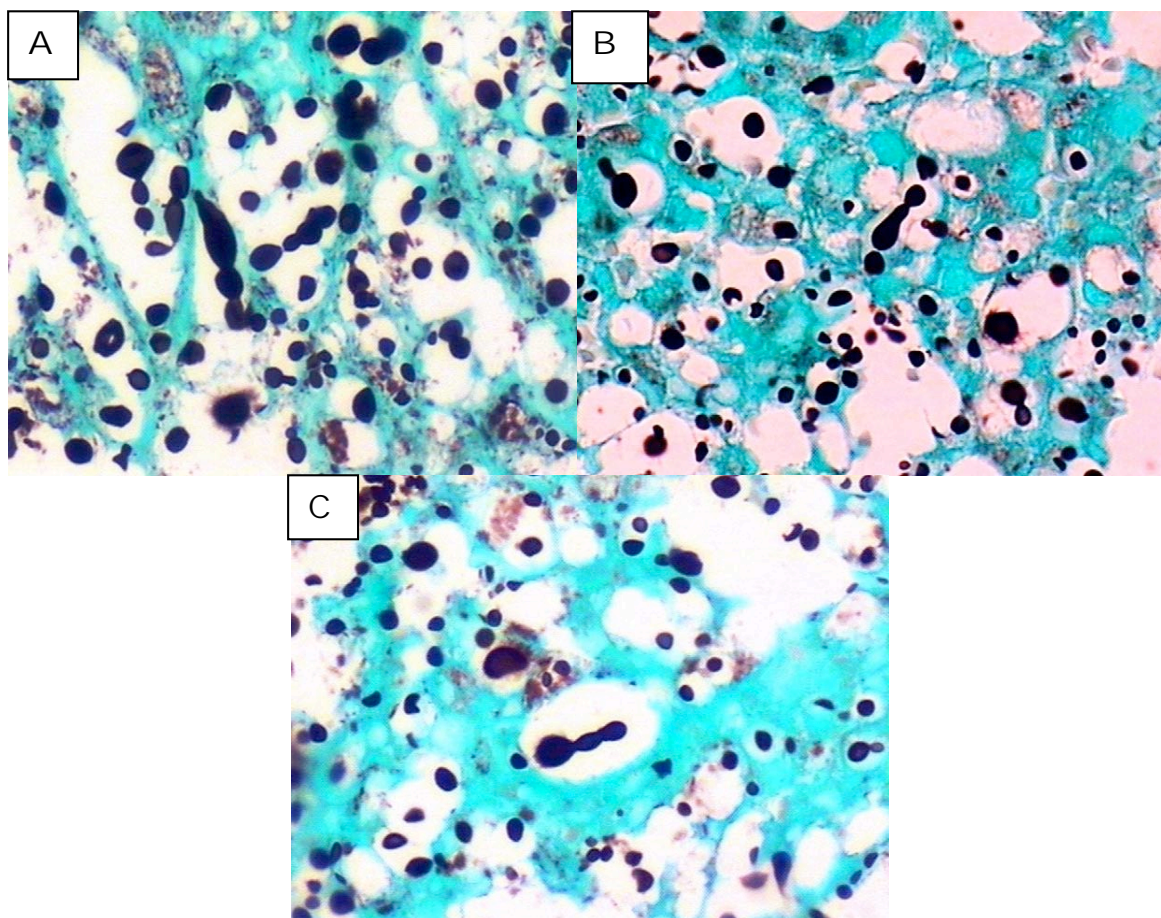
- A) Fragmento de linfonodo apresentando leveduras com halo claro perinuclear bem definido;
B) Fragmento da língua, mostrando leveduras com tamanho pequeno.

Figura 19 - Criptococose por fungo totalmente deficiente de cápsula.



Fragmento de linfonodo apresentando leveduras totalmente desprovidas de material capsular.

Figura 20 - Formas não-clássicas do *Cryptococcus*.



Fragmento de linfonodo em paciente HIV positivo. A) Pseudo-hifa; B) Estruturas semelhantes a tubo germinativo; C) Cadeia de leveduras brotantes. As figuras A, B e C também apresentam formas usuais com cápsula bem definida.

7.3.3 Coloração de Mucicarmim de Mayer

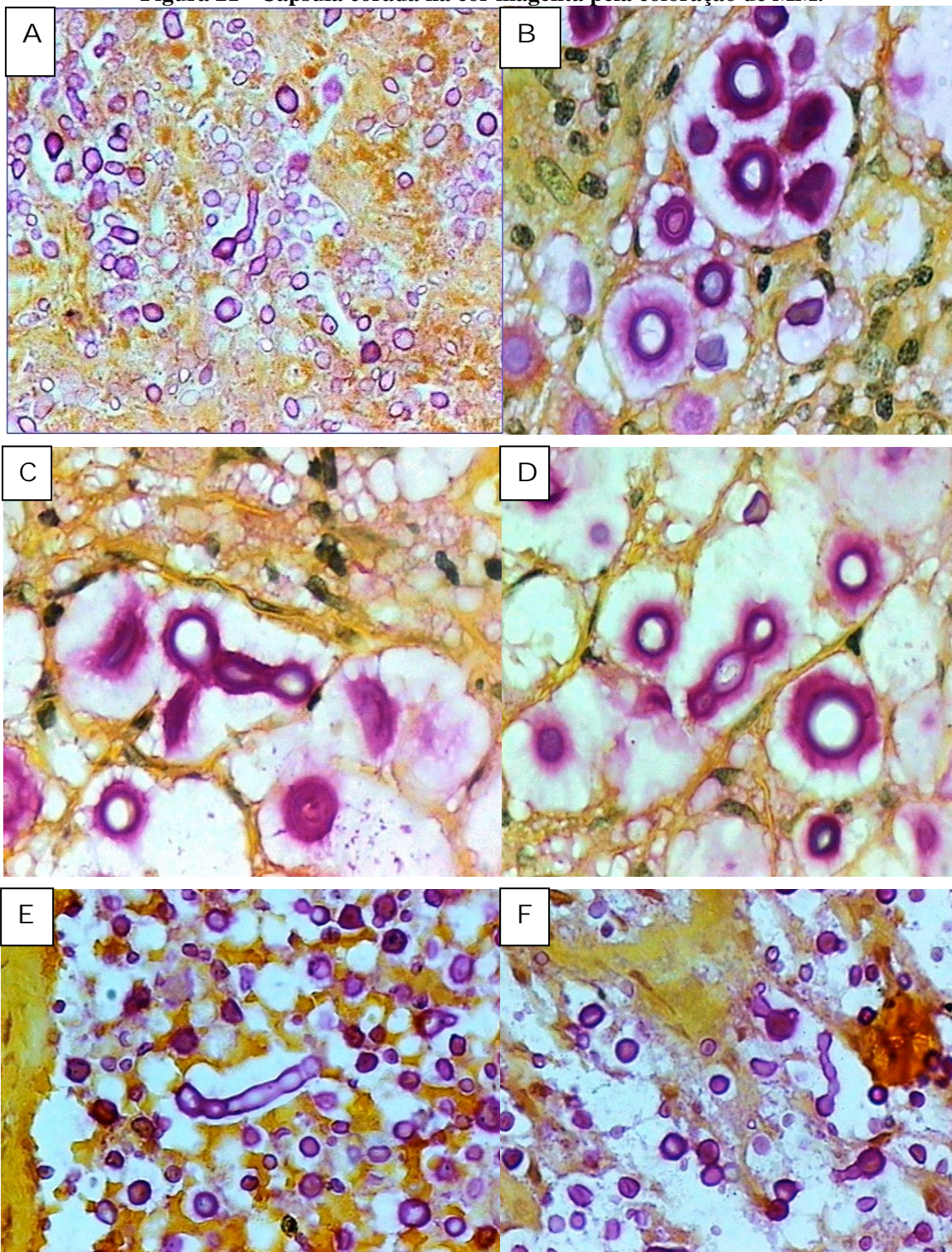
O cálculo do número de micro-organismos por meio da coloração de MM variou de 0 a +++. O escore 0 esteve presente em 8 (22%) pacientes. Nestes, o diagnóstico da criptococose foi considerado inconclusivo. Esses casos compreendem isolados clínicos deficientes ou totalmente ausentes de cápsula. A Tabela 6 revela a distribuição dos casos e dos escore. A Figura 21A mostra pseudo-hifa com material polissacarídico de tamanho pequeno. A Figura 21B apresenta as leveduras com cápsula corada na cor magenta. A Figura 21 C e D apresenta as leveduras em cadeia. A Figura 21E apresenta pseudo-hifa.

A quantificação do IC compreendeu-se em um intervalo de 0 a 4. Este é diretamente proporcional a existência e ao tamanho do polissacarídico capsular corado pela cor magenta.

Tabela 6 – Frequência entre os casos e escala pela coloração de MM.

Morfotipos	Escala	Distribuição dos casos
Sem cápsula	0	8 (22%)
Cáspular	+	10 (28%)
	++	4 (11%)
	+++	6 (17%)
	++++	8 (22%)

Figura 21 - Cápsula corada na cor magenta pela coloração de MM.

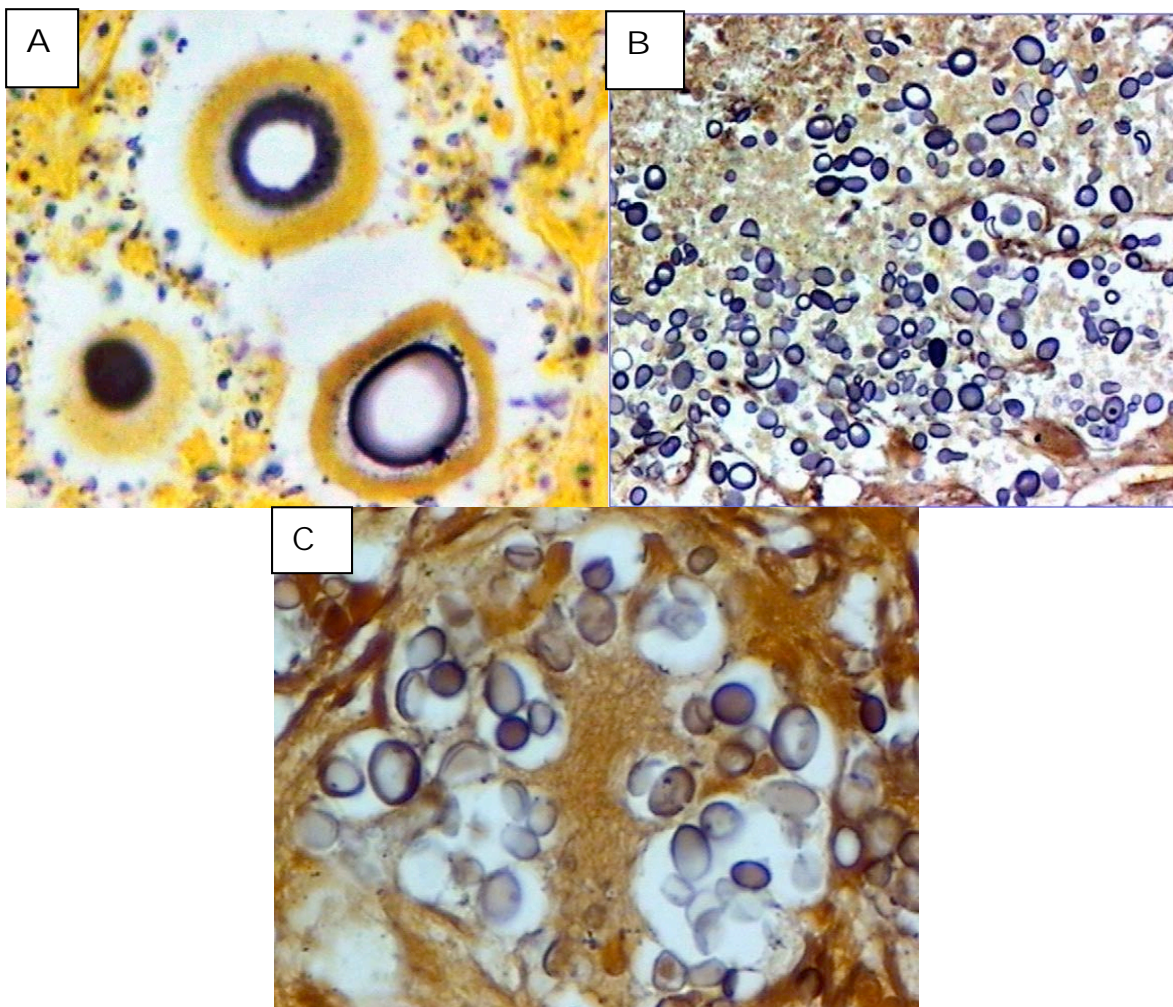


A) Fragmento de baço apresentando levedura com cápsula pequena e pseudo-hifa corada na cor magenta; B) Fragmento de lesão tumoral na axila esquerda mostrando *Cryptococcus gattii* com cápsula grande intensamente corada; C e D) Cadeias de leveduras brotantes em lesão tumoral da axila esquerda; E e F) Pseudo-hifa em biópsia de linfonodo.

7.3.4 Coloração de Fontana-Masson

Em 100% das amostras, n=36, a coloração de FM revelou-se positiva. A reação para pigmentos de melanina na parede celular fúngica em todos estes casos apresentou independência quanto a existência (Figura 22A) ou ausência (Figura 22B e Figura 22C) e tamanho do polissacarídico capsular.

Figura 22 - Coloração de Fontana-Masson na criptococose.



A, B e C) Fragmentos de pulmão de 3 pacientes transplantados pulmonares.

7.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA

7.4.1 Criptococose reativa e paucireativa

Na categoria reativa, os números de micro-organismos variaram de escassos (+) a abundantes (++++). Estes casos apresentaram escore +++ (7 casos) como o mais freqüente (Figura 23). A média do IB dos organismos foi 8,64 brotamentos (intervalo de 0 a 20). O IC mostrou variação, apresentando quantificações baixas, sendo o escore mais freqüente o + (6 casos) (Figura 24A) . Quatro casos demonstraram IC igual a zero (Figura 24B).

A Tabela 7 revela a atividade biológica na criptococose reativa.

A categoria paucireativa houve predomínio dos escores mais altos. Nove casos apresentaram o escore ++, seguido de 8 casos o escore ++++ (Figura 25). Logo, verifica-se grande número de leveduras nas lesões, quando comparados a categoria reativa. A média do IB foi 6,0 brotamentos (intervalo amplo de variação entre 0 a 22); em muitos casos apresentou menos que 5% de formas brotantes. O IC mostra uma maior quantificação, quando comparados a categoria reativa (Figura 26A, 26B, 26C, 26D). Nesta categoria, muitos casos apresentaram alta quantificação de IB, os quais também revelaram alta quantificação de IC.

A Tabela 8 apresenta a atividade biológica na criptococose paucireativa.

Tabela 7 - Atividade biológica na criptococose reativa por meio de IB e IC.

Casos	Espécime clínico	Número de micro-organismos	IB	IC
1	Pulmão	++++	15	0
2	Pulmão	+++	5	+
3	Pulmão	++	2	+++
4	Pulmão	+++	15	++++
5	Pulmão	++++	20	0
6	Pulmão	+++	15	0
7	Pulmão	+++	8	+
8	Pulmão	+	4	+
9	Pele	+++	3	+
10	Pulmão	++	2	++++
11	Pulmão	++++	12	+
12	Pulmão	++++	16	+
13	Pulmão	+++	4	0
14	Pulmão	+++	0	++++

Tabela 8 - Atividade biológica na criptococose paucireativa por meio de IB e IC.

Casos	Espécime clínico	Número de micro-organismos	IB	IC
1	Pulmão	++	2	++++
2	Pulmão	++	5	+
3	Pulmão	++	2	+++
4	Axila esquerda e parede torácica anterior	++++	4	++++
5	Pulmão	++	7	++
6	Medula	++	2	++
7	Baço	+++	12	+++
8	Pulmão	++	2	0
9	Linfonodo	++	7	++++
10	Linfonodo	++++	4	+++
11	Língua	+	1	++
12	Pele	++++	1	0
13	Pele	++++	4	0
14	Pulmão	+++	3	+++
15	Pulmão	++	5	+++
16	Linfonodo	++++	3	0
17	Linfonodo	++++	19	++++
18	Linfonodo	++++	22	++++
19	Fígado	++++	0	+
20	Linfonodo	++	12	++
21	Fígado	+	0	+
22	Linfonodo	+	10	+

Figura 23 – Quantificação de elementos fúngicos em fragmento pulmonar corado pelo GMS, evidenciando-se o padrão correspondente ao escore +++.

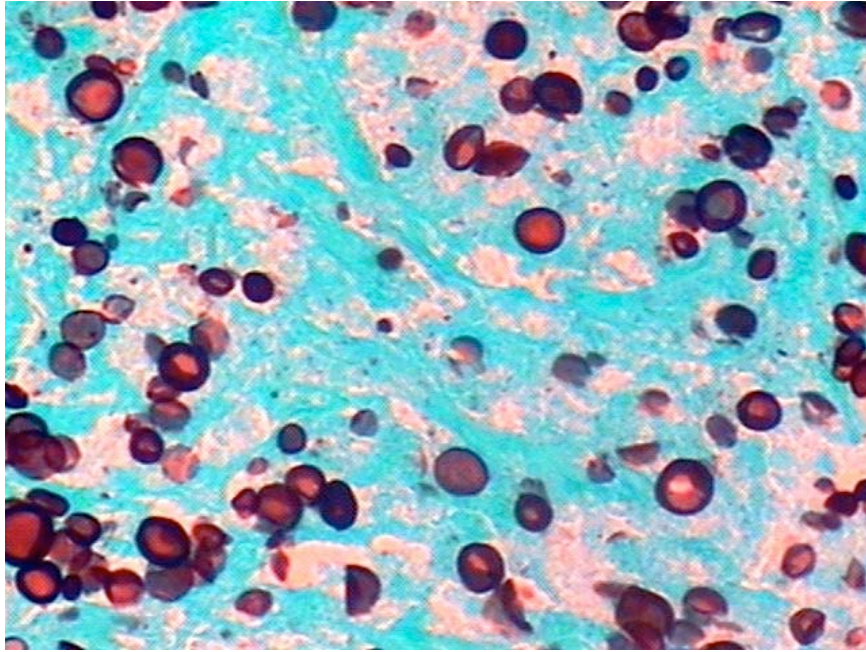
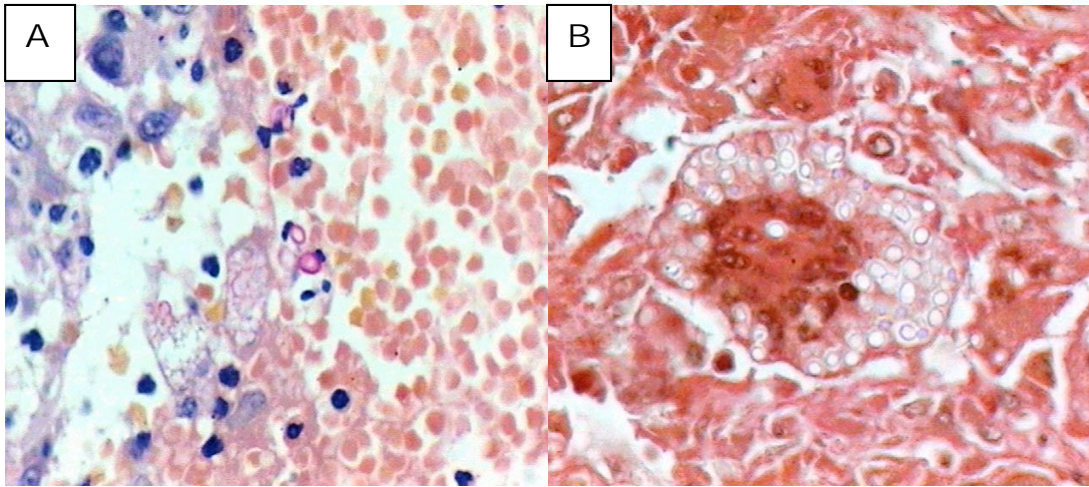
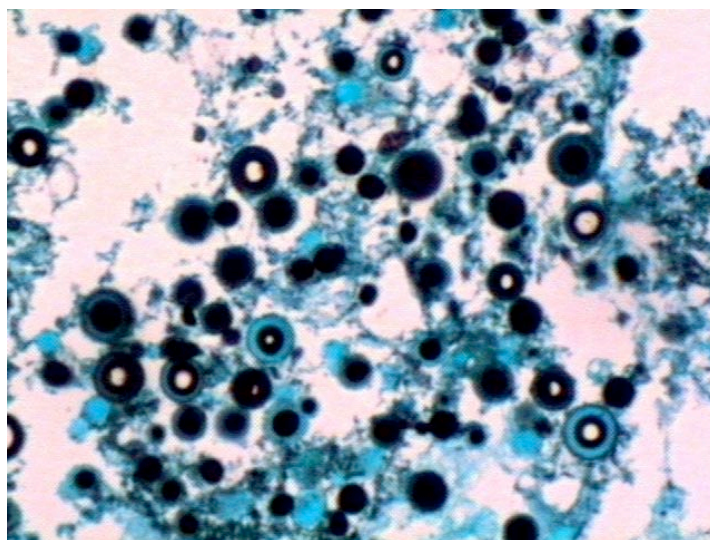


Figura 24 - Índice carminofílico na criptococose reativa.



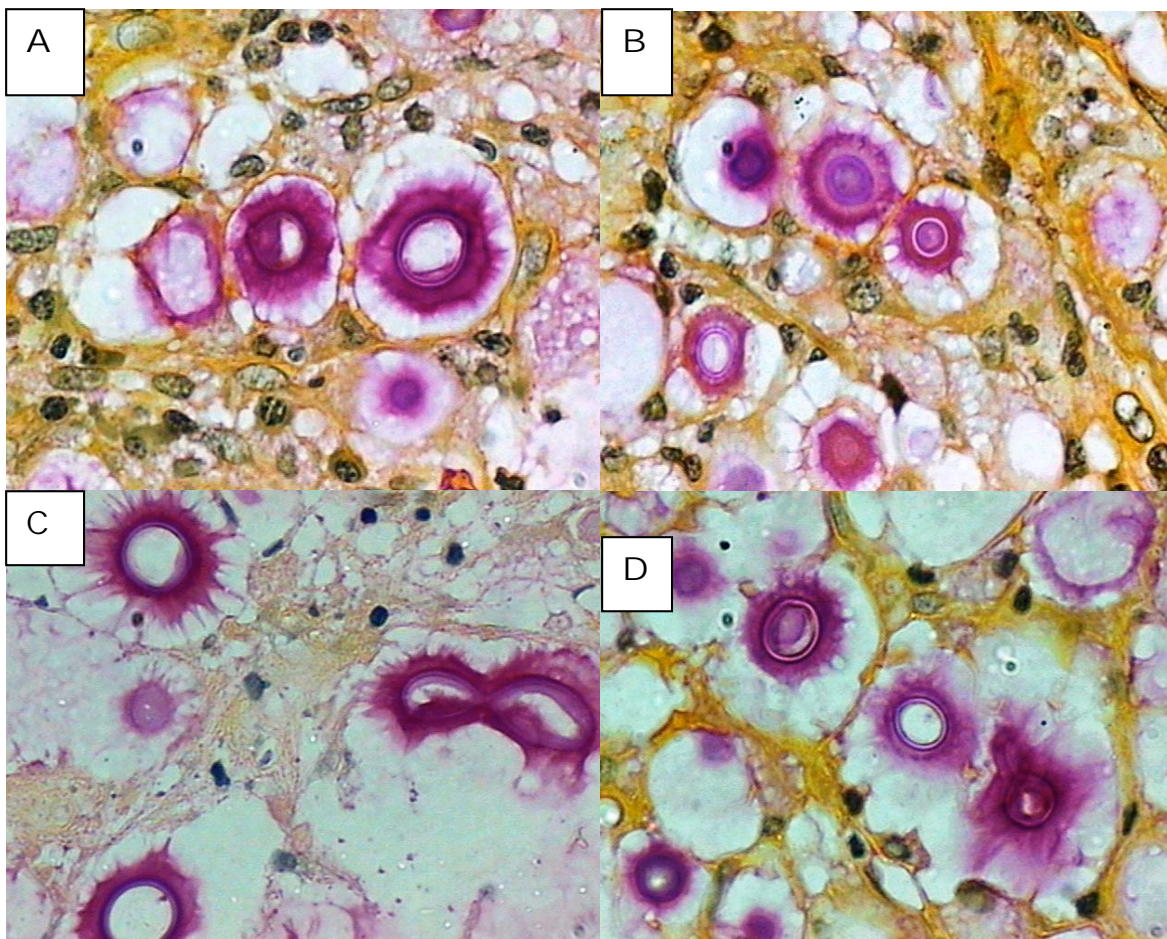
A) Fragmento de linfonodo apresentando IC igual a 1; B) Fragmento de pulmão demonstrando leveduras com IC igual a zero (resultado insatisfatório).

Figura 25 - Número de micro-organismos e IB por meio da coloração da prata.



Fragmento de pele: Número de organismos igual a ++++; IB igual a 6.

Figura 26 - IC por meio da coloração de MM na criptococose paucireativa.



Fragmentos de lesão tumoral na axila esquerda e parede torácica anterior. A, B e D apresentam IC igual a 4; C demonstra IC igual a 4 e levedura brotante.

8 DISCUSSÃO

8.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE DADOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS ESTUDADOS

Como observado por outros autores (COLOM et al., 2001; DIAZ et al., 2005; MIRZA et al., 2003), pacientes do sexo masculino foram predominantes no nosso estudo. Na era da Aids, a criptococose acompanha a distribuição de sexo na infecção do HIV. Por sua vez, o sexo masculino comporta-se como uma condição predisponente. No entanto, com a feminização mundial da Aids, esta situação está sujeita a alterações. Em pacientes sem Aids mantêm-se o predomínio de homens porém, em uma proporção menor.

A predominância da criptococose na terceira e quarta década de vida, coincide com a média de idade, na qual a HIV é mais prevalente, o que corresponde a 39% dos nossos pacientes. Ainda constituem os dois extremos de idade: o inferior, pacientes pediátricos acometidos por *C. gattii*; e o superior, casos que demonstram condições clínicas da quinta e sexta década de vida, como doenças oncológicas e transplantes. Um outro importante fator predisponente associado é o uso de drogas imunossupressoras (GAL et al., 1986; JARVIS & HARRISON, 2008).

De acordo com o MINISTÉRIO DA SAÚDE (1999), a criptococose ocorre como primeira manifestação oportunista em cerca de 4,4% dos casos de Aids no Brasil. No nosso estudo, o índice foi elevado, sendo esta característica observada em 46% da série.

O pulmão é a porta de entrada para a infecção fúngica, sendo o órgão mais frequentemente envolvido. O envolvimento pulmonar varia desde infecção nodular assintomática a síndrome de dificuldade respiratória grave (ARDS) (SUBRAMANIAN, 2005). Após a inalação do fungo, é desencadeada uma resposta imune, elemento que determina o curso da infecção (CAMERON et al., 1991). O organismo apresenta uma predileção especial para o SNC (neurotropismo), indicando disseminação fúngica via hematogênica. Dependendo deste comprometimento revela-se os quadros da doença: meningite, encefalite ou meningo-encefalite. A maioria dos casos apresentam-se como meningite. Em um estudo no Brasil sobre complicações neurológicas em pacientes HIV

positivos, o *Cryptococcus* foi responsável por 12,9% delas. Manifestações extrapulmonares e extraneurais também são observadas, especialmente naqueles infectados pelo HIV ou naqueles em terapia imunossupressora. Linfonodos (GAZZONI et al., 2009; WITT, 1987), mucosa oral (GAZZONI et al., 2009; SAMARANAYAKE, 1992), pele (DORA et al., 2006; MOE et al., 2005; REVENGA et al. 2002), baço (CASADEVALL & PERFECT, 1998), fígado (GOLLAN et al., 1972; PROCKNOW et al., 1965) e medula (CASDEVALL & PERFECT, 1998) também são sítios alvos da disseminação do *Cryptococcus*.

Entre os principais métodos de obtenção do espécime clínico está a biópsia cirúrgica. Destaca-se nesta série a ausência de espécime clínico oriundos de necropsia.

A detecção do antígeno capsular do *Cryptococcus* pela aglutinação do látex é realizada no sangue, urina, líquido (LCR) e lavado brônquico alveolar (LBA). Na prática clínica, a detecção do antígeno é feita no LCR e no soro. Estes dois últimos são positivos em mais de 90% dos pacientes com meningite criptocócica. Testes negativos são reflexos da deficiência de material capsular, já que o teste tem capacidade de detectar concentrações de polissacarídeo capsular maiores que 10 ng/mL (CASADEVALL & PERFECT, 1998).

O complexo de espécies *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* apresenta habilidade de crescimento a 37° C. As colônias revelam aspectos mucóides (dependendo do tamanho da cápsula), de coloração que varia de branca a creme, dentro de 48-72 horas, após cultivo em meios para fungos – SAB a 25° C e BHI a 37° C (MITCHELL & PERFECT, 1995). A discriminação entre as espécies do complexo está baseada na reação de coloração quando do crescimento em canavanina-azul de bromotimol (CGB) (BOVERS et al., 2008). À histopatologia as diferenças existentes entre estas espécies são sutis. Todos os casos identificados como *Cryptococcus gattii* apresentaram IC igual a +++++, sugerindo que o *Cryptococcus gattii* apresenta cápsula de tamanho maior, quando comparada ao *Cryptococcus neoformans*. As lesões pela espécie *gattii* revelaram-se nodulares ou como massas, ou ainda tumorais bem delimitadas e usualmente não associaram-se a disseminação para vários órgãos do corpo, fator este associado ao *C. neoformans* (BOVERS et al., 2008; SEVERO et al., 1999; SEVERO et al., 1998).

A mortalidade na criptococose é elevada. Sem tratamento a sobrevida é baixa. Durante o curso terapêutico inicial 10-25% dos pacientes morrem, sendo a mortalidade de 30-60% no primeiro ano (POWDERLY, 1993). Os parâmetros clínicos e laboratoriais

preditores de morte durante a terapia inicial incluem alterações do estado mental, títulos antigênicos no líquido superior a 1:1024 e contagem de linfócitos no líquido inferior a 20 células/ μ L (SAAG et al., 1992). A hipertensão diastólica, provavelmente reflexo da hipertensão intracraniana, também está associada a morte precoce nestes doentes (FAN-HARVARD P, 1992). A manutenção da infecção depende do estado imunológico do hospedeiro, da forma da doença e do tratamento (GUIDELINE IN CRYPTOCOCCOSIS, 2008). Na nossa casuística, até os três primeiros meses o óbito ocorreu em 50% dos pacientes. Aponta-se que a criptococose é uma doença fatal e aguda e que se não diagnosticada e tratada adequadamente sua expectativa de vida é inferior a 3 mês.

8.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE A AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Várias colorações histoquímicas são empregadas na identificação dos agentes fúngicos. A coloração de HE é útil no rastreamento fúngico, na observação das alterações estruturais das lesões, bem como das reações teciduais (GAZZONI et al., 2008).

Conforme estudos de BAKER (1976) e SCHWARTZ (1988), sobre associação entre estado imune e achados histológicos, granulomas imunológicos associam-se a imunocompetentes. Imunocomprometidos tendem a apresentar aspecto difuso, lesões gelatinosas e reação paucireativa (SHIBUYA et al., 2005). É importante valorizar o estado imunológico do paciente, já que o seu déficit condiciona o grau de resposta inflamatória. Ainda há uma série de fatores que favorecem a observação das tais características teciduais como: virulência, quantidade de células fúngicas e coexistência com outras enfermidades (ARTAL, 2004).

A coloração pela prata é útil no estudo da micromorfologia fúngica (GAZZONI et al., 2008). A quantificação de IB é realizada através desta coloração, indicando replicação *in vivo*, o qual serve de base para a quantificação da atividade biológica da criptococose (SCHWARTZ, 1988). Na casuística estudada, esta colorações identificou uma variação do tamanho do espaço perinuclear sugestivo de cápsula.

As espécies de *Cryptococcus* raramente produzem pseudo-hifa (GAZZONI et al., 2009). A ausência desta característica é um dos critérios propostos para a identificação do *Cryptococcus* e um dos principais aspectos utilizados para diferenciar a criptococose da candidose (GAZZONI et al., 2009). Em uma revisão em pacientes com Aids, os autores sugerem que a distinção entre o *Cryptococcus* e as espécies de *Candida* está baseada na presença da cápsula do *Cryptococcus*, na forma esférica da levedura, pelos brotamentos em estreita base e pela ausência de pseudo-hifa (GALL et al., 1986). No entanto, como mostramos neste trabalho, características não-usuais como pseudo-hifa, cadeias de leveduras brotantes e estruturas semelhantes a tubo germinativo, além elementos leveduriformes deficientes de cápsula foram identificados durante a infecção. Essas características são facilmente evidenciadas pelas técnicas especiais de GMS e MM (salvo as estruturas desprovidas de material capsular pelo MM), realizada tanto em esfregaços como em cortes de tecidos (GAZZONI et al., 2008; GAZZONI et al., 2009).

Entretanto, algumas colorações histoquímicas possuem seletividade a determinados agentes fúngicos, sendo estas utilizadas para diagnóstico diferencial. O diagnóstico da criptococose sustenta esta hipótese. A coloração de MM detecta a cápsula mucopolissacarídica da levedura. Quantificação dos IC é realizada por meio desta coloração, e indica síntese capsular *in vivo*, que juntamente com o IB formam a escala que determina a atividade biológica da criptococose. Na coloração de FM, utilizada nos resultados inconclusivos pelo MM, quando da infecção por *Cryptococcus* deficiente de cápsula. Estas técnicas são específicas para o diagnóstico deste fungo e devem ser utilizadas em associação ao HE e a coloração pela prata. Este protocolo de colorações sustenta a distinção do *Cryptococcus* de outros organismos similares em tamanho e forma. A tabela 9 apresenta as características morfológicas de algumas leveduras e de algumas formas leveduriformes permitindo a comparação com a micromorfologia do *Cryptococcus*.

Tabela 9 - Características micromorfológicas das leveduras.

Organismos	Tamanho	Forma	Brotamentos	Pseudohypha/ Hifa	Núcleo	Parede celular	Mucicarmino stain
<i>Coccidiodes</i>	Esférulas- Endosporos 2-5 µm	Esféricos a ovais	Endosporos	Raros	Único	Grosseira	Negativo
<i>Histoplasma capsulatum</i>	2-4 µm	Ovais	Raramente com brotamento únicos	Não	Único	Grosseira	Negativo
<i>Cryptococcus</i>	2-20 µm	Esféricos a ovais	Únicos ou múltiplos	Formas não- clássicas	Único	Capsular Desprovido* de cáspula	Positivo Inconclusivo*
<i>Candida SP</i>	2-6 µm	Esféricos a ovais	Únicos, múltiplos, cadeias	Usualmente	Único	Grosseira	Negativo
<i>Candida glabrata</i>	2-5 µm	Esféricos a ovais	Únicos	Ausente	Único	Grosseira	Negativo

*: Indicação para o uso da coloração de Fontana-Masson sustentando a hipótese de diagnóstico diferencial; µm: micrometros.

8. 3 CONSIDERAÇÕES SOBRE ATIVIDADE BIOLÓGICA

Nos 22 casos da infecção paucireativa estudados, todos demonstraram ausência de células inflamatórias, bem como grande número de leveduras dispersas nos tecidos. Estas

informações indicam alteração na resposta imune celular. A maioria dos casos apresentam altos ICs. Este dado suporta a hipótese de que os elementos fúngicos estejam viáveis nestas lesões, já que há ausência de células inflamatórias e de fagocitose, que na sua presença promoveriam a morte fúngica. Dessa forma, há uma relação inversa entre alta produção capsular e menor intensidade da resposta inflamatória (CASADEVALL & PERFECT, 1998; PERFECT & CASADEVALL, 2002; SCHWARTZ, 1998).

O IB apresentou variação e muitos casos demonstraram menos que 5% de formas brotantes, suportando o fato de que o IB é análogo ao índice mitótico das células dos mamíferos, sendo indicativo da atividade divisional das leveduras (SCHWARTZ, 1988), que por sua vez, variaram, mas que apresentou-se relativamente diminuída na infecção paucireativa. Atividade criptocócica nos tecidos é afetada pela grande carga fúngica, e que após promoverem a destruição total da arquitetura tecidual, essa atividade divisional das leveduras estabilizam-se (ARTAL, 2004; SCHWARTZ, 1988). Esta afirmação é semelhante àquela presente na população fúngica nos cultivos. Muitos organismos apresentam fase logarítmica de crescimento e após o pico, a densidade fúngica tende a se equilibrar (SCHWARTZ, 1988).

Dos 14 casos da infecção reativa estudados, todos apresentaram resposta granulomatosa caracterizada pela presença de células gigantes, variável infiltração inflamatória e fibrose. Estas características demonstram-se em proporções variáveis. Comparados a categoria paucireativa, as leveduras apresentaram-se intracelulares aos histiócitos e células gigantes, consistente com resposta imune ativa e fagocitose efetiva. A variação do IB e IC, influenciada pela intensidade e duração da resposta inflamatória, determina a viabilidade e a atividade divisional das leveduras (CASADEVALL & PERFECT, 1998; SCHWARTZ, 1988). Nesse contexto, a resposta granulomatosa associa-se ao controle da infecção (SCHWARTZ, 1988; PERFECT & CASADEVALL, 2002). Os quatro casos de IC igual a zero é reflexo da presença de fungos deficientes de cápsula, estes demonstraram altas quantificações de IB. Há inviabilidade fúngica naqueles casos em que há baixas quantificações de IC e IB.

9 CONCLUSÃO

Neste trabalho, descreveu-se os aspectos histopatológicos da infecção criptocócica através das técnicas básicas de HE e GMS, bem como das colorações especiais de MM e FM. Além disso, comprovou-se a eficácia das colorações histoquímicas, que devem ser utilizadas em conjunto.

No que diz respeito a atividade biológica da doença, a interpretação dos sítios infecciosos pelas técnicas de GMS e MM, servem de base para quantificação dos índices de brotamento e carminofílico. Estes índices são representativos da atividade divisional da levedura e da síntese capsular do microrganismo, respectivamente. Dessa forma, estes índices devem compor os laudos médicos, oferecendo informações adicionais, que contribuem para o tratamento e manutenção da infecção.

Nesse contexto, a histopatologia transforma-se um dos principais métodos de diagnóstico para identificação laboratorial da criptococose, quando da imersão dos espécimes clínicos em formol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALFONSO, F. ; GALLO, L.; WINKLER, B.; SUHRLAND, M.J. Fine needle aspiration cytology of peripheral lymph node cryptococcosis. A report of three cases. **Acta Cytol.**, **38**: 459-462, 1994.
2. ARTAL, E. M. Diagnóstico histopatológico de las micosis. **Rev. Iberoam. Micol.**, **212**: 1-9, 2004.
3. BAKER, R. D. & HAUGEN, R. K. Tissue changes and tissue diagnosis in cryptococcosis. **Clin. Pathol.**, **25**: 14-24, 1955.
4. BERLIN, L. & PINCUS, J. H. Cryptococcal meningitis. False-negative antigen results and cultures in nonimmunosuppressed patients. **Arch. Neurol.**, **46**: 13 in 12-1316, 1989.
5. BLOMMFIELD, N.; GORDON, M.A.; ELMENDORF, D. F. Detection of *Cryptococcus neoformans* antigen body fluids by latex particle agglutination. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **114**: 64-67, 1963.
6. BOTTONI, E.J.; TOMA, M.; HOHANSSON, B.E.; WORNMSER, G.P. Poorly encapsulated *Cryptococcus neoformans* from patients with AIDS. I: Preliminary observation. **AIDS Res.**, **2**: 211-217, 1986.
7. BOVERS, M.; HAGEN, F.; BOEKHOUT, T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex. **Rev. Iberoam. Micol.**, **25**: 4-12, 2008.
8. CALVO, B.; BARTELETT, J. A.; GALLIS, H. A. Manifestations of pulmonary cryptococcosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **Rev. Infect. Dis.**, **13**: 64-67, 1991.
9. CASADEVALL, A & PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*. 1.ed. Washington: Asm Press, 1998.
10. CHANDLER, F.W.; WATTSS, J. C. Cryptococcosis. In: CONNOR, D. H.; CHANDLER, F. W.; SCHWARTZ, D. A.; MANZ, H. J. LACK, E. E.; BARD, J. K. UTZ, J. P. (eds). Pathologic of infectious disease. Stamford: Appleton & Lenge Press, Cap. 160, 989-1001, 1989.
11. CAMERON, M. L.; BARTLETT, J. A.; GALLIS, H. A.; WASKIN, H. A. Manifestions of pulmonary cryptococcosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **Rev. Infect. Dis.**, **13**: 64-67, 1991.

12. COLOM, M. F.; FRASÉS, S.; FERRER, C. Estudio epidemiológico de La criptococose em España: primeiros resultados. **Rev. Iberoam. Micol.**, **18**: 99-104.
13. CÔRREA, M. P. S.; OLIVEIRA, E. C.; DUARTE, R. R. B. S.; PARDAL, P. P. O.; OLIVEIRA, F. M.; SEVERO, L. C.; Criptococose em crianças no Estado do Pará, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **32**: 505-508, 1999.
14. COX, L. B. TOLHURST, J. C. Human tolurosis. Melbourne: University Press, 1946.
15. DIAZ, M. R.; BOEKHOUT, T.; KIESLING, T.; FELL, J. W.; Comparative analysis of the intergenic spacer regions and population structure of the species complex of pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeasts Res.**, **5**: 1129-2005.
16. DORA, J. M.; KELBERT, S.; DEUSTSCHENDORF, C.; CUNHA, V. S.; AQUINO, V. R.; SANTOS, P. S.; GOLDANI, L. Z. Cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii* in immunocompetent hosts: case report and review. **Mycopathologia** **161**: 235-238, 2006.
17. EDWARDS, M. R.; GORDON, M.A.; LAPA, E. W.; GHIORSE, W. C. Micromorphology of *Cryptococcus neoformans*. **J. Bacteriol.**, **94**: 766-777, 1967.
18. FAN-HARVARD, P.; YAMAGUCHY, E.; SMITH, S. M.; ENG, R.H. Diastolic hypertension in AIDS patients with cryptococcal meningitis. **Am. J. Med.** **93**: 347, 1992.
19. FARMER, S. G.; KOMOROWSKI, R. A. Histologic response to capsule-deficient *Cryptococcus neoformans*. **Arch. Pathol.**, **96**: 383-387, 1973.
20. FREED, E. R. DUMA, R. J.; SHADOMY, J.; UTZ, J. P. Meningoencephalitis due to hyphae-forming *Cryptococcus neoformans*. **Am. J. Clin. Pathol.**, **55**: 30-33, 1971.
21. GALL, A. A. KOSS, M.N.; HAWKINS, J.; EVANS S.; EINSTEIN, H. The pathology of pulmonary cryptococcal infections in the acquired immunodeficiency syndrome. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, **110**: 502-507, 1986
22. GAZZONI, A. F.; PEGAS, K. L.; SEVERO, L. C. Histopathological techniques for diagnosis cryptococcosis due to capsule-deficient *Cryptococcus*: case report. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **41** (1): 76-78, 2008.
23. GAZZONI, A. F.; SEVERO, B. C.; BARRA, M. B.; SEVERO, L. C. Atypical micromorphology and uncommon location of cryptococcosis: a histopathologic

- study using special histochemical techniques (one case report). **Mycopathologia**, **167**: 197-2009, 2009.
24. GOLLAN, J. L.; DAVIDSON G. P.; ANDERSON, K. Visceral cryptococcosis without central nervous system or pulmonary involvement: presentation as hepatitis. **Med J. Aust.**, **1**: 5469-471, 1972.
 25. GORDON, M. A. & DEVINE, J. Filamentation and endogenous sporulation in *Cryptococcus neoformans*. **Sabouraudia** **8**: 227-234, 1970.
 26. GROCOTT, R.G. A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori's methenamine-silver nitrate technic. **Am. J. Clin. Pathol.**, **25**: 975-979, 1955.
 27. GUIDELINE in cryptococcosis. Uberaba: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2008.
 28. GUTIERREZ, F.; FU, Y. S.; LURIE, H. Cryptococcosis histologically resembling histoplasmosis. A light and electron microscopical study. **Arch. Pathol.**, **99**: 347-352, 1975.
 29. HARDING, S.A.; SCHELD, W.M.; FELDMAN, P.S.; SANDE, M. A. Pulmonary infection with capsule-deficient *Cryptococcus neoformans*. **Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histol.**, **382**: 113-118, 1979.
 30. HEENAN, P.J.; DAWKINS, R.I. - Cryptococcosis and multiple squamous cell tumors associated with a T-cell defect. **Cancer**, **47**: 291-295, 1981.
 31. HELOU, S.; ROBLES, A.M.; ARECHAVALA, A.; BIANCHI, M.I.; NEGRONI, R. Criptococcosis respiratoria en pacientes VIH positivos. **Rev. Iberoam. Micol.** **16**: 126-129, 1999.
 32. JARVIS, J. N. & HARRISON, T. S. Pulmonary cryptococcosis. **Semin. Respir. Crit. Care. Med.**, **29**: 141-150 2008.
 33. KERKERING, T. M.; DUMA, R. J.; SHADOMY, S.; VIRGINIA, R. The evolution of pulmonary cryptococcosis. **Ann. Intern. Med.**, **94**: 611-616, 1981.
 34. KIMURA, M.; FURUTA, T.; TERAMURA, K.; SATOU, T. Pseudohyphae of *Cryptococcus* in a cytologic specimen. **Acta Cytol.**, **42**: 817-818, 1998.
 35. KWON-CHUNG, K. J. & BENNETT, J. E. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Am. J. Epidemiol.**, **120**: 123-140, 1984.
 36. KWON-CHUNG, K. J.; HILL, W. B.; BENNETT, J. E. - New, special for histopathological diagnosis of cryptococcosis. **J. Clin. Microbiol.**, **13**: 383-387, 1981.

37. LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T.; **Tratado de Micologia Médica**. São Paulo, Sarvier, 1998.
38. LAZCANO, O. ; SPEIGHTS, V.O.; STRICKLER, J.G.; BILBAO, J. E.; BECKER, J.; DIAZ, J. Combined histochemical stains in the differential diagnosis of *Cryptococcus neoformans*. **Modern. Pathol.**, **6**: 80-84, 1993.
39. LAZCANO, O.; SPEIGHTS, V. O. JR.; BILBAO, J.; BECKER, J.; DIAZ, J. Combined Fontana-Masson-Mucin staining of *Cryptococcus neoformans*. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, **115**: 1149, 1991.
40. LITTMAN, M. L.; ZIMMERMAN, L. E. Cryptococcosis. New York & London: Grune & Stratton, 1956.
41. LEVINSON, D.J.; SILCOX, D.C.; RIPPON, J.W.; THOMSEN, S. - Septic Arthritis due to nonencapsulated *Cryptococcus neoformans* with coexisting sarcoidosis. **Arthritis and Rheum.**, **17**: 1037-1047, 1974.
42. LOVE, G. L.; BOYD, G. D.; GREER, D.L. Large *Cryptococcus neoformans* isolated from brain abscess. **J. Clin. Microbiol.**, **22**: 1068-1070, 1985.
43. LURIE, H. I. SHADOMY, H. J. Morphological variations of a hypha-forming strain of *Cryptococcus neoformans* (coward strain) in tissues of mice. **Sabouraudia**, **9**: 10-4.
44. MILCHGRUB, S.; VISCONTI, E.; AVELLINI, J. Granulomatous prostatitis induced by capsule-deficient cryptococcal infection. **J. Urol.**, **143**: 365-366, 1989.
45. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Programa nacional de doenças sexualmente transmissíveis**. Ministério da Saúde, Brasília, DF, Ano I: 44, 1999.
46. MIRZA, S. A.; PHELAN, M.; RIMLAND, D.GRAVISS, E.; HAMILL, R.; BRANDT, M. E. The changing epidemiology of cryptococcosis: an update from population-based active surveillance in 2 large metropolitan areas, 1992-2000. **Clin. Infect. Dis.**, **36**: 789-794, 2003.
47. MITCHELL, T. G. & PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clin. Microbiol. Rev.**, **8**: 515-548, 1995.
48. MOE, K.; LOTSIKAS-BAGGILI, A.; KUPIEC-BANASIKOWSKA, A.; KAUFFMAN, C.L. The cutaneous predilection of disseminated cryptococcal infection in organ transplant recipients. **Arch. Dermatol.**, **141**: 913, 2005.

49. MORSE, J. Approaches to qualitative-quantitative methodological triangulation. **Nurs. Res.**, **40(1)**: 120-132, 1991
50. MUKAE, H.; IWAMOTO, M.; KINOSHITA, A.; TAKASE, T.; MORI, N.; ISHINO, T.; KOHNO, S.; YAMAGUCHI, K.; HIROTA, M.; HARA, K. A case of sepsis and meningitis due to capsule-deficient *Cryptococcus neoformans* with SIADH. **Kansenshogaku Zasshi** **63**: 1206-1211, 1989.
51. NEILSON, J. B.; FROMTLING, R. A.; BULMER, G. S.; Pseudohyphal forms of *Cryptococcus neoformans*: decreased survival in vivo. **Mycopathologia**, **73**: 57-59, 1981.
52. NEILSON, J. B. IVEY, M. H.; BULMER, G. S. *Cryptococcus neoformans*: pseudohyphal forms surviving culture with *Acanthamoeba polyphaga*. **Infect. Imm.**, **20**: 262-266, 1978.
53. NEVES, J. L. Pesquisa qualitativa – características, uso e possibilidades. **Cadern. Pesq. Adm.**, **1(3)**: 3-10, 1996.
54. POWDERLY, W.G. Cryptococcal meningitis and AIDS. **Clin Infect. Dis.**, **17**: 837-842, 1993.
55. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Core Health Indicators. **WHO statistical information system (WHOSIS)**. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2007;
56. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Doenças oportunistas relacionadas com o HIV. Atualização técnica**. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2002.
57. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Doenças oportunistas relacionadas com o HIV. Atualização técnica**. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2007.
58. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Epidemiological fact sheets on HIV/AIDS and sexually transmitted infections**. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2006.
59. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **O acesso aos medicamentos. Atualização técnica**. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 1998.
60. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Ten statistical highlights on global public health**. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 1998.
61. ÓHARA, M. Histopathologic diagnosis of fungal diseases. **Infect. Control.**, **2**: 78-84, 1986.

62. PAPPALARDO, C. S. M. M. & MELHEM, S. C. M.; Cryptococcosis: a review of the brazilian experience for the disease. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **45**: 299-305, 2003.
63. PASCHOAL, R. C.; MELHEM, M. S. C.; GUELLI, T.; SZESZS, M. W. Atypical *cryptococcus neoformans* cells isolated from cerebrospinal fluid samples. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, **66**: 78-80, 2007.
64. PERFECT, J.R.; CASADEVALL, A. - Cryptococcosis. **Infect. Dis. Clin. N. Am.**, **16**: 837-874, 2002.
65. PROCKNOW, J J.; BENFIELD, J. R.; RIPPON, J. W. Cryptococcal hepatitis presenting as surgical mergency. **JAMA** **191**: 269-274.
66. REGISTROS BRASILEIROS DE TRANSPLANTS (São Paulo, SP). **Edição comemorativa. 10 anos dos Registros Brasileiros de Transplantes**. São Paulo. 2007
67. REGISTROS BRASILEIROS DE TRANSPLANTES (São Paulo, SP). **Aumento, menor que o planejado**. São Paulo, 2008.
68. REVENGA, F.; PARICIO, J. F.; MERINO, F. J.; NEBREDA, T.; RAMÍREZ, T.; MARTINEZ, A. M. Primary cutaneous cryptococcosis in an immnuocompetent host: case report and review of the literature. **Dermatol.**, **204**: 145-149, 2002.
69. RO, J.Y. LEE, S.S.; AYALA, A.G. Advantage of Fontana-Masson stain in capsule-deficient cryptococcal infection. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, **111**: 53-57, 1987.
70. SAAG, M.S.; POWDERLY, W.G.; CLOUD, G.A. NIAID Mycosis Study Group and the AIDS Clinical Trails Group: Comparison of amphotericin B with fluconazol in the treatment of acute AIDS-associated cryptococcal meningitis. **N. Engl. J. Med** **326**: 83-89, 1992.
71. SAMARANAYAKE, L. P. Oral mycoses in HIV infection. **Oral Surg. Oral Med Oral Pathol.**, **73**: 171-180, 1992.
72. SCHWARTZ, D.A. Characterization of the biological activity of *Cryptococcus* infections in surgical pathology. The budding index and carminophilic index. **Ann. Clin. Lab. Sci.**, **18**: 388-397, 1988.
73. SEVERO, L. C.; MATTOS OLIVEIRA, F.; LONDERO, A. T. Cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Brazilian patients with AIDS. Report of a three cases. **Rev. Iberoam. Micol.**, **16**: 152-154, 1999.

74. SEVERO, L. C.; LONDERO, A. T.; MARTINS, S.C.; REOLON, M.; GEYER, R.G. Provável criptococose pulmonar causada por *Cryptococcus neoformans* não-capsulado. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **23**: 283-286, 1981.
75. SEVERO, L. C.; OLIVEIRA, F.M.; SILVA, V.B.; Diferenças clínicas, epidemiológicas e ecológicas entre as duas variedades do *Cryptococcus neoformans*. **Rev. Médica Sta. Casa**, **9**: 1672-1686, 1998.
76. SHADOMY, H. J. LURIE, H. I. Histopathological observations in experimental cryptococcosis caused by a hypha-producing strain of *Cryptococcus neoformans* (coward strain) in mice. **Sabouraudia**, **9**: 6-9, 1971.
77. SHADOMY, H.J.; UTZ, J. P. Preliminary studies on a hypha-forming mutant of *Cryptococcus neoformans*. **Mycologia**, **58**: 383-390, 1966.
78. SHIBUYA, K.; COULSON, W.F.; WOLLMAN, J.S.; WAKAYAMA, M.; ANDO, T. *et al.* - Histopathology of cryptococcosis and other fungal infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **Int. J. Infect. Dis.**, **5**: 78-85, 2001.
79. SHIBUYA, K.; COULSON, W.F.; NAOE, S. - Histopathologic of deep-seated fungal infections and detailed examination of granulomatous response against cryptococci in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **Jpn. J. Med. Mycol.**, **43**: 143-151, 2002.
80. SHIBUYA, K.; HIRATA, A.; OMTA, J.; SUGAMATA, M.; KATORI, S. Granuloma and cryptococcosis. **J. Infect. Chemother.**, **11**: 115-122, 2005.
81. SIGIURA, Y.; HOMMA, M.; YAMAMOTO, T. Difficulty in diagnosis chronic meningitis caused by capsule-deficient *Cryptococcus neoformans*. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.**, **76**: 1460-1461, 2005.
82. SUBRAMANIAN, S. D. M. Clinical manifestations and management of cryptococcal infection. **J. Postgrad. Med.**, **51**: 21-26, 2005.
83. THE CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH. Cryptococcosis: torulosis, European blastomycosis, Busse-Buschke's disease. The Center for Food Security & Public Health, Iowa. 2005, p.1-7.
84. TRAVIS, W. D.; COLBY, T. V.; KOSS, M. N.; ROSADO-DE-CHRISTENSON, M. L.; MULLER, N. L.; KING, T. E.; Lung Infections. In: TRAVIS, W. D.; COLBY, T. V.; KOSS, M. N.; ROSADO-DE-CHRISTENSON, M. L.; MULEER, N. L.; KING, T. E. (eds.). Non-neoplastic disorders of the lower respiratory tract. Washington: American Registry of Pathology, Cap. 8.p. 600-605, 2002.

85. TORRES, H.A.; PRIETO, V.G.; RAAD, I.I.; KONTOYIANNIS, D.P. - Proven pulmonary cryptococcosis due to capsule-deficient *Cryptococcus neoformans* does not differ clinically from proven pulmonary cryptococcosis due to capsule-intact *Cr. Neoformans*. **Mycoses**, **48**: 21-24, 2005.
86. WATTS, J. C. & CHANDLER, F.W. Infection by capsule-deficient cryptococci (letter). **Arch. Pathol. Lab. Med.**, **111**: 688-689, 1987.
87. WILLIAMSON, J. D. SILVERMAN, J. F.; MALAK, C. T.; CHRISTIE, J. D. Atypical cytomorphologic appearance of *Cryptococcus neoformans*. A report of five cases. **Acta Cytol.**, **40**: 363-370, 1996.
88. WITT, D.; McKAY, D.; SCHWAN, L.; GOLDSTEIN, D.; GOLD, J. Acquired immune deficiency syndrome presenting as bone marrow and mediastinal cryptococcosis. **Am. J. Med.**, **82**: 149, 1987.

APÊNDICE A
FICHA DE COLETA DE DADOS HISTOPATOLÓGICOS

ANEXO A –

HEMATOXILINA-EOSINA

Seqüência da coloração

Desparafinizar, alcoolizar e hidratar
Hematoxilina durante 10 minutos
Lavar em água corrente até azulecer os cortes
Diferenciar rapidamente em álcool-ácido
Lavar em água corrente, por 5 a 10 minutos
Lavar rapidamente em álcool a 95°
Eosina, por 1 a 2 minutos
Diferenciar em álcool a 95°
Desidratar, diafanizar e montar

Interpretação do teste

Núcleos em azul; citoplasmas, fibras colágenas, elásticas e neutrófilos em vermelho (LACAZ et al., 2002).

**ANEXO B -
MÉTODO DE COLORAÇÃO PELA PRATA (GMS)**

Seqüência da coloração:

- a) Desparafinar os cortes em estufa a 64°C por 5 min. e passar em álcoois: xilol - 10 min; álcool 99 °GL - 1 min; álcool 96 °GL - 1 min; após água destilada, para hidratação por 10 min;
- b) Ácido crômico 5%: num becker colocar ácido e esquentar até a temperatura de 64°C, após colocar as lâminas dentro por 1 min;
- c) Deixe as lâminas esfriarem e lavar com água destilada por 3 vezes;
- d) Metabissulfito de potássio 1%: colocar no becker metabissulfito e as lâminas deixando-as por 1 min;
- e) Lavar lâminas com água destilada por 3 vezes;
- f) Numa proveta colocar 30 ml de DMSO e em outra 50 ml de H₂O dest , 4 ml de Borato e 50 ml de MSN. Misturar num becker ambas as soluções (somente quando for usar) e colocar as lâminas dentro, esquentando até a temperatura de 74°C. Chegando a essa temperatura, retire todas as lâminas e olhar lâmina controle no microscópio, caso esteja com coloração boa prossiga, caso contrário, coloque novamente as lâminas na solução deixando-as por mais 1 min, olhando novamente o controle no microscópio (repetir esta etapa quantas vezes for necessário);
- g) Lavar com água destilada (3 mudas);
- h) Cloreto de ouro 0,1%: colocar num becker cloreto de ouro e as lâminas por 1 min;
- i) Lavar as lâminas com água destilada por 3 vezes;
- j) Tiosulfato de sódio 2%: num becker colocar tiosulfato e lâminas por 1 min;
- l) Lavar com água destilada por 3 vezes;
- m) Verde Claro (verde luz): num becker colocar verde luz lâminas de 1 min ;
- m) Desidratação: álcool 96 °GL-1 min; álcool 99 °GL-1 min; xilol: 15 min ou mais (máximo de 24h); Montar as lâminas com bálsamo do Canadá.

Interpretação do teste

Fungo: bem delineados em marrom-negro;

Mucina: amarelo-acinzentado

Parte central das hifas - rosa antigo (marrom-negro)

Cor de fundo - verde claro, mas depende da cor de fundo que utilizar(LACAZ et al., 2002).

**ANEXO C -
MÉTODO DE MUCICARMIM DE MAYER (MM)**

Seqüência da coloração

- a) Desparafinizar os cortes em esufa a 64° C por 5 min. e passar em álcoois: xilo- 10 min; álcool 99° GL- 1 min; álcool 96° GL- 1 min; após água destilada, para hidratação por 10 minutos
- b) Num becker colocar as lâminas coma mistura de 50mL da solução A com a B por 3 min para corar;
- c) Lavar em água corrente por 5 a 10 min
- d) Colocar as lâminas num becker com a solução diluída de mucicarmim por 30 a 60 min ou por mais tempo (controlar ao microscópio a coloração após 30 min
- e) Lavar em água destilada
- f) Num becker por a solução de amarelo de metanila a as lâminas por 1 min
- g) Lavar em água destilada, após em álcool 95° GL
- h) Desidratação: por a lâminas em álcoois: álcool 96° GL- 1 min; álcool 99° GL- 1 min; xilol: 15 min ou mais (máximo de 24 horas); montar as lâminas com bálsamo do Canadá.

Interpretação do teste

Mucina: vermelho intenso a róseo; núcleos: escuros; fundo :amarelo.

Permite a diferenciação do *Cryptococcus* da maioria dos fungos com igual tamanho e forma.

Usada para fungos que contêm cápsulas mucoplissacarídicas, pois os reagentes interagem com a mucina presente nessas cápsulas, resultando numa coloração de rosa a vermelho intenso, enquanto os núcleos coram-se em negro e demais estrututras em amarelo, facilitando as formas lipocapsuladas(LACAZ et al., 2002).

**ANEXO D -
MÉTODO DE FONTANA-MASSON (FM)**

Sequência da impregnação

- a) Desparafinizar, alcoolizar e hidratar
- b) Líquido de Fontana durante duas horas a quente (56°C)
- c) Lavar bem em água destilada e verificar a impregnação ao microscópio. Lavar novamente em água destilada
- d) Solução de Cajal sobre a lâmina durante dois minutos
- e) Fixar em hipossulfito de sódio a 5% durante dois minutos
- f) Lavar em água corrente durante 10 minutos
- g) Coloração de fundo pelo carmin ou pelo amarelo de metanila por 1 mim.
- h) Desidratar, diafanizar e montar

ANEXO E-
ARTIGOS PUBLICADOS

Técnicas histopatológicas no diagnóstico de criptococose por *Cryptococcus* deficiente de cápsula: relato de caso

Histopathological techniques for diagnosing cryptococcosis due to capsule-deficient *Cryptococcus*: case report

Alexandra Flávia Gazzoni¹, Karla Lais Pegas² e Luiz Carlos Severo³

RESUMO

Caso de criptococose por *Cryptococcus* deficiente de cápsula, no qual cultivo do espécime clínico e pesquisas do antígeno capsular no líquido e sem foram negativas. As técnicas histopatológicas foram: Hematoxilina-eosina, Grocott, Maciocerim de Mayer e Fontana-Masson. Confiaram-se o diagnóstico de *Cryptococcus* deficiente de cápsula pela técnica de Fontana-Masson e pela imunofluorescência direta. É discutida a potencialidade das técnicas histopatológicas.

Palavras-chaves: *Cryptococcus* deficiente de cápsula, Maciocerim de Mayer, Fontana-Masson.

ABSTRACT

A case of cryptococcosis due to capsule-deficient *Cryptococcus* is presented, in which culturing of the clinical specimen and tests for capsular antigen in cerebrospinal fluid and sputum were negative. The histopathological techniques evaluated were hematoxylin-eosin, Grocott methenamine silver, Mayer's methenamine and Fontana-Masson. The diagnosis of cryptococcosis due to capsule-deficient *Cryptococcus* was confirmed by means of the Fontana-Masson technique and by direct immunofluorescence. The potential of the histochemical techniques is discussed.

Key-words: Capsule-deficient *Cryptococcus*, Methenamine, Fontana-Masson.

A criptococose é uma micose sistêmica causada inicialmente por duas espécies do basidiomiceto, naturalmente encapsuladas: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Enquanto o *Cryptococcus neoformans* tem distribuição mundial, é saprófito do solo e está presente em maior abundância em ambientes contaminados pelas fezes de pombos, o *Cryptococcus gattii* fica praticamente restrito a climas tropicais e subtropicais e está associado a árvores como *Eucalyptus malaleucena*¹.

O estabelecimento do diagnóstico laboratorial da criptococose é feito pelo achado osmótico (exame direto e histopatologia), isolamento em cultivo e serotipologia, realizada pelo teste de aglutinação das partículas do látex a través da detecção do antígeno capsular. As características micromorfológicas do *Cryptococcus* são elementos esféricos a ovais, com ou sem brotamentos, medindo de 4 a 20 µm de diâmetro, envolvidos por uma cápsula gelatinosa². Contudo, a literatura registra casos de criptococose sem estas características, dificultando o diagnóstico por similaridade com outros elementos fúngicos³⁻¹¹, o que demanda uma técnica laboratorial mais específica¹².

Justifica o relato a avaliação das potencialidades e limitações diagnósticas das técnicas histopatológicas na criptococose.

RELATO DO CASO

Paciente feminina, de 42 anos, branca, natural e procedente de Grajaú, Rio Grande do Sul. Internada com tosse seca, cefaléia, dor ventilatório-dependente no hemitórax direito e febre. Exame físico sem particularidades. Radiografia do tórax revelou nódulos subpleurais no lobo inferior do pulmão direito. Realizada toracoscopia à direita. A macroscopia da peça cirúrgica evidenciou três nódulos subpleurais de aspecto caseoso. Realizada punção líquórica, o exame microbiológico do líquido mostrou ausência de germes aos esfregaços com os cultivos para bactérias, micobactérias e fungos obtiveram resultados negativos.

Espécime clínico. Peça cirúrgica de tecido pulmonar macroscopicamente alterado foi submetido a processamento histológico padrão e incluído em blocos de parafina. A seguir, os cortes foram corados por meio de técnicas padronizadas¹³.

Técnicas histoquímicas. *Hematoxilina-eosina (HE)*: rotina no diagnóstico histológico e de grande utilidade na avaliação dos padrões de reações teciduais¹⁴.

Grocott: também chamada de impregnação pela prata é a mais sensível, sendo largamente utilizada na pesquisa dos

1 Curso de Pós-Graduação em Clínica Pneumológica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2 Departamento de Patologia, Santa Casa-Complexo Hospitalar, Porto Alegre, RS, 3 Departamento de Medicina Interna, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
Endereço para correspondência: Dr. Luiz Carlos Severo, Laboratório de Micologia Santa Casa-Complexo Hospitalar, Rua Anna D'Almeida 285, 90020-090 Porto Alegre, RS.
Tel: 51 31 3214-8409
e-mail: severo@terra.com.br
Recebido para publicação em: 10/09/2007
Aceito em: 15/01/2008

elementos fúngicos tanto nos cortes de tecido, quanto nos esfregaços, corando de negro a parede celular que é visualizada sobre um fundo verde-claro¹⁴.

Mucicarmim de Mayer: diferencia o *Cryptococcus* de outros fungos similares em tamanho e forma. Método exclusivo de visualização do material polissacarídico capsular. O carmin liga-se a mucina, a qual destaca-se dos outros componentes celulares pela coloração magenta^{14,15}.

Fontana-Masson: evidencia a parede celular fúngica por reagir com pigmentos de melanina, bem como grânulos argentíneos. A melanina comida destaca-se do restante do tecido, que adquire coloração amarelada^{14,16}.

Imunofluorescência: técnica restrita a único centro de referência, baseada na formação de um conjugado composto por anticorpos ou reagentes específicos antígenos do polissacarídeo capsular¹⁷.

Seromicrologia: teste de detecção do antígeno polissacarídico capsular através da aglutinação das partículas de látex sensibilizadas¹⁸.

A Tabela 1 resume as finalidades e limitações das colorações histoquímicas quando do diagnóstico de criptococose por *Cryptococcus* deficiente de cápsula.

Posteriormente, houve análise microscópica comparativa entre a técnica de rotina (HE) e técnicas especializadas micológicas.

Aos cortes, os achados microscópicos à coloração de hematoxilina-eosina revelaram lesões granulomatosas, de intensa resposta inflamatória, constituídas por macrófagos, células nodulares de células epitelioides (macrófagos modificados que adquirem citoplasma mais pálido, à semelhança das células epitelioides), células gigantes e fagocitose. Alguns linfócitos estavam

dispostos perifericamente (Figura 1A). Não foram identificados polímeros nucleares. Alguns organismos esféricos de tamanho variável foram identificados no interior dos granulomas (Figura 1B). A coloração de Gram revelou numerosos organismos dispostos ora dentro de células gigantes (fagocitados), ora no tecido necrótico e espaço extracelular. A parede celular dos elementos fúngicos corou-se de marrom-escuro a preto, sem visualização do espaço claro circundante. Raramente, se observou elementos com brotamento unipolar (Figura 1C). A coloração de mucicarmim de Mayer para estrutura capsular foi fracamente positiva (Figura 1D). A melanina foi evidenciada com a coloração de Fontana-Masson, a qual variou de marrom-escuro a negra (Figura 1E). Duas técnicas diagnósticas foram realizadas no CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), Atlanta, EUA. A pesquisa do antígeno polissacarídico capsular (aglutinação com partículas de látex sensibilizadas) no líquido cefalorraquidiano e no soro que foram negativas. A técnica de imunofluorescência direta, obtendo resultados fracamente reativos para material capsular, confirmando o diagnóstico de *Cryptococcus* deficiente de cápsula.

Tabela 1 - Finalidades e limitações das técnicas histoquímicas no diagnóstico de criptococose por *Cryptococcus* deficiente de cápsula.

Técnica	Limitação
HE: reação rotineira	não evidencia a estrutura fúngica
GMS: cora parede celular dos fungos	completa falta no procedimento alto custo
MH: cora estrutura capsular	insuficiente no diagnóstico de <i>Cryptococcus</i> deficiente de cápsula
IM: cora melanina parede celular fúngica	completa falta no procedimento alto custo

HE: hematoxilina-eosina; GMS: Gomori-metacromia silver; MH: mucicarmim de Mayer; IM: Fontana-Masson.

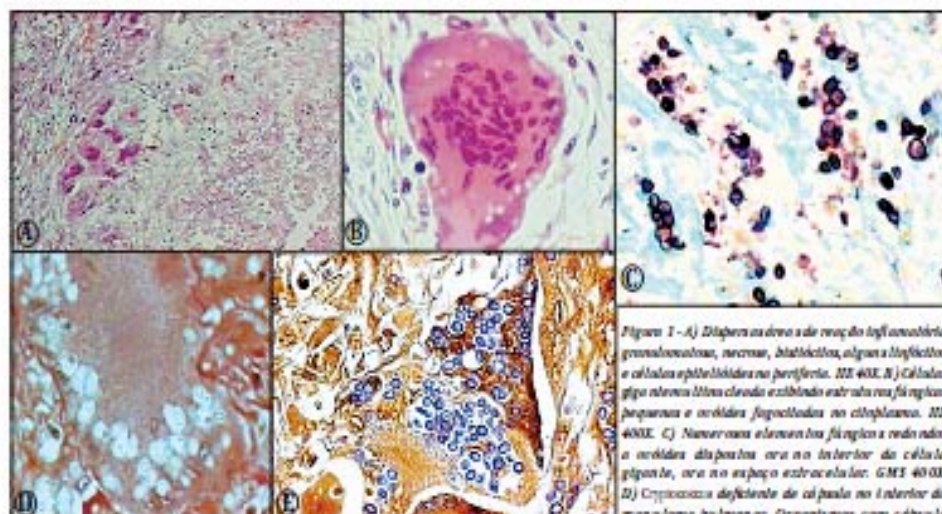


Figura 1 - A) Dispersão de áreas de reação inflamatória granulomatosa, necrose, histiócitos, alguns linfócitos e células epitelioides na periferia. MH 400X. B) Células glia com núcleo fechado exibindo estrutura fina, filamentos perifericos e vesículas fagocitadas no citoplasma. MH 400X. C) Numerosas estruturas fúngicas e redondos e vesículas dispersas ora no interior da célula gigante, ora no espaço extracelular. GMS 400X. D) *Cryptococcus* deficiente de cápsula no interior do granuloma parietal. Organismo com cápsula leve e fracamente reativa na coração com Mucicarmim de Mayer. MH 400X. E) Elementos fúngicos positivamente reativos com a coração de Fontana-Masson. Realizado pela parede celular criptocócica em áreas pigmentadas densas. A reação positiva não depende da presença de cápsula. FM 400X.

leve e fracamente reativa na coração com Mucicarmim de Mayer. MH 400X. E) Elementos fúngicos positivamente reativos com a coração de Fontana-Masson. Realizado pela parede celular criptocócica em áreas pigmentadas densas. A reação positiva não depende da presença de cápsula. FM 400X.

DISCUSSÃO

A literatura mostra relatos de criptococose pulmonar⁴ e disseminada¹⁴ por formas deficientes de cápsula. Em 28 casos revistos, 14 (50%) pacientes exibiram infecção pulmonar^{4,11,17} e os outros 14 (50%) pacientes apresentavam sinais de doença extrapulmonar: meningite^{11,16}, sepse¹, sepse concomitante com meningite¹¹, infecção óssea¹, prostatite¹¹ e artrite¹¹. O diagnóstico histopatológico foi realizado em 17 (61%) pacientes^{4,11,17,18}. A técnica de hematoxilina-eosina foi realizada em 9 (53%) pacientes^{4,11,17,18}, com observação de granuloma, célula gigante e fagocitose em 100% dos casos, demonstrando que a criptococose ocasionada por formas deficientes de cápsula produz intensa resposta inflamatória. A técnica de Grocott foi realizada em 100% dos casos^{4,11,17,18}, foram visualizados aspectos como parede celular e brotamentos compatíveis com *Cryptococcus*. A técnica de mucicarmim de Mayer também foi realizada em 100% dos casos^{4,11,17,18}, sendo negativa em 7 (41%) pacientes^{4,11,18}; nos 10 (59%) casos restantes^{11,17}, a técnica obteve resultados levemente positivos. A técnica de Fontana-Masson foi realizada em 6 (35%) pacientes, sendo reativa em todos os casos^{4,17,18}. Portanto, esta coloração demonstra-se altamente específica no diagnóstico das formas deficientes de cápsula. A técnica de imunofluorescência foi realizada em 4 (14%) casos^{4,17,18}. Conforme resultados observados em outra revisão de 39 casos¹⁹, estruturas filicicas deficientes de cápsula exibiram reações fracamente positivas para material capsular por esse método. Em adição, a baixa porcentagem deste último, é devido ao fato de que este tipo de procedimento está restrito a um único centro de referência. Como vimos, os achados do presente caso estão em concordância com a literatura.

Por outro lado, a seronecologia baseada na aglutinação das partículas de látex sensibilizadas foi realizada em 22 (79%) casos^{4,11,17,18}, 13 foram aplicados nosoro^{4,11,17}, 11 aplicados no líquido cefalorraquidiano^{4,11,18} e 1 aplicado no líquido sinovial¹⁷. No soro, a negatividade foi em 8 (36%) casos^{4,17} e a positividade em 5 (22%) casos^{4,17}. No líquido cefalorraquidiano, a negatividade em 3 (13%) casos^{4,18} e a positividade foi em 8 (36%) casos¹⁷. No líquido sinovial, o resultado foi negativo¹⁷. Este percentual de negatividade como era de se esperar, é reflexo da deficiência de material capsular.

Em resumo, os achados morfológicos proporcionados pelas colorações de hematoxilina-eosina e Grocott, bem como os resultados oferecidos pelas técnicas histopatológicas de Fontana-Masson e mucicarmim de Mayer estabelecem o diagnóstico dos organismos criptocócicos. Portanto, o Fontana-Masson é alternativa diagnóstica para casos de infecções por organismos morfológicamente sugestivos de *Cryptococcus*, uma vez que a imunofluorescência direta está disponível somente em um centro de referência.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Leo Kaufman pela realização da seronecologia e ao Dr. William Kaplan pela realização da imunofluorescência direta, ambos do Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Atlanta, USA.

REFERÊNCIAS

1. Nettles EJ, Toma M, Johnson BE, Werner GR. Poorly encapsulated *Cryptococcus neoformans* from patients with AIDS. *Practical issues*. AIDS Research 2:211-217, 1986.
2. Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. The American Society for Microbiology - ASM Press, Washington, 1998.
3. Chandler JW, Wata JC. *Cryptococcosis*. In: Gonner EB, Chandler JW, Schwartz DA, Marx HJ, Lutz EE, Basal JH, Dajdz J (eds) *Pathology of Infectious Diseases*, Appleton & Lange, Stamford, p. 989-997, 1997.
4. Chon WS, Kim K, Yoo WS, Jung SH, Bohn JW, Kim DG, Jung SK. A case of pulmonary cryptococcosis by capsule-deficient *Cryptococcus neoformans*. *The Korean Journal of Internal Medicine* 21: 83-87, 2006.
5. Harding SA, Schell WM, Johnson FS, Janda MA. Pulmonary infection with capsule-deficient *Cryptococcus neoformans*. *Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histology* 182: 113-118, 1979.
6. Hagan TJ, Hamilton RL. Cryptococcosis and multiple squamous cell tumors associated with a T-cell defect. *Cancer* 47: 291-295, 1981.
7. Kimura M, Kudoan I, Nakura S, Tamura K, Sano T, Hashimoto S. Pulmonary cryptococcosis due to capsule-deficient strain combined with metastatic lung cancer. *Myopathologia* 140: 65-68, 1998.
8. Kwon-Chung KJ, Hsi WH, Bennett JE. New, rapid stain for histopathological diagnosis of cryptococcosis. *Journal of Clinical Microbiology* 13: 387-387, 1981.
9. Lusa C, Porto E, Marinho JCC, Neto-Vaccari EM, N do NT. *Tratado de Microbiologia Médica* - Lusa Editora Sertão, São Paulo, 2002.
10. Lanzoni O, Spigaglia VO, Stricker JG, Wilson JF, Becker J, Dan J. Combined histological stains in the differential diagnosis of *Cryptococcus neoformans*. *Modern Pathology* 6: 80-84, 1993.
11. Lanzoni O, Spigaglia VO Jr, Wilson JF, Becker J, Dan J. Combined Fontana-Masson-Mayer staining of *Cryptococcus neoformans*. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 115: 1145-1149, 1991.
12. Levitt RJ, Minto DC, Rippen JW, Thomson S. Septic Arthritis due to non-encapsulated *Cryptococcus neoformans* with coexisting sacroiliitis. *Arthritis and Rheumatism* 17: 1037-1047, 1974.
13. Mignob V, Vaziri E, Awlidi J. Granulomatous prostatitis induced by capsule-deficient cryptococcal infection. *The Journal of Urology* 143: 365-366, 1999.
14. Nakase H, Inamoto M, Kikuchi A, Takase T, Mori N, Ishino T, Nakano S, Yanagishi K, Hirota M, Haruki A. A case of fatal disseminated infection by capsule-deficient *Cryptococcus neoformans* with AIDS. *Immunohistochemistry* 36: 1206-1211, 1999.
15. No JY, Lee SH, Ayala AG. Advantage of Fontana-Masson stain in capsule-deficient cryptococcal infection. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 112: 55-57, 1987.
16. Sugita Y, Horino M, Yamamoto T. Difficulty in diagnosing chronic meningitis caused by capsule-deficient *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* 76: 1460-1461, 2005.
17. Torres HA, Prieto VG, Basal JJ, Kocijevic DR. Proven pulmonary cryptococcosis due to capsule-deficient *Cryptococcus neoformans* does not differ clinically from proven pulmonary cryptococcosis due to capsule-intact *Cr. neoformans*. *Mycoses* 48: 21-24, 2005.
18. Wang C, Chandler JW. Infection by capsule-deficient cryptococci (3 case). *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 111: 686-689, 1987.

Atypical Micromorphology and Uncommon Location of Cryptococcosis: A Histopathologic Study Using Special Histochemical Techniques (One Case Report)

Alexandra Flávia Gazzoni · Cecília Bittencourt Severo ·
 Marínes Bizarro Barra · Luiz Carlos Severo

Received: 26 June 2008 / Accepted: 6 November 2008 / Published online: 4 December 2008
 © Springer Science+Business Media B.V. 2008

Abstract Here we report an unusual case of disseminated cryptococcosis in a patient with AIDS. Although typical *Cryptococcus neoformans* micromorphology was observed in tongue biopsy, cervical lymph node examination revealed atypical histopathologic findings. These included pseudohyphae, chains of budding yeasts and structures resembling germ tubes. *Cryptococcus neoformans* infection in supraclavicular lymph nodes was also confirmed by

culture. The importance of using special histochemical techniques—Mayer's mucicarmine stain for mucicarmophilic capsule and Grocott's silver stain—in the diagnosis of cryptococcosis is reinforced.

Keywords *Cryptococcus neoformans* · Pseudohyphae · Lymphadenitis · Mayer's mucicarmine stain · Grocott's silver stain

A. F. Gazzoni · C. B. Severo · L. C. Severo
 Post-graduation Program in Pulmonary Sciences,
 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre,
 RS, Brazil

A. F. Gazzoni
 e-mail: afevia@yaho.com.br

C. B. Severo
 e-mail: cbosevero@hotmail.com

C. B. Severo · L. C. Severo (✉)
 Clinical Myology Laboratory, Complexo Hospitalar
 Santa Casa, Annes Dias, 285, 90020-090 Porto Alegre,
 RS, Brazil
 e-mail: severo@sanacasasche.br;
 severo@pesquisador.orpq.br

M. B. Barra
 Department of Pathology, Complexo Hospitalar Santa
 Casa, Porto Alegre, RS, Brazil
 e-mail: mbbarra@uol.com.br

L. C. Severo
 Department of Internal Medicine, Universidade Federal
 do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Abbreviations

CNS Central nervous system
 GMS Grocott's silver stain
 HE Hematoxylin and eosin stain
 MM Mayer's mucicarmine stain

Introduction

The lungs are the portal of entry for *Cryptococcus* infections [1, 2]. These organisms have a special tropism for the central nervous system (CNS) [3], frequently causing meningoencephalitis in patients with AIDS [4, 5]. Although cryptococcosis may affect several organs, peripheral lymphadenopathy [6–8] and oral cavity involvement [4, 9, 10] are hardly ever seen.

Microscopically *Cryptococcus* species are identified as spherical-to-oval yeast cells, measuring 4–20 µm in diameter, and surrounded by a

mucopolysaccharide capsule [11]. Single or multiple budding cells with a narrow base are usually observed [4]. In addition to these classical aspects, these organisms may also be present in unusual forms, which include pseudohyphae [5, 6, 12–17], chains of budding yeasts [5] and structures resembling germ tubes [5, 18]. Here we describe atypical histopathologic findings observed in a patient with disseminated cryptococcosis. Special histochemical techniques allowing for the differentiation of *Cryptococcus* species from other yeasts are reviewed.

Case Report

A 29-years old Caucasian man from the urban area of Porto Alegre (Southern Brazil) was diagnosed with HIV at the age of 21. The patient had a history of illicit drug abuse and no adherence to antiretroviral therapy. He had been a smoker for the last 17 years old (one pack of cigarettes per day). His medical history included previous bacterial pneumonia, pneumocystosis, tricuspid infectious endocarditis, hepatitis C, and herpes zoster infection. He was admitted to the hospital in 2006 for dyspnoea and cough. He gave a 3-week history of fever (40°C), and his sputum was mucopurulent but not abundant. He was in good clinical conditions though his mucosae were pale. There was right posterior cervical and supraclavicular lymphadenopathy. His tongue was covered by thrush-like lesions, and some papular lesions were also observed on the tongue. Chest radiography showed bilateral infiltrates with alveolar consolidation in the right lower lobe. Bronchoscopy showed a diffusely oedematous bronchial mucosa and *C. neoformans* was recovered from bronchoalveolar lavage fluid culture. As shown in Table 1, *C. neoformans* was also identified in other clinical specimens, including blood, urine, cerebrospinal fluid, sputum, supraclavicular lymph node and serum. The patient responded well to a 14-day course of deoxycholate amphotericin B, which was followed by fluconazole. Antiretroviral therapy was resumed with good tolerance.

Histopathologic Findings

Biopsy specimens of cervical lymph node and of the tongue were submitted for standard histological

processing. Tissue sections were stained by hematoxylin and eosin (HE), Grocott's silver (GMS) and Mayer's mucicarmin (MM).

Sections of the cervical lymph node stained with HE revealed total destruction of the nodal architecture, with presence of numerous to spherical to oval structures displaying perinuclear clear zone (halos) (Fig. 1, Panel a). These were seen as black organisms on a light green background by GMS staining—the fungal cells showed surrounding zones, indicating the presence of a capsular structure. In spite of the presence of many yeasts revealing single budding with narrow necks, other structures such as pseudohyphae, chains of budding yeasts and germ tube-like structures were also observed (Fig. 1, Panel b). The MM staining also allowed the observation of fungal cells containing single budding with narrow necks, pseudohyphae (Fig. 1, Panel c), chains of budding yeasts (Fig. 1, Panel d) and germ tube-like structures. The magenta capsule was stained and the colour confirmed the presence of capsular polysaccharide material exclusive of *Cryptococcus*.

Sections of the tongue biopsy stained with HE revealed an ulcerated epithelium with exudates and some spherical to oval structures showing perinuclear clear zones (Fig. 2, Panel a). When stained by GMS these organisms were found to be surrounded by clear spaces, indicating the presence of capsular structures. Few budding yeasts were visualised. The magenta colour seen at MM staining (Fig. 2, Panel b) confirmed the presence of capsular polysaccharide material exclusive of *Cryptococcus* species.

Discussion

The lungs are the primary site of cryptococcal infection, from which the organisms can get access to the bloodstream and disseminate. Although virtually any organ can be involved in disseminated cryptococcosis [8, 9], lymphadenitis is a rare manifestation of the disease [8, 19, 20]. In addition to cervical lymphadenopathy—as that occurred to our patient—other reports have also described abdominal and mediastinal lymph node involvement [21, 22]. Oral cavity involvement has also rarely been reported [23]. Previous reports of oral cryptococcosis described thrush-like and ulcerative lesions with elevated borders, with marked induration beyond

Table 1 Mycological tests results used for the diagnosis of cryptococcosis case at Mycology Laboratory, Complexo Hospitalar/Santa Casa

	Sputum		Cerebrospinal fluid		Urine	Scum	Whole blood (isolates ^a)	Supraclavicular lymph node
Direct examination	Encapsulated yeasts suggesting <i>Cryptococcus</i> spp.	Negative	Negative	Negative	Negative	Not performed	Not performed	Encapsulated yeasts suggesting <i>Cryptococcus</i> spp.
Growth's silver stain (GMS)	Not performed	Yeast-like elements suggesting <i>Cryptococcus</i> spp.	Not performed	Not performed	Not performed	Not performed	Not performed	Not performed
Culture at 25°C (SBA + CL)	Yeast-like colonies compatible with <i>Cryptococcus</i> spp.	Yeast-like colonies compatible with <i>Cryptococcus</i> spp.	Yeast-like colonies compatible with <i>Cryptococcus</i> spp.	Yeast-like colonies compatible with <i>Cryptococcus</i> spp.	Not performed	Not performed	Yeast-like colonies compatible with <i>Cryptococcus</i> spp.	Yeast-like colonies compatible with <i>Cryptococcus</i> spp.
Culture at 35°C (BHI)	Not performed	Not performed	Yeast-like colonies compatible with <i>Cryptococcus</i> spp.	Yeast-like colonies compatible with <i>Cryptococcus</i> spp.	Not performed	Not performed	Yeast-like colonies compatible with <i>Cryptococcus</i> spp.	Yeast-like colonies compatible with <i>Cryptococcus</i> spp.
CY3B medium	Not performed	Not performed	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Not performed	Not performed	Not performed	Not performed
Latex (bibe)	Not performed	Not performed	Not performed	Not performed	I-1096	EE-D18376	Not performed	Not performed

BAL: Bronchoalveolar lavage, SBA + CL: Sabouraud dextrose agar with chloramphenicol, BHI: Brain heart infusion agar, CY3B: carvutamic-glycine-bromothymol blue

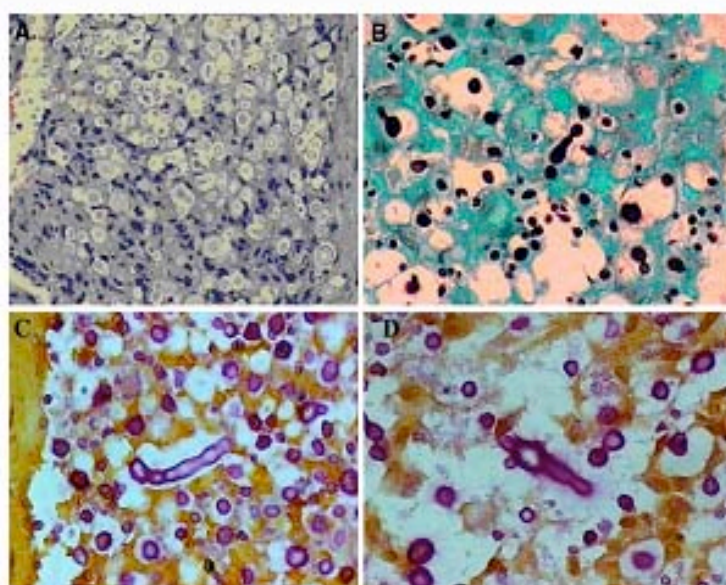


Fig. 1 Panel a–d shows cryptococcal lymphadenitis. Panel a shows complete distortion of lymph node architecture by the presence of compact masses of cryptococci (hematoxylin and eosin stain, 40× magnification). Panel b atypical fungal morphologies are observed, including germ tube-like structures and narrow-based budding. Fungal cell wall is stained in black (Grocott's silver stain, 40× magnification). Panel c, single

structure shows elongation consistent with pseudohyphae, in association with numerous typical yeasts showing camminophilic capsules (Mayer's mucicarmine stain, 40× magnification). Panel d shows encapsulated budding yeasts arranged in chains. The magenta capsules are strongly stained by mucicarmine (Mayer's mucicarmine stain, 40× magnification)

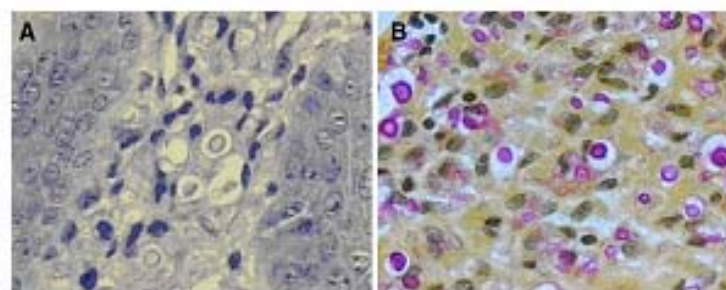


Fig. 2 Panel a, b shows tongue cryptococcosis. Panel a shows fungal structures surrounded by perinuclear clear zones (halos) (hematoxylin and eosin stain, 40× magnification).

Panel b shows fungal cells presenting camminophilic capsule are intensely stained in magenta (Mayer's mucicarmine stain, 40× magnification)

the border of the ulcer and minimal inflammation [4, 9, 24], especially in association with HIV infection [9, 10, 24, 25].

The first observation of hyphae in *Cryptococcus* strains was documented by Shadomy and Utz and was regarded as a chance mutation [26]. However, review of the literature and more recent observations

suggest otherwise. In 1896 Sanfelice described hyphae in the tissues of animals inoculated with a micro-organism isolated from fruit juice and which was in all probability *Cryptococcus* [27]. Cox and Tolhurst observed hyphal projections in the ventricular fluid obtained *postmortem* in one human case [28]. Moore documented germ tubes in the liver of a

patient with cryptococcosis [16]. Shadomy and Lurie demonstrated hyphae in 11 strains of *Cryptococcus* in tissue of mice [27, 29]. This report shows an atypical histopathologic manifestations of *Cryptococcus*, as also seen in CSF by others [30].

Cryptococcus species rarely produce pseudohyphae [5, 17, 31]. Actually, absence of pseudohyphae has been one of the proposed criteria for *Cryptococcus* identification and one of the main aspects used to differentiate cryptococcosis from candidosis [5]. In a review of cryptococcosis in patients with AIDS, the authors stated that the distinction between the *Cryptococcus* and *Candida*-types species can be made by the presence in *Cryptococcus* of a capsule, spherical form of the yeasts, narrow-based budding and the lack of pseudohyphae [31]. However, as shown in this report, atypical features such as pseudohyphae production, chains of budding yeasts and structures resembling germ tubes can all occur during cryptococcal infection. These characteristics are easily made evident by special staining techniques such as GMS and MM, performed in smears as well as in tissue biopsies [32]. These techniques are specific for the diagnosis of cryptococcosis and should be used to distinguish *Cryptococcus* species from other organisms that are similar in size and form.

In summary, the staining for the mucicarmophilic polysaccharide capsule in association with GMS staining allows for the correct identification of the atypical forms of *Cryptococcus* species.

Acknowledgement We would like to thank Dr. Alessandro C. Pasqualoni for critical reading and suggestions.

References

1. Litman ML, Zimmerman LE. Cryptococcosis. New York & London: Grune & Stratton; 1956.
2. Shihaya K, et al. Cranioma and cryptococcosis. *J Infect Chemother* 2005;11:115–22. doi:10.1007/s10156-005-0387-x.
3. Fernandes OFL, et al. *Cryptococcus neoformans* isolated from patients with AIDS. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000;33:75–8. doi:10.1590/S0037-86822000000300011.
4. Chandler FW, Wats JC. Cryptococcosis. In: Connor DH, Chandler FW, Schwartz DA, Manz HI, Lack EE, Bard JK, Utz JP, editors. Pathologic of infectious disease. Stamford: Appleton & Lange Press; 1989. p. 989–1001.
5. Williamson JD, et al. Atypical cytomorphologic appearance of *Cryptococcus neoformans*. A report of five cases. *Acta Cytol*. 1996;40:363–70.
6. Alfonso F, et al. Fine needle aspiration cytology of peripheral lymph node cryptococcosis. A report of three cases. *Acta Cytol*. 1994;38:459–62.
7. Molina JM, et al. Fine needle aspiration and cryptococcosis in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Ann Intern Med*. 1988;108:772.
8. Wit D, et al. Acquired immune deficiency syndrome presenting as bone marrow and mediastinal cryptococcosis. *Am J Med*. 1987;82:149. doi:10.1016/0002-9343(87)90394-9.
9. Kantarciglu AS, et al. Cryptococcal parotid involvement: an uncommon localization of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol*. 2006;44:279–83. doi:10.1080/1368780500286168.
10. Samantayake LP. Oral mycoses in HIV infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1992;73:171–80. doi:10.1016/0304-4220(92)90191-R.
11. Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. Washington: ASM Press; 1998.
12. Freed ER, et al. Meningoencephalitis due to hyphae-forming *Cryptococcus neoformans*. *Am J Clin Pathol*. 1971;55:30–3.
13. Kitum M, et al. Pseudohyphae of *Cryptococcus* in a cytologic specimen. *Acta Cytol*. 1998;42:817–8.
14. Neilson JB, et al. Pseudohyphal forms of *Cryptococcus neoformans*: decreased survival in vivo. *Mycopathologia*. 1981;73:57–9. doi:10.1007/BF00443015.
15. Neilson JB, et al. *Cryptococcus neoformans*: pseudohyphal forms surviving culture with *Acanthamoeba polyphaga*. *Infect Immun*. 1978;20:262–6.
16. Moore M. Radiate formation on pathogenic fungi in human tissue. *Arch Pathol*. 1946;42:113–52.
17. Ôhama M. Histopathologic diagnosis of fungal diseases. *Infect Control*. 1986;2:78–84.
18. Gordon MA, Devine J. Filamentation and endogenous sporulation in *Cryptococcus neoformans*. *Sabouraudia*. 1970;8:227–34.
19. Gustafson KS, Feldman L. Cryptococcal lymphadenitis diagnosed by fine-needle aspiration biopsy. *Diagn Cytopathol*. 2007;35:103–4. doi:10.1002/dc.20596.
20. Wannakrator P, et al. The morphological spectrum of lymphadenopathy in HIV infected patients. *Pathology*. 2007;39:223–7. doi:10.1080/0013020701230674.
21. Kim SH, et al. Intraabdominal cryptococcal lymphadenitis in a patient with systemic lupus erythematosus. *J Korean Med Sci*. 2005;20:1059–61.
22. Lanzafame M, et al. Mediastinal lymphadenitis due to cryptococcal infection in HIV-positive patients on highly active antiretroviral therapy. *Chest*. 1999;116:848–9. doi:10.1378/chest.116.3.848-a.
23. de Faria PR, et al. Tongue disease in advanced AIDS. *Oral Dis*. 2005;11:72–80. doi:10.1111/j.1601-0825.2004.01070.x.
24. Horgan MM, Powderly WG. Oral fungal infections. In: Anaisil EY, McGinnis MR, Pfaller MA, editors. Clinical mycology. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2003. p. 448–9.
25. Tzerbox F, et al. Cryptococcosis as an exclusive oral presentation. *J Oral Maxillofac Surg*. 1992;50:759. doi:10.1016/0278-2391(92)90115-G.

26. Shadomy HU, Utz JP. Preliminary studies on a hypha-forming mutant of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia*. 1966;58:383–90. doi:10.2307/3756912.
27. Lurie HI, Shadomy HU. Morphological variations of a hypha-forming strain of *Cryptococcus neoformans* (coward strain) in tissues of mice. *Sabouraudia*. 1971;9:10–4.
28. Cox LB, Tolhurst JC. Human toxidosis. Melbourne: Melbourne University Press; 1946.
29. Shadomy HU, Lurie HI. Histopathological observations in experimental cryptococcosis caused by a hypha-producing strain of *Cryptococcus neoformans* (coward strain) in mice. *Sabouraudia*. 1971;9:5–9.
30. Paschoal RC, Melhem MSC, Guelli T, Szekes MW. Atypical *Cryptococcus neoformans* cells isolated from cerebrospinal fluid samples. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2007;66:78–80.
31. Gall AA, et al. The pathology of pulmonary cryptococcal infections in the acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Pathol Lab Med*. 1986;110:502–7.
32. Gazzoni AF, et al. Histopathological techniques for diagnosing cryptococcosis due to capsule-deficient *Cryptococcus*: case report. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41:76–8. doi:10.1590/S0037-86822008000100015.