

## NEUROCRÍPTOCOCOSE POR *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* NÃO CAPSULADO

C.S. LACAZ \*, ELISABETH M. HEINS-VACCARI \*\*, NATALINA T. MELO \*\*,  
O.A. MORENO-CARVALHO \*\*\*, M.L.S. SAMPAIO \*\*\*\*, L.S. NOGUEIRA \*\*\*,  
R.J.S. BADARÓ \*\*\*\*, J.A. LIVRAMENTO \*\*\*\*\*

**RESUMO** — Os autores registram um caso de neurocriptococose em paciente HIV-negativo, por *Cryptococcus neoformans* acapsulado ou deficiente em cápsula. O quadro neurológico era de meningoencefalite subaguda, compatível ao diagnóstico de neurotuberculose, pelo exame do líquido cefalorraqueano (LCR). Estruturas leveduriformes foram encontradas no interior de macrófagos, ao exame citomorfológico do LCR. Cultivo do sedimento do LCR revelou a presença de *Cryptococcus neoformans* não capsulado (identificação bioquímica). A inoculação da amostra em camundongo, por via intraperitoneal, permitiu a produção de cápsula que desaparecia em cultivos. Foi estudada a micromorfologia do fungo à microscopia eletrônica de varredura. A evolução foi favorável com o emprego da anfotericina B associada a 5-fluorocitosina. Não foi caracterizada a variabilidade de *Cryptococcus neoformans* agente do processo.

**PALAVRAS-CHAVE:** meningoencefalite, criptococose, *Cryptococcus neoformans* não capsulado, líquido cefalorraqueano.

**Meningoencephalitis due to nonencapsulated *Cryptococcus neoformans*: case report.**

**SUMMARY** — The case of a patient with meningoencephalitis due to a nonencapsulated strain of *Cryptococcus neoformans* is reported; he had no risk factors for the disease or AIDS. Clinical examination showed a chronic meningoencephalitis first diagnosed as tuberculosis. In the second cerebrospinal fluid (CSF) examination after a week from admission yeasts appeared inside macrophage cells. CSF culture in Sabouraud medium disclosed nonencapsulated *Cryptococcus neoformans* (biochemical identification). Sample inoculation in mouse (intraperitoneal) evidenced a capsule that disappeared in several consecutive cultures. The morphology of the yeast was studied by electronic microscopy. After treatment with amphotericin B and 5-fluorocytosine the patient had a favorable evolution. The significance of capsular material is discussed.

**KEY WORDS:** meningoencephalitis, cryptococcosis, nonencapsulated *Cryptococcus neoformans*, cerebrospinal fluid.

A literatura médica registra alguns casos de criptococose pela variante não capsulada do *Cryptococcus neoformans*, sem especificação da variedade. Kwon-Chung & Bennett (1992)<sup>8</sup> assinalam, a respeito da cápsula do *C. neoformans*, ser a mesma fator relevante de virulência desta levedura. Mutantes acapsuladas, aparecidas espontaneamente ou obtidas pela ação de substâncias mutagênicas, demonstram geralmente não possuir virulência, para animais de laboratório, sendo mais facilmente fagocitadas pelos leucócitos. Alguns pesquisadores associaram a variante acapsular com a infecção pelo vírus da AIDS. Este fato não é, todavia, verdadeiro. Acreditamos que as chamadas mutantes acapsuladas do *C. neoformans* seriam melhor definidas como "deficientes em material capsular", como registram Farmer & Komorowski (1973)<sup>4</sup>. No caso em apreço, tratava-se de uma

Laboratório de Micologia Médica do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e Laboratório de Investigação Médica (LIM) 53 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP): \* Professor Emérito e Chefe do Laboratório; \*\* Assistente. Serviço de Líquido Cefalorraqueano da Fundação José Silveira, Salvador: \*\*\* Médico Responsável. Serviço de Infectologia do Hospital Espanhol, Salvador: \*\*\*\* Médico Assistente. Centro de Investigações em Neurologia, LIM 15, FMUSP: \*\*\*\*\* Médico Assistente. Aceite: 1-dezembro-1992.

Dr. Carlos da Silva Lacaz — Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - Av. Dr. Arnaldo 455 - 01246-903 São Paulo SP - Brasil.

lesão pulmonar com a presença de fungos semelhantes ao *Blastomyces dermatitidis*. A inoculação em camundongos por via intraperitoneal e cerebral permitiu o desenvolvimento da cápsula do *C. neoformans*.

Em nosso meio Capone et al. (1986)<sup>2</sup>, Severo et al. (1981)<sup>12</sup> e Moreno Castillo et al. (1986)<sup>10</sup> registraram casos de criptococose por amostras não capsuladas de *C. neoformans*. No caso registrado por Moreno Castillo et al.<sup>10</sup> a lesão criptocócica era cutânea, na região retro-auricular esquerda, havendo cura espontânea. Severo et al.<sup>12</sup> observaram provável caso de criptococose pulmonar, com nódulos subpleurais onde foi verificada reação granulomatosa, com presença de numerosos elementos semelhantes a *C. neoformans* não capsulado. Capone et al.<sup>2</sup> assinalaram, também, caso de criptococose pulmonar por *Cryptococcus neoformans* não capsulado, em paciente diabético.

Através de processo de radiação com raios ultravioleta, Bulmer et al. (1967)<sup>1</sup> obtiveram mutantes não capsuladas de *C. neoformans*. Outros trabalhos, como os de Frontling et al. (1982)<sup>5</sup>, Harding et al. (1979)<sup>6</sup>, Kozel (1977)<sup>7</sup>, Levinson et al. (1971)<sup>9</sup> e Bulmer et al. (1967)<sup>1</sup>, referem dados de ordem micológica sobre as mutantes acapsuladas do *C. neoformans*. Em um caso de peritonite criptocócica por *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (paciente em diálise), registrado por Morris et al. (1992)<sup>11</sup>, o exame bacterioscópico do líquido peritoneal revelou células leveduriformes com brotamento, sem cápsula evidente, sendo cultivado, todavia, *C. neoformans* var. *neoformans*.

#### RELATO DO CASO

USS, paciente branco, do sexo masculino, com 70 anos de idade, lavrador aposentado, natural e procedente de Campo Formoso, BA, observado na Fundação José Silveira, Salvador, BA. Admitido no dia 21.07.90 com queixa de cefaléia frontal, febre de caráter vespertino e perda de peso acentuada (10 Kg) há cerca de 2 meses. Tinha passado de tuberculose ósteo-articular tratada, há aproximadamente 10 anos. Vinha transferido de outro hospital, onde dera entrada no dia 09.07.90 com quadro de cefaléia, desorientação e febre. Foi colhido líquido cefalorraqueano (LCR) no dia 10.07.90 com suspeita de meningite tuberculosa e introdução de esquema tríplice, com melhora acentuada do quadro neurológico e desaparecimento da febre. No dia 17.07.90 realizou-se novo estudo do LCR que mostrou estruturas leveduriformes Gram positivas ao exame, inicialmente identificadas como *Candida* sp. Foi, então, transferido para esta Unidade para tratamento específico. Ao exame apresentava-se em bom estado geral, com níveis flutuantes de orientação, hidratado, corado, com dados vitais mantidos e exame segmentar sem alterações, com exceção de rigidez articular no joelho esquerdo e atrofia do membro inferior esquerdo. Introduzido esquema antifúngico com anfotericina B, na dose inicial de 5 mg/dia, aumentando-se progressivamente até 30 mg/dia, associada a 5-fluorocitosina (4 g/dia). O esquema tríplice foi suspenso.

A amostra de cultura do LCR foi encaminhada para identificação da espécie do fungo, sendo isolado *Cryptococcus neoformans* não capsulado, justificando o exame direto (tinta da China) negativo. Procedeu-se à avaliação para possíveis causas de depressão imunológica associada. Foi demonstrada linfocitopenia em diversos leucogramas e anergia cutânea. Não foi diagnosticada neoplasia ou síndrome da imunodeficiência adquirida. O paciente evoluiu mantendo bom estado geral com melhora dos períodos de desorientação, afebril. Houve aumento dos níveis de creatinina, sendo suspensas as drogas por 2 dias e reintroduzidas sem intercorrências, com melhora progressiva.

#### DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO

De Salvador, Bahia, recebemos cultivo leveduriforme isolado de LCR. O cultivo em lâmina, em ágar-fubá, revelou células globosas, sem filamentação. Prova de urease positiva e crescimento a 37 °C. Provas de assimilação — (a) positivas: dextrose, inositol, xilose, rafinose, galactose, sacarose, maltose; (b) positivas fracas: celobiose e trealose; (c) negativas: lactose, melibiose e  $KNO_3$ .

Camundongos inoculados com suspensão da levedura, por via intraperitoneal, morreram ao redor do 12º dia de inoculação. A autópsia, o exame direto com tinta da China permitiu observar presença de leveduras com cápsula. No entanto, semeando órgãos (baço, fígado, rim e cérebro) desses animais, o exame direto da cultura obtida demonstrou a presença de leveduras não capsuladas. A época não realizávamos a quimiotipagem de amostras de *C. neoformans*.

Microscopia eletrônica de varredura: células globosas a ovóides, com blastoconídios, ausência de cápsula (Fig. 1).

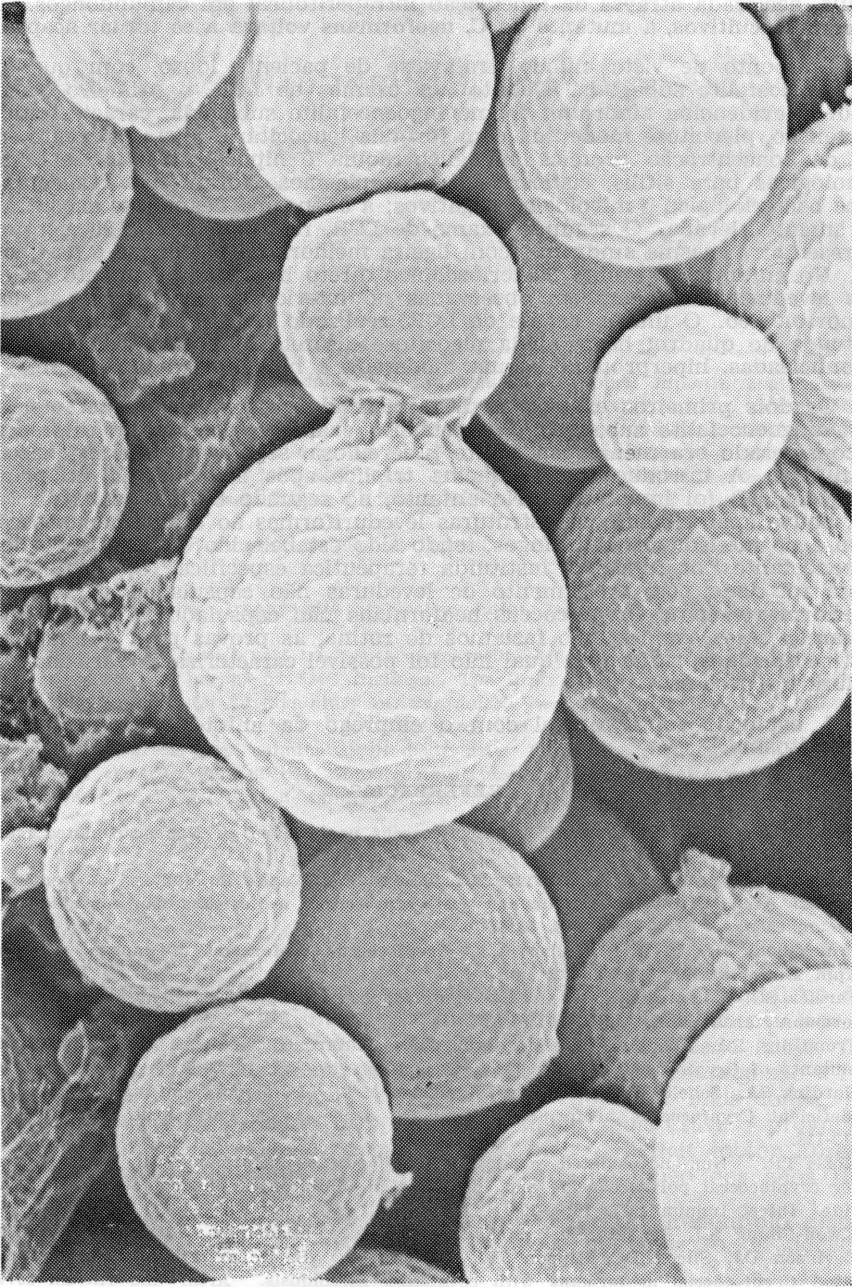


Fig. 1. Microscopia eletrônica de varredura mostrando blastoconídios globosos, destituído de cápsula, de *Cryptococcus neoformans*, notando-se um com brotamento no centro da fotografia. Aumento: 20400X.

#### COMENTÁRIOS

O caso apresentado, do ponto de vista micológico, é raro, estando bem documentada a amostra isolada através das provas bioquímicas e, principalmente, da microscopia eletrônica de varredura. Digno de registro foi a produção de

cápsula, acelerada através da inoculação intraperitoneal em camundongos. Todavia, com os cultivos, a mutante do *C. neoformans* voltava a se tornar acapsulada.

Do ponto de vista clínico, tratava-se de paciente idoso, com quadro de meningoencefalite subaguda. Quanto aos exames de LCR, o primeiro realizado a 10-07-90 evidenciou síndrome de meningoencefalite subaguda, caracterizada por hipertensão, pleocitose moderada com fórmula leucocitária mista, aumento moderado da concentração proteica, hipoglicorraquia e hipoclororraquia; as reações imunológicas para sífilis, cisticercose e toxoplasmose foram não reagentes e o exame bacteriológico e micológico negativos; a adenosina deaminase encontrava-se ligeiramente elevada. O segundo exame de LCR, realizado a 17-07-90, continuava a apresentar a mesma síndrome, com ligeira melhora da pleocitose e da glicorraquia. No entanto, ao exame bacterioscópico direto houve aparecimento de estruturas leveduriformes, também observadas no interior de macrófagos ao exame citomorfológico. O último exame de LCR, realizado a 12-09-90, mostrou melhora acentuada do quadro: havia ainda pleocitose discreta às custas de células linfomononucleadas, hiperproteinorraquia moderada e hipoglicorraquia discreta.

Os dois primeiros exames de LCR realizados apresentavam características de meningoencefalite subaguda. Ao primeiro exame o diagnóstico diferencial a ser considerado era meningoencefalite tuberculosa, seguida de meningoencefalite por fungos. A introdução do esquema tríplice após a realização do primeiro exame de LCR foi imperativa. No entanto, no segundo exame, realizado 7 dias após, houve aparecimento de estruturas leveduriformes ao exame bacterioscópico direto e no interior de macrófagos, tendo sido estabelecido o diagnóstico de meningoencefalite por fungos e instituída terapêutica específica. O diagnóstico de certeza foi dado pelo crescimento de leveduras não capsuladas, caracterizadas posteriormente como *Cryptococcus neoformans* não capsulado. A época em que realizamos esses exames, não fazíamos de rotina, as provas para quimiotipagem do *C. neoformans*, razão pela qual não foi possível caracterizar a variedade desta levedura no processo.

A evolução foi favorável com o emprego da anfotericina B associada à 5-fluorocitosina.

#### REFERÊNCIAS

1. Bulmer GS, Sans MD, Gunn CM. *Cryptococcus neoformans*: I. Nonencapsulated mutants. *J Bacteriol* 1967, 94:1475-1479.
2. Capone D, Gonçalves AJR, Andrade EM, Peyneau A, Wanke B, Montessi J, Romão PAA, Kritski AL. Criptococose pulmonar por *Cryptococcus neoformans* não capsulado: relato de um caso. *J Bras Med* 1986, 50:67-70.
3. Cruickshank JG, Cavill R, Jelbert M. *Cryptococcus neoformans* of unusual morphology. *Appl Microbiol* 1973, 25:309-312.
4. Farmer SG, Komorowski RA. Histologic response to capsule-deficient *Cryptococcus neoformans*. *Arch Pathol* 1973, 96:333-337.
5. Fromtling RA, Shadomy HJ, Jacobson ES. Decreased virulence in stable, acapsular mutants of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 1982, 79:23-29.
6. Harding SA, Scheld WM, Feldman PS, Sande MA. Pulmonary infection with capsule-deficient *Cryptococcus neoformans*. *Virchows Arch Abt A Path Anat Histol* 1979, 382:113-118.
7. Kozel TR. Non-encapsulated variant of *Cryptococcus neoformans*: II. Surface receptors for cryptococcal polysaccharide and their role in inhibition of phagocytosis by polysaccharide. *Infect Immun* 1977, 16:99-106.
8. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. *Medical mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992.
9. Levinson DJ, Silcox DC, Rippon JW, Thomsen S. Septic arthritis due to nonencapsulated *Cryptococcus neoformans* with coexisting sarcoidosis. *Arthr and Rheum* 1974, 17:1037-1047.
10. Moreno Castillo JL, Del Negro G, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Primary cutaneous cryptococcosis. *Mycopathologia* 1986, 96:25-28.
11. Morris B, Chan YF, Reldy J, Woodgyer A. Cryptococcal peritonitis in a CAPD patient. *J Med Vet Mycol* 1992, 30:309-315.
12. Severo LC, Londero AT, Martins SC, Reolon M, Geyer RG. Provável criptococose pulmonar causada por *Cryptococcus neoformans* não-capsulado. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 1981, 23:283-286.