

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Miguel Dewes Oliveira

**NEUROCRÍPTOCOCOSE EM CÃES E GATOS: ASPECTOS  
ANATOMOPATOLÓGICOS E MORFOLOGIA FÚNGICA**

Santa Maria, RS  
2023

Miguel Dewes Oliveira

**NEUROCRÍPTOCOCOSE EM CÃES E GATOS: ASPECTOS  
ANATOMOPATOLÓGICOS E MORFOLOGIA FÚNGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Patologia e Patologia Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> PhD. Glaucia Denise Kommers

Santa Maria, RS  
2023

**Miguel Dewes Oliveira**

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Oliveira, Miguel Dewes  
NEUROCRIPTOCOCOSE EM CÃES E GATOS: ASPECTOS  
ANATOMOPATOLÓGICOS E MORFOLOGIA FÚNGICA / Miguel Dewes  
Oliveira.- 2023.  
40 p.; 30 cm

Orientadora: Glaucia Denise Kommers  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós  
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2023

1. criptococose 2. histologia 3. sistema nervoso 4.  
neurolocalização I. Kommers, Glaucia Denise II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, MIGUEL DEWES OLIVEIRA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

# **NEUROCRIPCOCOSE EM CÃES E GATOS: ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS E MORFOLOGIA FÚNGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Patologia e Patologia Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Aprovada em 15 de dezembro de 2023

---

**Glucia Denise Kommers, PhD. (UFSM)**  
(Presidente, orientadora)

---

**Maria Andréia Inkelmann, Dra. (UNIJUÍ)**

---

**Adriano Tony Ramos, Dr. (UFSC)**

Santa Maria, RS  
2023

## AGRADECIMENTOS

A minha mãe Claudia Regina Dewes, por todo amor e suporte, a minha avó Ines Maria Dewes, meu padrasto Paulo Falcão, minha sogra Eliana e a toda minha família.

Ao amor da minha vida, Fernanda Haissa Cavasin, inspiração e motivação.

Ao meu irmão Bruno Dewes, pela parceria, conversas, treinos e amizade.

Aos meus grandes amigos de Toledo: Vitor e Danny, Ninho, Vini e Malu, Lucas, Sisti e Samuel os quais senti falta todos os dias.

Aos colegas do LPV, meus agradecimentos por toda ajuda. Desejo todo sucesso e realização.

Às professoras Glaucia D. Kommers e Mariana Martins Flôres, por suas orientações, ensinamentos, dedicação e paciência.

## EPÍGRAFE

*"If you are not willing to risk it all, you don't want it bad enough"*  
*James Bond*

## RESUMO

# NEUROCRÍPTOCOCOSE EM CÃES E GATOS: ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS E MORFOLOGIA FÚNGICA

**AUTOR: Miguel Dewes Oliveira**

**ORIENTADORA: Glaucia Denise Kommers**

A criptococose é uma infecção fúngica que acomete comumente cães e gatos, manifestando-se frequentemente com comprometimento neurológico. Este estudo teve como objetivo estudar as características neuropatológicas da criptococose em nove gatos e dois cães que foram necropsiados no Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), e por meio desses dados, elaborou-se o artigo científico que compõe esta dissertação. A metodologia utilizada incluiu a revisão dos laudos de necropsia dos casos diagnosticados com criptococose envolvendo o sistema nervoso, coletando dados como sexo, raça, idade, sinais clínicos, localização das lesões, macroscopia e histologia. Foi feita a reavaliação histológica (pela hematoxilina e eosina [HE] e Alzul alciano) para caracterização e localização das lesões, morfologia do agente, carga fúngica, tipo e intensidade do infiltrado inflamatório, lesões no parênquima nervoso e características morfológicas das leveduras. Critérios morfológicos fúngicos, como espessura da cápsula e da parede da levedura e frequência de brotamentos, foram analisados em cada caso. Apenas seis casos apresentaram sinais neurológicos, sendo a cegueira e a inclinação da cabeça os mais frequentes, além de outros sinais variados, como síncope, sonolência e ataxia. Condições debilitantes e imunossupressoras foram detectadas em cinco casos. Lesões macroscópicas no sistema nervoso central (SNC) foram encontradas em cinco casos, apresentando-se como massas irregulares, friáveis, macias, gelatinosas e acinzentadas, com bordas distintas. Nas seções analisadas, dentro da disponibilidade de blocos de parafina para reavaliação, os achados histológicos revelaram que o córtex telencefálico foi o local mais acometido do SNC, observado nos 11 casos. Essa região exibiu maior carga fúngica e menor resposta inflamatória, em comparação com outras neurolocalizações. Entre as regiões corticais, o córtex frontal foi envolvido em quatro casos, o córtex parietal em seis e o occipital em cinco. O cerebelo também foi afetado em todos os casos, mas mostrou uma resposta inflamatória mais branda e menor carga fúngica do que os córtices telencefálicos. Além disso, o envolvimento pulmonar também foi observado em todos os casos. A intensidade inflamatória associada às leveduras no SNC foi predominantemente leve a moderada, sendo acentuada apenas em dois casos, e a carga fúngica foi mais frequentemente moderada ou acentuada, sendo leve em apenas dois casos. A heterogeneidade observada na resposta inflamatória e carga fúngica revela a natureza complexa desta infecção. Outros tecidos nervosos afetados foram o nervo óptico e as raízes nervosas e gânglios da medula espinhal, principalmente em gatos. Em conclusão, este estudo mostra as características neuropatológicas da criptococose em uma série de casos em cães e gatos, enfatizando a importância de considerar neurolocalizações específicas nesta infecção fúngica. Além de contribuir para uma melhor compreensão do envolvimento simultâneo dos sistemas respiratório e nervoso.

**Palavras-chave:** criptococose, histoquímica, sistema nervoso, neurolocalização.

## ABSTRACT

# NEUROCRYPTOCOCCOSIS IN DOGS AND CATS: ANATOMOPATHOLOGICAL ASPECTS AND FUNGAL MORPHOLOGY

**AUTHOR:** Miguel Dewes Oliveira  
**ADVISOR:** Glaucia Denise Kommers

Cryptococcosis is a fungal infection that commonly affects dogs and cats, often manifesting with neurological signals. This study aimed to access the neuropathological characteristics of cryptococcosis in nine cats and two dogs that were necropsied at the Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) of Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), and using these data, it was compiled the scientific article that composes this dissertation. The methodology used included the review of the necropsy reports of cases diagnosed with cryptococcosis involving the nervous system, collecting data such as sex, breed, age, clinical signs, location of the lesions, macroscopy and histology. Histological reevaluation was performed (using hematoxylin and eosin [HE] and Alcian Blue) to characterize and locate the lesions, morphology of the agent, fungal load, type and intensity of the inflammatory infiltrate, lesions in the nervous parenchyma and morphological characteristics of the yeasts. Fungal morphological criteria, such as capsule and yeast wall thickness and budding frequency, were analyzed in each case. Only six cases presented neurological signs, with blindness and head tilt being the most common, in addition to other varied signs, such as syncope, drowsiness and ataxia. Debilitating and immunosuppressive conditions were detected in five cases. Macroscopic lesions in the central nervous system (CNS) were found in five cases, presenting as irregular, friable, soft, gelatinous and grayish masses, with distinct borders. In the sections analyzed, within the availability of paraffin blocks for reevaluation, the histological findings revealed that the telencephalic cortex was the most affected site in the CNS, observed in the 11 cases. This region exhibited a higher fungal load and lower inflammatory response, compared to other neurolocations. Among the cortical regions, the frontal cortex was involved in four cases, the parietal cortex in six and the occipital cortex in five. The cerebellum was also affected in all cases, but showed a milder inflammatory response and lower fungal burden than the telencephalic cortices. Furthermore, pulmonary involvement was also observed in all cases. The inflammatory intensity associated with yeasts in the CNS was predominantly mild to moderate, being accentuated in only two cases, and the fungal load was more frequently moderate or severe, being mild in only two cases. The heterogeneity observed in the inflammatory response and fungal burden reveals the complex nature of this infection. Other affected nervous tissues were the optic nerve and the nerve roots and ganglia of the spinal cord, mainly in cats. In conclusion, this study shows the neuropathological features of cryptococcosis in a series of cases in dogs and cats, emphasizing the importance of considering specific neurolocations in this fungal infection. In addition to contributing to a better understanding of the simultaneous involvement of the respiratory and nervous systems.

**Keywords:** cryptococcosis, histology, nervous system, neurolocalization.



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	11
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O GÊNERO <i>CRYPTOCOCCUS</i> .....	11
2.2 PATOGÊNESE.....	12
2.3 SINAIS CLÍNICOS E ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS.....	15
2.4 NEUROCRYPTOCOCCOSE.....	17
2.5 HISTOPATOLOGIA .....	18
2.6 TRATAMENTO.....	19
<b>3 MANUSCRITO – Neurocryptococcosis in Dogs and Cats Anatomopathological and Fungal Morphological Aspects in a case series</b> .....	21
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	36
<b>5 REFERÊNCIAS</b> .....	37

## 1 INTRODUÇÃO

A ocorrência de doenças fúngicas em humanos e animais domésticos tem sido cada vez mais relatada nos últimos anos, possivelmente devido ao aumento de terapias imunossupressoras e mudanças climáticas (SEYEDMOUSAVI, 2018; GUARNER; BRANDT, 2011). Dentre as micoses mais frequentes, a criptococose emergiu como uma infecção fúngica com significativa letalidade e morbidade. Apresentando-se tipicamente como meningoencefalite, muitas vezes é secundária a processos cutâneos ou pulmonares e pode ocorrer tanto em indivíduos imunocompetentes quanto em imunocomprometidos (EGHWRUDJAKPOR; ALLISON, 2009; LACAZ et al., 2002). Recentemente, foi sugerido que infecções fúngicas, como a criptococose, podem desempenhar um papel importante nas infecções secundárias causadas pelo novo Coronavírus (SARS-CoV-2) em humanos, devido ao aumento da suscetibilidade causada por esta doença. Isso pode resultar no agravamento dos sintomas respiratórios e no aumento da mortalidade por co-infecções (GANGNEUX et al., 2020). A infecção por *Cryptococcus* sp. já foi relatada em pacientes com doença grave por SARS-CoV-2 e que receberam terapia com corticosteroides e foram internados na unidade de terapia intensiva (REGALLA et al., 2022).

*Cryptococcus* spp. são leveduras dimórficas encapsuladas, responsáveis por causar infecções mundialmente em humanos e em várias espécies animais, incluindo animais domésticos, silvestres e de laboratório. Em gatos, é a doença micótica sistêmica mais comum. As espécies patogênicas de *Cryptococcus* mais relatadas são *C. neoformans* e *C. gattii* (CASWELL; WILLIAMS, 2007).

Os sinais clínicos podem ser categorizados em quatro principais síndromes, tanto em cães quanto em gatos: neurológica, respiratória, ocular e cutânea (CASTELLÁ et al., 2008). Frequentemente a doença afeta o sistema nervoso central e os olhos (LARSSON et al., 2003). A síndrome neurológica, mais comum nos cães, pode ser manifestada como uma meningoencefalomielite, na qual os sinais neurológicos exibidos estão conectados ao local da lesão (WILKINSON, 1988).

Embora os aspectos da criptococose no sistema nervoso (neurocriptococose) sejam descritos em humanos, como as neurolocalizações mais afetadas, tipo e intensidade da inflamação, como as leveduras entram no SNC e as características morfológicas que são consideradas fatores de virulência (CHANG et al., 2004; CHARLIER et al., 2005; GUEVARA-CAMPOS et al., 2009; PINTO, 2010), esses dados ainda são escassos em animais, com poucos estudos detalhando o envolvimento do sistema nervoso (SYKES et al., 2010).

O presente estudo retrospectivo, portanto, tem como objetivo descrever detalhadamente a infecção por *Cryptococcus* spp. em 11 casos (nove gatos e dois cães) de necropsia com envolvimento do sistema nervoso, diagnosticados no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (LPV-UFSM), caracterizando os principais aspectos clínicos, macroscópicos e histo-

lógicos dessa infecção, as neurolocalizações acometidas no sistema nervoso, tipo e intensidade inflamatória, carga fúngica e a morfologia das leveduras.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O GÊNERO *Cryptococcus*

São chamados de fungos todos os organismos que integram o Reino Fungi, eles podem ser organismos unicelulares (leveduras) ou pluricelulares (filamentosos); são heterotróficos, não fotossintéticos, ou seja, incapazes capazes de sintetizar o próprio alimento e possuem quitina na composição de sua parede celular (GAMBALE, 2010; QUINN et al., 2018). Estima-se que das 800.000 espécies de fungos descritas, apenas 400 delas sejam patogênicas aos mamíferos (QUINN et al., 2018). As doenças fúngicas têm sido descritas mais comumente em humanos e animais domésticos (SEYEDMOUSAVI, 2018), devido ao crescente uso de terapias relacionadas a imunossupressão e alterações climáticas (GUARNER; BRANDT, 2011).

Dentre as mais importantes micoses, destaca-se a criptococose, também conhecida como blastomicose europeia, torulose e doença de Busse-Buschke. É uma zoonose oportunista, causada por uma levedura encapsulada, pertencente ao gênero *Cryptococcus* (MÜLLER; NISHIZAWA, 2017). Em um grande estudo retrospectivo que avaliou infecções micóticas profundas em animais, foi concluído que 46,1% desses casos foram ocasionados por *Cryptococcus* spp. (DAVIES; TROY, 1996; CASWELL; WILLIAMS, 2007). É uma enfermidade micótica sistêmica, subaguda ou crônica, que acomete desde o trato respiratório superior, como a cavidade nasal e tecidos paranasais, e o trato respiratório inferior, como traqueia, brônquios e pulmões. Tem tropismo também pelo sistema nervoso, comumente afetando o sistema nervoso central, olhos, pele e outros órgãos (FARIA; XAVIER, 2009).

*Cryptococcus* spp. pertencem ao filo *Basidiomycota*, classe *Basidiomycetes*, família *Tremellaceae* (BOSCO et al., 2016). *Cryptococcus neoformans* (var. *neoformans* e var. *grubii*) e *Cryptococcus gattii* são os agentes causadores da criptococose e correspondem à forma assexuada de basidiomicetos zoopatógenos. Nos meios de cultivo, formam-se colônias de coloração esbranquiçada a creme, de textura mucoide brilhante, margem lisa e bem delimitada. Crescem em Ágar Sabouraud glicose 2% e Ágar extrato de malte e levedura, após três dias estando à temperatura de 25 a 37°C (MÜLLER; NISHIZAWA, 2017).

Classificados como leveduras dimórficas, com morfologia celular variando de oval a esférica; em um estudo mediram entre de 1,67 a 10µm de diâmetro, com uma parede que variando de 0,17 a 1,18µm de espessura (GALIZA et al., 2014b). De reprodução assexuada, esses fungos se dividem principalmente por brotamento simples, também podendo eventualmente fazer 2 a 3 brotamentos simultâneos nos tecidos. Estes brotamentos dão origem às células-filhas, as quais permanecem ligadas à célula-mãe por um istmo que pode se romper a qualquer momento, dando a população celular um tamanho variável (BOSCO et al., 2016). Esse fungo se diferencia entre todos os fungos patogênicos

em espécies domésticas, pois é envolto por uma distinta e espessa cápsula mucopolissacarídica (CASWELL; WILLIAMS, 2007). O componente capsular predominante é a Glucoronoxilomanana (GXM), sendo composta também por Galactoxilomanana (GalXM) e manoproteína (MP) (BOSCO et al., 2016).

O componente capsular predominante determina os cinco sorotipos de *Cryptococcus* (A, B, C, D, AD), com base nas diferenças antigênicas capsulares. Os sorotipos A e D são relacionados a *C. neoformans* e os sorotipos B e C, relacionados a *C. gattii*. Um quinto sorotipo é relatado em alguns isolados que possuem características de ambos os sorotipos, denominado de sorotipo híbrido AD (SORREL, 2011). Variações morfológicas como o tamanho da célula e a espessura parede e da cápsula, assim como o diâmetro total das leveduras, podem ser indicativos de sorotipos diferentes (XIE et al., 2012); no entanto, a espessura da cápsula, a parede e o diâmetro da célula das leveduras podem variar de acordo com o órgão analisado e o tempo de infecção (GALIZA et al., 2014b).

A capacidade de produzir melanina simultaneamente com a formação de colônias marrons em meios de cultura com extrato de sementes de Níger é, exclusivamente, característica das espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, não ocorrendo em nenhuma outra espécie de *Cryptococcus* ou levedura que seja de interesse médico (MÜLLER; NISHIZAWA, 2017).

Os agentes do gênero *Cryptococcus* podem ser isolados a partir de uma variedade de substâncias, dependendo de sua localização e espécie. *C. neoformans* possui distribuição global e infecta principalmente indivíduos imunocomprometidos. É encontrado de forma consistente em excretas e restos fecais de aves, principalmente pombos, nos quais raramente causa infecção sistêmica, presente apenas no trato gastrintestinal. Cães e gatos podem também carrear o fungo na cavidade nasal sem desenvolver a doença (STOKES, 2016). Em outros locais como no solo contendo fezes de pombos e, com menor frequência, no leite, no ar, na poeira, em ninhos de vespas e marimbondos, na grama e em outros insetos, já foi relatada a presença do agente. *C. gattii*, por sua vez, tem sido historicamente associado a climas tropicais e subtropicais, podendo ser encontrado no ambiente, na água doce e água do mar e em cascas de árvores vivas (SYKES; MALIK, 2015).

A criptococose já foi relatada em diversos animais domésticos e selvagens, incluindo felinos, caninos, equinos, ovinos, caprinos, bovinos, aves, mamíferos aquáticos, coalas e outros marsupiais (SYKES; MALIK, 2015). Dentre as espécies com maior prevalência, se destacam os felinos, caninos, bovinos e aves. Os felinos são a espécie doméstica mais acometida, na qual as infecções sistêmicas são mais frequentes e o diagnóstico é de 5 a 6 vezes mais comum do que em cães (STOKES, 2016).

## 2.2 PATOGÊNESE

Apesar do modo de transmissão não ser bem elucidado, acredita-se que a forma mais provável

ocorra, na maioria dos casos, por inalação de células de levedura ou na forma de esporos. Quando o agente é exposto a substratos secos, há uma redução significativa do tamanho da sua cápsula, facilitando a formação de aerossóis e sua inalação. O agente então se aloja nas vias aéreas superiores (FARIA; XAVIER, 2009). A patogenia da criptococose depende da quantidade inoculada, da virulência, da cepa e do estado de imunidade do hospedeiro (SYKES; MALIK, 2015). Diferentemente de *C. gattii*, o qual infecta indivíduos saudáveis com frequência, *C. neoformans* infecta principalmente indivíduos imunossuprimidos; embora *C. gattii* já tenha sido relatado também infectando indivíduos imunossuprimidos (STOKES, 2016). Fatores imunossupressores, que podem ser fármacos, como glicocorticoides e quimioterápicos, doenças virais, como o vírus da leucemia felina, o vírus da imunodeficiência felina e da cinomose e doenças debilitantes, como neoplasias e insuficiências em órgãos, são predisponentes à infecção e podem determinar o prognóstico da afecção. Animais tem a mesma susceptibilidade à infecção vivendo em ambientes internos ou ao ar livre e indivíduos com menos de 1 mês e com mais de 15 anos são mais comumente afetados, sendo a média etária ao diagnóstico de 6 anos (BOSCO et al., 2016).

A criptococose pode ser localizada ou disseminada por todo o corpo. Existe tropismo para o sistema respiratório, particularmente a cavidade nasal e para o sistema nervoso central (SNC) (SYKES; MALIK, 2015). O neurotropismo é explicado pela produção de uma enzima chamada fenoloxidase pela levedura, que a permite sintetizar a melanina a partir de compostos difenólicos como as catecolaminas (WILLIASON et al., 1998). As leveduras também podem atingir o encéfalo por extensão, a partir de uma lesão nasal, seja através da placa cribiforme ou dos nervos ópticos (LESTER et al., 2004; MALIK et al., 2006).

Dentre os conhecidos fatores de virulência do agente destaca-se a cápsula mucopolissacarídea, a qual acredita-se que seja capaz de bloquear a interação entre anticorpos e receptores da superfície de macrófagos, dificultando a fagocitose e a migração de leucócitos. Também inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias, inativa o sistema complemento e pode suprimir as respostas das células T (SYKES; MALIK, 2015, BOVERS, 2008). A resposta inflamatória do hospedeiro, portanto, tende a ser e geralmente mínima, consistindo de macrófagos, linfócitos e plasmócitos (SUMMERS, 1995). Sua intensidade depende dos fatores de virulência da levedura e do estado imunológico do hospedeiro (CASWELL; WILLIAMS, 2007).

Além da cápsula mucopolissacarídica, outros fatores de virulência incluem a produção de melanina e manitol, substâncias relacionadas ao neurotropismo do agente que atuam como potentes antioxidantes para reduzir a toxicidade dos radicais livres no fagolisossomo (STEENBERGEN; CASADEVAL, 2003). A fosfolipase, que atua interrompendo as membranas das células hospedeiras, e os ácidos siálicos na parede celular dos fungos direcionam as proteínas do complemento para a degradação, em vez de opsonizar fragmentos e anafilatoxinas (SYKES; MALIK, 2015). A enzima urease,

que facilita a invasão de células fúngicas na corrente sanguínea e no cérebro, aumentando o sequestro de levedura nos leitos microcapilares e promovendo uma resposta imune Th2 não protetora no pulmão (OSTERHOLZER; MILAM, 2009).

É descrito que a infecção frequentemente chega ao sistema nervoso central por via hematogena, a partir de uma infecção pulmonar ou cutânea, ou por continuidade, através da extensão da infecção na cavidade nasal através da placa cribriorme, seio frontal ou ao longo dos nervos cranianos até o cérebro (SYKES; MALIK, 2015). As alterações no sistema nervoso costumam ser sutis, podendo se apresentar como nódulos ou cistos com conteúdo gelatinoso, viscoso e acinzentado, únicos ou múltiplos, e de diferentes extensões ao longo do cérebro, meninges, principalmente do cerebelo e ventrículos. Essas lesões também podem estar presentes no globo ocular. O aspecto gelatinoso desses nódulos ou do conteúdo dos cistos deve-se à proliferação de leveduras com cápsulas de mucopolissacarídeo nos tecidos (FRY; McGAVIN, 2013).

Casos clínicos compilados em humanos, revelaram que cerca de 50% dos pacientes já apresentam comprometimento do sistema nervoso central (SNC) nas fases iniciais da infecção criptocócica, causando meningoencefalite (GUEVARA-CAMPOS et al., 2008). Ainda não há certeza quanto à causa desse neurotropismo; porém, três hipóteses principais têm sido consideradas. A primeira é que o SNC possui substratos específicos para o crescimento e proliferação do fungo, como as catecolaminas (dopamina, norepinefrina e adrenalina). A segunda hipótese propõe que o SNC poderia ser um local de escape da vigilância imunológica do hospedeiro, já que o cérebro e a barreira hematoencefálica (BHE) apresentam uma resposta imune não tão vigorosa e retardada (MORETTI et al., 2008; GUEVARA-CAMPOS et al., 2008; PINTO, 2010). E a terceira teoria é que os neurônios têm receptores de membrana distintos, que poderiam atrair *Cryptococcus* spp. mais intensamente do que as células encontradas em outros órgãos (PINTO, 2010).

Outros estudos investigando como *Cryptococcus* spp. cruzaria a BHE propuseram três mecanismos possíveis: a passagem transcelular através das células endoteliais, que envolve uma interação ligante-receptor específica (transcitose) e uma passagem paracelular entre as células endoteliais (paracitose), que pode ocorrer após alterações mecânicas ou bioquímicas com a interrupção da BHE. Nesses casos é descrito, durante a transmigração para o cérebro, que pode ocorrer uma alteração morfológica como parte desse processo, vista como uma morfologia distinta das leveduras, com formato ovoide, formando um broto na superfície celular (CHANG et al 2004; CHEN et al., 2003; JONG et al., 2008; KRONSTAD et al., 2011).

Existe também o método do "cavalo de Troia", no qual as células são transportadas dentro de um monócito hospedeiro. As leveduras intracelulares têm a capacidade de serem transportadas por macrófagos para diferentes sítios anatômicos, evitando a exposição a ameaças extracelulares, como componentes do complemento ou agentes antimicrobianos circulantes na corrente sanguínea (MA;

MAY, 2009), conforme demonstrado em um estudo (CHARLIER et al., 2005), que sugere a passagem transcelular de leveduras através da BHE através da subversão de monócitos como uma ferramenta eficaz para o agente escapar das defesas do hospedeiro. Foi observado que o cruzamento da BHE ocorre exclusivamente por meio do sequestro de microcapilares e da ruptura de células endoteliais e ocorre especificamente nos capilares corticais, sem envolver o plexo coroide (CHARLIER et al., 2005).

### 2.3 SINAIS CLÍNICOS E ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS

Os sinais clínicos da criptococose dependem da localização da infecção, que em geral acomete a cavidade nasal, pele, subcutâneo, sistema nervoso central e linfonodos regionais. As formas clínicas descritas são: pulmonar, cutânea, mucocutânea, encefálica, visceral e óssea. Os felinos usualmente desenvolvem a forma localizada da infecção, a qual se caracteriza como uma deformação do plano nasal, associada ao inchaço subcutâneo na ponta do nariz, com massas proliferativas de tecido mole (conhecida como “nariz de palhaço”). Já os cães têm tendência a apresentar a forma generalizada da doença (ALVES; PORTO, 2016).

As principais manifestações clínicas da criptococose incluem coriza, ruídos sibilantes na respiração e corrimento nasal, podendo ainda ter sinais de dispneia e apresentar respiração estertorosa devido à obstrução do trato respiratório por granulomas. As manifestações cutâneas em cães e gatos, geralmente são observadas em forma de nódulos dérmicos ou subcutâneos, únicos ou múltiplos, polipoides ou difusos, com aspecto gelatinoso, ulcerados e exsudativos. Distribuídos principalmente na região da cabeça, face e membros. Erosões, úlceras e fistulas em focinho, língua, gengiva, palato e lábios podem também ser encontradas em animais doentes (SANTOS; ALESSI, 2016). Pequenas massas cutâneas ou subcutâneas podem favorecer o diagnóstico clínico, principalmente nos felinos, em que a rinite micótica na cavidade nasal rostral é a apresentação mais frequente (CASWELL; WILLIAMS, 2016).

Na forma sistêmica, os órgãos frequentemente afetados pela infecção são os olhos, sistemas nervoso central e respiratório, principalmente os seios nasais e pulmões (HONSHO et al., 2003). Na necropsia, as lesões se apresentam como áreas gelatinosas brancacentas, discretas, multifocais, podendo ocorrer formação de nódulos polipoides ou difusos com aspecto gelatinoso ao corte, em diferentes tipos de tecidos (MALIK et al., 1999). Nos pulmões, o desenvolvimento de nódulos multifocais friáveis e de aspecto gelatinoso, pode estar associado à um quadro concomitante de broncopneumonia supurativa, decorrente de infecções bacterianas secundárias (CASWELL; WILLIAMS, 2016). Devido ao aspecto macroscópico das lesões, a criptococose pode ser facilmente



confundida com outras afecções comuns em cães e gatos, de etiologias infecciosas ou neoplásicas (MCGILL et al., 2009).

No sistema nervoso central, as alterações costumam ser sutis, podendo se apresentar como nódulos ou cistos com conteúdo gelatinoso, viscoso e acinzentado, únicos ou múltiplos, denominados "criptococomas" (FRY; MCGAVIN, 2013). São de diferentes extensões ao longo do cérebro, meninges, principalmente do cerebelo e ventrículos, também podem estar presentes no globo ocular (MILLER; ZACHARY, 2016). Opacidade meníngea, edema e congestão também são achados comuns (SUMMERS, 1995). Grandes lesões gelatinosas e irregulares podem ocorrer, chamadas de "torulomas" (RISTOW; DAVIS, 2021). Em um estudo (SYKES et al., 2010), os achados macroscópicos de necropsia mais frequentes em cães e gatos incluíram: edema e congestão meníngea; lesões de massa gelatinosa cinza associadas ao cérebro e medula espinhal; alargamento e amolecimento dos bulbos olfatórios e herniação cerebelar pelo forame magno. O aspecto gelatinoso desses nódulos ou do conteúdo dos cistos deve-se à proliferação de leveduras com cápsulas de mucopolissacarídeo nos tecidos (FRY; MCGAVIN, 2013)

As lesões em outros órgãos são geralmente observadas em casos de criptococose sistêmica, o acometimento de órgãos viscerais abdominais é considerado incomum, mas tende a ocorrer mais frequentemente em cães do que em gatos. Órgãos como pâncreas, fígado, rim, vesícula urinária, próstata e glândula adrenal podem ser afetados. Além disso, manifestações menos comuns de criptococose incluem doenças ósseas e articulares, otite média e piotórax (BARRS et al. 2005; O'BRIEN et al., 2006; PAULIN et al., 2013; TRIVED et al., 2011).

O diagnóstico clínico geralmente é feito através da citologia e a cultura micológica, a qual é considerada o padrão-ouro para o diagnóstico da doença (LIMA et al., 1977). A cultura, assim como a citologia, pode ser feita a partir de amostras de *swabs* nasais, lavado nasal, aspirado com agulha de lesões expansivas ou linfonodos aumentados, amostras de lavado broncoalveolar, líquido pleural, líquido cefalorraquidiano ou urina (SYKES; MALIK, 2015). Podem ocorrer também, no entanto, casos de criptococose sem alterações clínicas e lesões macroscópicas indicativas, que não levantam suspeita clínica, a qual poderia ser facilmente confirmada pela cultura microbiológica ou pela identificação do agente por citologia (LIMA et al., 1977). Nesses casos, a suspeita e o diagnóstico definitivo ocorrem no exame pós-mortal, através da necropsia e da análise histopatológica dos tecidos afetados (GALIZA et al., 2014; GEORGI et al., 2009; MALIK et al., 1999; O'BRIEN et al., 2006). A ausência de lesões macroscópicas ou sinais clínicos, pode fazer com que o diagnóstico seja somente estabelecido no *post mortem*, através da histopatologia, não ocorrendo a coleta de material para a cultura micológica, considerada a técnica padrão-ouro para o diagnóstico (GALIZA et al., 2014; LIMA et al., 1977).

## 2.4 NEUROCRIPTOCOCOSE

O transtorno neurológico, frequentemente observado em cães e gatos, pode se manifestar como uma meningoencefalomielite (WILKINSON, 1988). Um estudo que revisou 93 casos de criptococose (62 gatos e 31 cães), descreve sinais neurológicos em 40% dos gatos e 61% dos cães, sendo que maior número de gatos apresentou sinais respiratórios nasais e massas cutâneas, enquanto um maior número de cães apresentou sinais neurológicos e lesões oculares (TRIVEDI et al., 2011). Quanto à duração dos sinais neurológicos, em gatos pode variar entre 1 e 270 dias, com uma mediana de 8,5 dias. Já em cães, esses sinais perduram de 1 a 365 dias, tendo uma mediana de 8 dias (SYKES et al., 2010).

De acordo com a literatura, os sinais neurológicos na neurocriptococose em animais geralmente incluem depressão, movimentos circulares, pressionar a cabeça contra objetos, paresia, letargia, alterações comportamentais, anomalias da marcha, sinais vestibulares (incluindo inclinação da cabeça) (CASWELL; WILLIAMS, 2016). Outros autores descrevem, também em animais, confusão, vocalização, consciência reduzida, ataxia, rigidez muscular, andar em círculos, fraqueza, paralisia dos membros pélvicos, convulsões, agressão, surdez, perda de sentido do olfato e dor no pescoço como sinais distintos do transtorno neurológico (HONSHO et al., 2003). Sinais como confusão, pressionar a cabeça em objetos, vocalização, consciência reduzida e convulsões, estariam mais associados a lesões em regiões corticais do encéfalo (McGRATH, 1960). Enquanto sinais vestibulares como ataxia, inclinação da cabeça e andar em círculos sugerem possíveis disfunções cerebelares, afetando a coordenação motora (DEWEY, 2006).

Muitos animais, particularmente cães, na região cervical, e gatos, na coluna toracolombar ou lombossacral, costumam mostrar evidente desconforto espinhal (SYKES et al., 2010), estes sinais, bem como fraqueza e paralisia dos membros posteriores, indicam lesões na medula espinhal (McGRATH, 1960). Outros sinais comumente relatados são manifestações oculares, como nistagmo, midríase e cegueira (CASWELL; WILLIAMS 2016), estes sinais são mais comuns em cães, onde a doença afeta principalmente os olhos e os nervos ópticos, além do SNC (LARSSON et al., 2003).

A variação nos sinais clínicos neurológicos pode ser atribuída à diversidade de locais neuroanatômicos onde as lesões ocorrem, como descrito na literatura (McGILL et al., 2009). No SNC, as localizações mais comuns das lesões são a região cerebrotalâmica e a região cerebelar, seguidos pela ponte, medula espinhal e o mesencéfalo (SYKES et al., 2010). Desta forma, um paciente com lesões na região cerebrotalâmica pode apresentar alterações no estado mental, como sonolência, estupor e coma. Além de comportamentos compulsivos, incluindo andar em círculos, convulsões, alterações comportamentais (como agressividade, distração, vocalização e apatia), e a tendência de pressionar a cabeça contra objetos fixos persistentemente (CHRISMAN, 1985; DEWEY, 2006; McGRATH, 1960).

Lesões na região cerebelar, resultariam em movimentos exagerados (hipermetria), ataxia (do tronco e da cabeça) sem paresia, tremor intencional, rigidez por descerebelação e déficits vestibulares, que incluem inclinação da cabeça, nistagmo, comportamento circular e estrabismo vestibular (DEWEY, 2006; McGRATH, 1960).

Outras regiões mais afetadas, como ponte e medula espinhal, estão relacionadas a distúrbios graves de consciência, como estupor e coma. Além de alterações de marcha, ataxia e paresia ou paraplegia do neurônio motor superior (DEWEY, 2006; VANDEVELDE et al., 2012). Enquanto lesões no mesencéfalo estão associadas a distúrbios graves de consciência, alterações de marcha, ataxia cerebral, anisocoria e estrabismo (associados a danos nos núcleos dos nervos trocleares ou oculomotor) e atrofia dos músculos da cabeça, relacionada também a lesões no nervo trigêmeo (DEWEY, 2006; McGRATH, 1960; VANDEVELDE et al., 2012).

As principais condições para considerar como diagnósticos diferenciais da neurocriptococose em cães são doenças que apresentam um quadro clínico semelhante, tais como cinomose, encefalite bacteriana, meningoencefalite protozoária (toxoplasmose, neosporose) e tumores (MARCASSO et al., 2005; VANDEVELDE et al., 2012). Enquanto em gatos, os principais diagnósticos diferenciais seriam peritonite infecciosa felina e a toxoplasmose. Vale ressaltar que os sinais clínicos da criptococose podem imitar outras doenças (CORRÊA, 1994), se passando até mesmo por raiva, como foi descrito em um caso de meningite criptocócica fatal em um gato (PAL, 1991).

## 2.5 HISTOPATOLOGIA E HISTOQUÍMICA

Histologicamente, as lesões em múltiplos órgãos, incluindo o SNC, se caracterizam como massas, contendo leveduras circulares, as quais são constituídas por uma célula central circundada por uma cápsula espessa (polissacarídica) que normalmente não cora com a técnica de HE, formando um halo claro (não corado), dando a aparência vacuolizada característica, frequentemente descrita como uma lesão em "bolhas de sabão" no tecido (MALIK et al., 2006, FARIA; XAVIER, 2009, KRONSTAD et al., 2011, SANTOS; ALESSI, 2016). Por vezes, no interior de algumas células, é possível observar um material granular, arredondado, levemente eosinofílico, que corresponde ao núcleo da célula da levedura (GALIZA et al., 2014).

No SNC, a literatura descreve três padrões histopatológicos para criptococose neurológica em cães e gatos, não correlacionados com espécies infectantes: formação de pseudocistos, caracterizada pela expansão de organismos criptocócicos ao longo dos espaços ventriculares e subaracnoídeos, levando a pseudocistos intraparenquimatosos aleatórios, multifocais e de tamanho variável; meningite

difusa isolada, sem presença de pseudocistos ou envolvimento do parênquima cerebral; e meningoencefalite sem formação evidente de pseudocistos (SYKES et al. 2010).

No caso da criptococose, a reação granulomatosa é frequentemente mínima, se diferenciando de outras infecções micóticas, que possuem resposta granulomatosa acentuada. Possivelmente, por causa da cápsula ter o efeito de “mascarar” a levedura da resposta histiocítica, através da inibição da apresentação antigênica (CASWELL; WILLIAMS, 2016). No entanto, autores descrevem que as leveduras de *Cryptococcus* spp. podem estar associadas a um infiltrado inflamatório constituído predominantemente por macrófagos, e em menor quantidade, por linfócitos e plasmócitos, variando conforme o tecido analisado (RODRIGUES et al. 1999. PAPPALARDO; MELHEM, 2003; GALIZA et al., 2014b).

Em um trabalho realizado em Santa Maria - RS, o qual catalogou 230 casos de micoses e oomicoses, 11 foram diagnosticadas como criptococose, sendo sete deles em felinos, três em caninos e um em equino (GALIZA et al., 2014a). Em outro retrospectivo, Galiza et al. (2014b) testaram diferentes técnicas histoquímicas para o diagnóstico de criptococose. Foi relatado que a cápsula do agente pode ser fracamente visualizada pela coloração com Ácido Periódico de Schiff (PAS), sendo Azul Alciano (AA) e Mucicarmina de Mayer (MM) as melhores técnicas para essa finalidade. Enquanto a parede do agente pode ser evidenciada através da coloração de Fontana-Masson (FM), devido à presença de melanina. Com as colorações de PAS e impregnação pela prata (Grocott) foi possível observar a parede das células das leveduras fortemente evidenciada.

Não é possível definir qual *Cryptococcus* específico está envolvido em cada caso apenas através da observação morfológica do agente na histologia. A literatura descreve que, apesar de suas semelhanças na morfologia das células da levedura, as cepas de *C. gattii* podem exibir uma maior prevalência de células ovoides a piriformes em comparação com as células globosas de *C. neoformans*, que raramente exibem características piriformes (KWON-CHUNG et al., 1982). No entanto, durante a disseminação de *Cryptococcus* spp. podem ocorrer alterações na morfologia da levedura, que varia dependendo do tecido. A estrutura da cápsula não é influenciada pela carga fúngica local, mas sim pela estrutura do leito vascular que envolve os capilares (CHARLIER et al., 2005).

## 2.6 TRATAMENTO

O tratamento de um animal com distúrbios neurológicos apresenta um grande risco de deixar sequelas, portanto, a abordagem terapêutica tende a ser paliativa (PEREIRA; COUTINHO, 2003). O tratamento recomendado é feito com o uso de antifúngicos sistêmicos, tais como anfotericina B, fluocitosina, cetoconazol, itraconazol e fluconazol, usados isoladamente ou em combinações (LARSSON et al., 2003). É descrito que, embora o tratamento individual com Anfotericina B ou Terbinafina não

resulte em uma redução no tamanho da cápsula, a combinação desses dois medicamentos causa uma diminuição significativa do tamanho da cápsula em comparação com as células controle, facilitando assim a fagocitose do antígeno (GUERRA et al., 2012).

No entanto, a utilização da anfotericina B, cetoconazol e flucitosina no tratamento da criptococose para a síndrome neurológica em cães não produziu resultados satisfatórios, pois não alcançaram concentrações adequadas sem a ocorrência de efeitos colaterais (PEREIRA; COUTINHO, 2003). O itraconazol e fluconazol são amplamente disponíveis e têm boa penetração no sistema nervoso central, sendo drogas recomendadas especialmente em casos com comprometimento do sistema nervoso central (NOBRE et al., 2002; PEREIRA; COUTINHO, 2003).

**3 MANUSCRITO – Neurocryptococcosis in Dogs and Cats: Anatomopathological and Fungal Morphological Aspects in a case series**

Artigo a ser submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira

## Neurocryptococcosis in dogs and cats: anatomopathological and fungal morphological aspects in a case series<sup>1</sup>

Miguel D. Oliveira<sup>2</sup>, Mariana M. Flores<sup>3</sup>, Alexandre Mazzanti<sup>4</sup>, Rafael A. Figuera<sup>3</sup>, Glauca D. Kommers<sup>3</sup>

ORCID: 0000-0002-2351-697X; 0000-0002-2754-6885; 0000-0002-1330-2142; 0000-0003-3391-5955; 0000-0002-2255-3015

**ABSTRACT.** Oliveira, M.D., Flores M.M., Mazzanti A., Figuera R.A., Kommers G.D., **Neurocryptococcosis in Dogs and Cats: Anatomopathological and Fungal Morphological Aspects in a case series.** *Pesquisa Veterinária Brasileira, 2023.* Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima nº1000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: [glaukommers@yahoo.com](mailto:glaukommers@yahoo.com)

Cryptococcosis is a fungal infection that commonly affects dogs and cats, often manifesting with neurological involvement. In this study, it was investigated the neuropathological characteristics of cryptococcosis in nine cats and two dogs submitted to necropsy, through gross pathology and histopathological analysis. Clinical history, lesion location, fungal burden, type and intensity of inflammatory infiltrate, lesions in nervous parenchyma, and morphological characteristics of yeast cells were evaluated. Additionally, fungal morphological criteria, such as, capsule and yeast wall thickness and budding frequency were analyzed in each neurolocation. To enhance the visualization of yeasts, Alcian Blue stain method was utilized. Only six cases (54%) had neurological signs. Debilitating and immuno-suppressive conditions were detected in five cases. Gross lesions in the central nervous system (CNS) were found in five cases, and appeared as irregular, friable, soft, gelatinous, and grayish masses, with distinct borders. The telencephalic cortex and the cerebellum were the most frequently affected CNS locations, observed in all cases. The first, exhibited a higher fungal burden and a milder inflammatory response, compared to other neurolocations. Cerebellum was also affected in all cases but showed a slightly higher inflammatory response and a lower fungal burden, compared to the telencephalic cortices. Additionally, lung involvement was observed in all cases as well. The inflammatory intensity associated to the yeasts in the CNS was predominantly mild to moderate, being severe only in two cases, and the fungal burden was more often moderate or severe, being mild in only two cases. The observed heterogeneity in the inflammatory response and fungal burden reveals the complex nature of this infection. Other affected nervous tissues were the optic nerve and the spinal cord nerve roots and ganglia, mostly in cats. In conclusion, our study shows the neuropathological features of cryptococcosis in a case series in cats and dogs, emphasizing the importance of considering specific neurolocations for diagnosis of this fungal infection. As well contributing for a better understanding of the simultaneous involvement of the respiratory and nervous systems.

INDEX TERMS: cryptococcosis, histopathology, neurolocalization, nervous system.

**RESUMO. [Neurocriptococose em cães e gatos: aspectos anatomopatológicos e morfológicos fúngicos em uma série de casos.]** A criptococose é uma infecção fúngica que comumente afeta cães e gatos, muitas vezes se manifestando com envolvimento neurológico. Neste estudo, foram investigadas as características neuropatológicas da criptococose em nove gatos e dois cães submetidos à necropsia, por meio da análise macroscópica e histopatológica. Foi avaliada a história clínica, localização das lesões, carga fúngica, tipo e intensidade do infiltrado inflamatório, lesões no parênquima nervoso e características morfológicas das células de levedura. Além disso, critérios morfológicos fúngicos, como espessura da cápsula e parede da levedura e frequência de brotamento, foram analisados em cada neurolocalização. Para aprimorar a visualização das leveduras, foi utilizada a técnica de

<sup>1</sup> Received on ...

Accepted for publication on ...

<sup>2</sup> Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em patologia e patologia clínica veterinária, Centro de Ciência Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Camobi, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

<sup>3</sup> Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. \*Corresponding author: [glaukommers@yahoo.com](mailto:glaukommers@yahoo.com)

<sup>4</sup> Departamento de Clínica de Pequenos Animais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

coloração de Azul Alciano. Apenas seis casos (54%) apresentaram sinais neurológicos. Condições debilitantes e imunossupressoras foram detectadas em cinco casos. Lesões macroscópicas no sistema nervoso central (SNC) foram encontradas em cinco casos, aparecendo como massas irregulares, friáveis, moles, gelatinosas e acinzentadas, com bordas distintas. O córtex telencefálico e o cerebelo foram as localizações do SNC mais frequentemente afetadas, observadas em todos os casos. O córtex apresentou uma carga fúngica mais elevada e uma resposta inflamatória mais branda em comparação com outras neurolocalizações. O cerebelo também foi afetado em todos os casos, apresentando uma resposta inflamatória um pouco mais elevada e carga fúngica mais baixa do que o córtex telencefálico. Além disso, o envolvimento pulmonar também foi observado em todos os casos. A intensidade inflamatória associada às leveduras no SNC, foi predominantemente leve a moderada, sendo grave apenas em dois casos, e a carga fúngica foi mais frequentemente moderada ou grave, sendo leve em apenas dois casos. A heterogeneidade observada na resposta inflamatória e carga fúngica revela a natureza complexa dessa infecção. Outros tecidos nervosos afetados foram o nervo óptico e as raízes e gânglios nervosos da medula espinhal, principalmente em gatos. Em conclusão, nosso estudo mostra as características neuropatológicas da criptococose em uma série de casos em gatos e cães, enfatizando a importância de considerar neurolocalizações específicas para o diagnóstico dessa infecção fúngica. Além disso, contribui para uma melhor compreensão do envolvimento simultâneo dos sistemas respiratório e nervoso.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: criptococose, histopatologia, neurolocalização, sistema nervoso.

## INTRODUCTION

The prevalence of fungal diseases in both humans and domestic animals has been commonly reported, possibly due to the rise in immune-suppressive therapies and climate change (Guarner & Brandt 2011, Seyedmousavi 2018). Among the most significant systemic mycoses, cryptococcosis has emerged as a fungal infection with significant lethality and morbidity. Typically presenting as meningoencephalitis, it is often secondary to cutaneous or pulmonary processes, and can occur in both immunocompetent and immunocompromised individuals (Lacaz et al. 2002, Eghwrudjakpor & Allison 2009).

*Cryptococcus* spp. are encapsulated dimorphic yeasts, responsible for causing infections worldwide in various species, including humans, domestic, wild, and laboratory animals. In cats, it is the most common systemic mycotic disease. The pathogenic species of *Cryptococcus* most often reported are *C. neoformans* and *C. gattii* (Caswell & Williams 2007). This fungus is distinctive among all pathogenic fungi in domestic species, because it has a mucopolysaccharide capsule that acts as a virulence factor, impairing phagocytosis and the migration of leukocytes. It also inhibits the synthesis of pro-inflammatory cytokines, inactivates the complement system, and can suppress T-cell responses (Buchanan & Murphy 1998, Bovers 2008, Sykes & Malik 2015). The host's inflammatory response is variable and usually minimal, consisting of macrophages, lymphocytes, and plasma cells (Summers 1995, Steenbergen & Casadeval 2003).

Cryptococcosis can either be localized or spread throughout the body. There is tropism for the respiratory system, particularly the nasal cavity and for the central nervous system (CNS) (Sykes & Malik 2015). The neurotropism is explained by the yeast's production of an enzyme called phenoloxidase, which allows them to synthesize melanin from diphenolic compounds, such as catecholamines (Williamson et al. 1998; Baker et al. 2022). The transmission of cryptococcal infections probably occurs through inhalation of dust contaminated by viable yeasts, leading to infection of the upper respiratory tract and lungs, followed by secondary hematogenous spread to the CNS, eyes, skin, and other organs (Faria & Xavier 2009). Yeasts may also reach the encephalon by extension, from a nasal lesion, either through the cribriform plate or the optic nerves (Lester et al. 2004, Malik et al. 2006). It is described that cryptococcal organisms were consistently identified in the cerebrospinal fluid analysis, in samples collected from cisternal and lumbar regions, of animals exhibiting signs of diffuse CNS disease, indicating the potential dissemination of yeasts through the cerebrospinal fluid. The presence of yeasts inside the central canal of the spinal cord, described by these authors, in histopathological examination, also corroborates with this theory (Sykes et al. 2010).

Important aspects of the cryptococcosis in the nervous system (neurocryptococcosis) are well described in humans, including the most affected neurolocations, type and intensity of inflammation, how yeasts enter the CNS, and the morphological features that are considered virulence factors (Chang et al. 2004, Charlier et al. 2005, Guevara-Campos et al. 2009, Pinto 2010). However, this data is still scarce in animals, with a few studies detailing the involvement of the nervous system (Sykes et al. 2010; Trivedi et al. 2011). The present retrospective study aimed to provide a detailed description of the infection by *Cryptococcus* spp., in 11 cases (nine cats and two dogs), by characterizing the neurolocation of the lesions, the inflammatory response and intensity, and the variations in yeast's morphology.

## MATERIALS AND METHODS

A total of 11 animals, retrospectively studied, were included in the case series. Consisting of nine cats



(cases 1 to 9) and two dogs (cases 10 and 11), all submitted to necropsy and diagnosed with cryptococcosis affecting the nervous system (NS). Necropsy reports were selected and reviewed.

Information regarding the animal profile, such as species, breed, sex, and age was collected from pathology reports. The clinical history of each animal was also reviewed, from which data regarding clinical signs, potential predisposing factors, concomitant diseases, treatment, and clinical progression were extracted. Gross lesion descriptions from the reports were also reviewed and, when available, archived photographs were reassessed.

Paraffin blocks were collected from the laboratory archive and sectioned for histology by routine methods. Two slides were prepared from each block, one stained by hematoxylin-eosin (HE), one stained by Alcian Blue pH 2,5 (and counter-stained by HE). The slides were then analyzed under light microscopy. This histomorphological study focused on the NS. Additionally, lung and eye lesions (focusing the optic nerve) were also reevaluated. Involvement of other organs/tissues was only noted.

On histopathological reevaluation of the NS lesions, the following criteria were observed: a) locations of the lesions in the CNS anatomical regions (encephalon [frontal, parietal, and occipital cortex, basal ganglia, thalamus, hippocampus, mesencephalon, cerebellum, and pons] and spinal cord [cervical, thoracic, and lumbar segments]), considering the availability and identification of the paraffin blocks of each case; b) location of the lesions in the CNS histological regions (meninges, neuropile, perivascular spaces, choroid plexus and vascular wall; c) lesions in peripheral nervous system (when tissues were available, including optic nerve, spinal nerve roots and ganglia); d) type and intensity of inflammatory infiltrate; e) fungal burden and vascular embolism; and f) morphological characteristics of the yeasts (cell shape, cell wall thickness, and capsule thickness).

Inflammatory response, as well as the fungal burden, were subjectively categorized as severe = 3, moderate = 2, mild = 1, or absent = 0. The number of cases affected for each specific neurolocation was considered, and the score of each case for inflammatory response and fungal burden was added and divided by the number of individuals with involvement of each neurolocation, resulting in an average value of each coefficient for a better comparison between neurolocations. Morphological criteria, such as capsule and yeast wall thickness, were also analyzed and classified as decreased, regular, or increased (subjectively compared to parameters of Galiza et al. 2014). The frequency of budding was also taken into consideration and subjectively classified as high, regular, or low.

## RESULTS

### Animals and clinical aspects

Eight animals were mixed-breed and three were pure breed (one dog [Labrador Retriever] and two cats [Siamese and Persian]). Among dogs, there was one male and one female; aged one year- and 10 months-old, respectively. Among cats, there were five males and four females; age ranged from one to 10 years-old and the average age was four years and two months.

Only three cases (27%) were diagnosed with cryptococcosis clinically. Complete neurological examination was performed on 27% of the animals (2 cats and 1 dog). Six animals (54%) were reported to have neurological signs (four cats and two dogs), among which blindness (cases 10 and 11) and head tilt (cases 6 and 8) were the most common signs. Other described signs were: syncope (case 5), somnolence, diminished postural reactions, cerebellar and vestibular ataxia, negative patellar reflex (case 7), paraplegia (case 8), incoordination (case 10), and pain upon epaxial palpation throughout the vertebral column (case 11). The duration of neurological signs ranged from seven to ten days. Nonspecific signs, such as anorexia (cases 6 and 4), apathy, and weakness were also common findings (cases 4, 11 and 9). Respiratory signs were reported in four cases (cases 1, 6, 7 and 9). One case (case 1) showed a diffuse interstitial pattern on the thoracic X-ray (which was reported as compatible with viral pneumonia or neoplasm). Cutaneous lesions were present in three cases (27%), seen only in cats (cases 2, 3 and 9) and described as multiple, raised, gelatinous and occasionally ulcerated nodules; they were white and amorphous on cut surface, draining content resembling pus. Predominantly, these lesions were found on the head, thoracic and abdominal regions, and limbs.

Debilitating and/or immuno-suppressive conditions were described in five cases: two cats with history of being recently adopted from the streets (cases 2 and 9); a cat that had previous treatment with corticosteroids (case 6); one dog that presented severe cachexia and generalized weakness (case 11), and a dog with clinical history of leukopenia with left shift (case 10). Cryptococcosis treatment (specific drug not informed) was reported only in one cat (case 3).

### Gross pathology

Gross lesions in the CNS were documented in five cases (cases 6, 7, 8, 9 and 11), observed most frequently in the piriform lobe (Fig. 1; cases 7, 8 and 9) and on frontal lobe, parietal lobe, occipital lobe, brainstem, hippocampus, cerebellum (Fig. 2), and spinal cord (one case each). One dog (case 11) had lesions in the spinal cord, located in the cervical and lumbosacral regions (Fig. 3). In two cases with ocular involvement (cat 8 and dog 11), there was swelling of the extracranial portion of the optic nerve (Fig. 4).

Cryptococcal lesions appeared as irregular, friable, soft, gelatinous, and grayish masses, with distinct borders, ranging in size from 0.1 to 2 cm, seen either as exophytic nodules on the surface of the brain or as nodules

expanding the neuroparenchyma, seen on the cut surface (Fig.1). They occasionally caused asymmetry of the piriform lobes, with enlargement of the right side (cases 8 and 9). Congestion or opacity of the leptomeninges (Fig. 2) and focal hemorrhage in the frontal and parietal lobes were also described (one case each). In the spinal cord, exophytic nodules in the subdural space, as well as thickening of the nerve roots (Fig. 3) were also observed.

### **Histopathology**

Among the available histological sections, the telencephalic cortex was one of the most affected CNS locations, seen in all cases, with lesser inflammatory response and higher fungal burden (in average). The exact distribution of the lesions among the cortical sections was identified in nine cases. The frontal cortex was involved in four cases, the parietal cortex in six, and the occipital cortex in five. In two cases, the specific location among the telencephalic cortices was not informed. Cerebellum involvement was also seen in all cases, however, compared to the telencephalic cortex, it exhibited a slightly milder inflammatory response and a significantly lower fungal burden. The distribution of the lesions, the inflammatory response, and the fungal burden on the nervous system are summarized in Table 1.

Yeasts were observed infiltrating the neuropil in eight cases (all except cases 5, 9 and 10), in the following locations: telencephalic cortex in seven cases (77.7%), cerebellum in eight cases (88.8%), thalamus, hippocampus, pons and mesencephalon in one case each (11.1%). A predilection for either white or gray matter was not identified. In the cerebellum, two cases had yeasts infiltrating all layers (molecular and granular layers and white matter), and on three cases they were present only within the molecular and granular layers. On encephalon sections, lesions in the neuropil were rarely observed, seen as a slight vacuolization of the parenchyma (case 2 and 6), usually within areas of the interface between gray and white matter. In some areas, usually on the telencephalic cortex and sometimes on the cerebellum, the yeast clusters distended the sub-arachnoid space, causing compression of the subjacent parenchyma (case 6).

Overall, there was a predominance of histiocytic inflammation. The intensity of the inflammatory response and fungal burden are shown in Table 2 and in Figure 5-8. Cases were classified according to the predominant pattern observed; however, there was marked variation in both fungal burden and the type and intensity of inflammation within the same cases and often times, within the same histological section.

In fields with higher fungal burden, wherein yeasts often formed aggregates with predominance of foamy macrophages admixed with few neutrophils, the inflammatory response was usually mild to absent (Fig. 5 and 8). Yeasts were predominantly seen around blood vessels, expanding the Virchow-Robin spaces (Fig. 9). Sometimes yeast's clusters formed macroscopically visible nodules (cases 2, 4, 6, 7 and 11), in the meninges and neuropil (Fig. 10-11). These lesions were associated to thick and broad capsuled yeasts, and were most common in cats. Narrow-based budding was most frequently observed within these areas, and sometimes around the choroid plexus (Fig. 12). By comparing the histopathological findings to the gross lesions, measuring the extent of space occupied by the yeast's aggregates in the subarachnoid space and within the neuropil, by high-power field counting (400x), it was observed that for a lesion to be noticeable on gross examination, it was necessary to have a minimum extension of 1 mm.

Areas with lower fungal burden had predominance of granulomatous inflammation with a variable amount of multinucleated giant cells (Fig. 6); and sometimes, in these areas, there was a lymphoplasmacytic inflammation with scarce neutrophils. These lesions were frequent in cases 10 and 11 (both dogs). Two cases (case 5 and 6) were distinctive for a severe perivascular lymphoplasmacytic inflammation expanding the Virchow-Robin spaces forming up to 18 layers of inflammatory cells (Fig. 13), rare yeasts were seen within these areas. In case 6, there was also lymphoplasmacytic choroid plexistis and meningitis with rare yeasts associated to these lesions.

Spinal cord involvement was observed in one dog (case 11) and three cats (cases 7, 8 and 9). Inflammatory infiltrate mainly consisted of lymphocytes and plasma cells, with foamy macrophages in less amounts and rare neutrophils, in this organ. In all cases with spinal cord involvement, yeasts were on the subdural space, sometimes infiltrating the leptomeninges, in all regions (cervical, thoracic and lumbosacral), sometimes forming macroscopically visible nodules (case 11).

Yeasts were not seen infiltrating the neuropil on the spinal cord, but sometimes, there was compression of the underlying parenchyma where yeasts aggregates were observed, wherein a slight presence of multifocal axonal degeneration was seen, characterized by swollen axons (spheroids), digestion chambers and fragmented myelin sheaths in the white matter. Nerve root invasion was seen in cases 7 and 11 (Fig. 14), sometimes in the epidural space around them, causing the enlargement of nerve roots described. The paravertebral ganglia, were affected in case 7, with yeasts invading and partially replacing the nervous tissue. Two cases (cases 7 and 11) had ocular involvement, with partial to total replacement of the optic nerve by yeasts (Fig. 15).

### **Yeast's morphology**

The yeast cell and capsule thickness and budding frequency are summarized in Table 3. Yeast cells ranged from round to oval and occasionally "sickle" shaped, with a mildly basophilic cytoplasm. They were surrounded by a mildly basophilic (and sometimes bi-refringent) cell wall, which was typically thin, and capped by a large, clear capsule that formed a distinct unstained halo in HE staining. The use of Alcian Blue staining technique provided a more effective visualization of the capsules, highlighting their presence. Narrow-based buddings were occasional,

observed in all cases (Fig. 13). Chain budding was rare, seen in cases 6 and 9.

Increased cell wall thickness was observed in cases 4, 7 and 8, wherein the wall was mildly eosinophilic and occasionally duplicated. Case 3 had predominance of yeasts with absent to minimal capsule formation and decreased wall thickness; in all cases, yeasts with small capsules were usually seen inside the cytoplasm of macrophages, often in multinucleated giant cells, or inside blood vessels (Fig. 16). In areas with severe inflammatory infiltrate, there was frequent loss of the capsular architecture.

Yeasts in the lumen of blood vessels (vascular embolism) were occasionally observed in all cases, mostly within the meningeal vessels (Fig. 16), and rarely in the neuropil vessels. Larger yeasts, with thicker capsules, were mainly visualized in the meninges (and lungs), or in large aggregates within the neuropil, usually associated to mild or absent inflammation.

### **Other affected organs**

Lesions in the upper respiratory tract were observed in two cats (cases 6 and 9), described as well-defined, round shape with a grayish to whitish color, soft and gelatinous nodules; microscopically, they were composed by yeast's aggregates with a high fungal load infiltrated by mild inflammation of macrophages and lymphocytes. One cat (case 9) had a nodule on the lateral region of the right nostril (measuring 2.0 x 1.5 x 1.0 cm). The other cat (case 6) had a nodule in the larynx (measuring 1.0 x 0.6 x 1.0 cm); this animal also had a substantial amount of amorphous, soft, whitish material, occupying a significant portion of both frontal sinuses. Histopathology revealed a widespread presence of yeasts with mild to absent inflammatory infiltrate.

Histopathological examination of the lungs revealed presence of yeasts in all cases, most had a low fungal burden (seven cases); however, in cases 3 and 9 it was moderate and in cases 1 and 2 it was high. On gross examination, 9 cases had lesions (all except cases 3 and 4); the lungs appeared slightly firm, heavy, and shiny, occasionally with punctate areas of hemorrhage. Moderate to severe edema and congestion were frequently seen on histopathological examination, yeasts were seen as individual or small groupings, surrounded by a mild inflammatory infiltrate, predominantly composed of foamy macrophages. Yeast's cell enlargement was frequent in this organ, as well as a marked variation in size, from very small cells with minimal capsule to large cells surrounded by wider capsules.

Other organs where yeasts were detected included: the lymph nodes (eight cases), spleen (four cases), skin (three cases), kidneys (three cases), liver, and heart (one case).

## **DISCUSSION**

This case series comprises 11 small animals (nine cats and two dogs) with cryptococcosis, affecting in some degree the central and/or the peripheral nervous system. Neurological signs were observed in 54% of our cases (four cats and two dogs). Comparing these results to another study (Sykes et al. 2010), neurological signs were present in 95% of their animals; however, their cases were selected based on magnetic resonance imaging (MRI) findings. This difference can also be explained by the fact that not all animals in our study were neurological cases, many had only cutaneous or respiratory signs, but during the histopathological evaluation they had lesions and yeasts in the nervous system.

The most common signs observed were blindness and head tilt. According to the literature, neurological signs usually include depression, circling, head pressing, paresis, lethargy, behavioral changes, gait abnormalities, vestibular signs (including head tilt), ocular signs consistent with nystagmus, and tight circling, seizures, mydriasis, and blindness (Caswell & Williams 2016). Apparent pain is more commonly reported in dogs (33%), than in cats (8%), in the cervical region and head (Sykes et al. 2010). In the present study, one dog (case 11) had clinical history of pain upon epaxial palpation throughout the vertebral column; the lesions observed on the nerve roots of the spinal cord in this case could provide an explanation for this pain.

Only three cases (cats; 27%) were diagnosed with cryptococcosis before necropsy and all of these ones had cutaneous manifestations in this study. Cutaneous disease was seen in animals with neurocryptococcosis, being more common in cats (15%) than in dogs (4,7%) (Sykes et al. 2010). Small cutaneous or subcutaneous masses can aid in the clinical diagnosis, particularly in felines, where fungal rhinitis in the rostral nasal cavity is the most common presentation (Caswell & Williams 2016). The remaining eight cases (73%) had their definitive diagnosis after necropsy, during histopathological examination in our study. A similar situation has been described by other authors in fungal infections, which describe a frequent lack of characteristic clinical alterations for a presumptive diagnosis (Kaufman 1992, Jensen et al. 1996, Sykes et al. 2010).

In this study, it was tried to assess whether there was pulmonary infection in all cases with neurocryptococcosis, considering that the agent lodges in the upper respiratory tract, and then descends to the lungs, followed by secondary hematogenous spread to the CNS, eyes, skin, and other organs (Faria & Xavier 2009). In the routine of necropsies, the evaluation of the nasal cavity is not frequent, unless there is an indication (such as skin lesions in the nasal area) for this evaluation. For this reason, in this study, pulmonary involvement was analyzed, as this organ is routinely examined, even in the absence of gross lesions or respiratory clinical signs. Only two cases had nasal lesions; however, all the examined cases had pulmonary infection in some degree in this study.

Gross lesions found in the CNS were multiple small "cysts", referred in the literature as "cryptococcomas", with a viscous, gelatinous appearance, being the faint gray appearance attributed to the presence of the mucinous capsule (Miller & Zachary 2016). Large gelatinous lesions, also referred to as "torulomas", indicating unrestricted growth of the cryptococcal organisms (Ristow & Davis 2021), could provide an explanation for case 11 (dog) with a focally extensive enlarged area (measuring 11 cm) in the lumbosacral region of the spinal cord, leading to the development of a significant lesion in that specific area. However, the reason for the involvement of that area was not determined in this case. Enlargement and softening of the olfactory bulbs, and cerebellar herniation through the foramen magnum (11.5% each), as described in another study (Sykes et al. 2010), was not found in this case series. However, gray gelatinous masses (36%), opacity and congestion of the meninges, and foci of hemorrhage (9% each) were frequently observed in the CNS of our cases.

Despite the most common route the agent reaches the brain is through pulmonary infection, where the yeast spread through bloodstream through leukocytic trafficking (Caswell & Williams 2007), yeasts may also reach the brain through a different pathway, an infection (usually subclinical) of the nasal cavity, where the microorganism can quickly penetrate the nasal and frontal bones, reaching the brain by extension, either through the cribriform plate or optic nerves (Lester et al. 2004, Malik et al. 2006). In this study, lesions on the nasal cavity were detected in two cats; in one of them (case 6), occupying a significant portion of both frontal sinuses; however, retrospectively, it was not possible to determine if the yeasts entered the CNS through the bloodstream or by extension, since pulmonary involvement was present in this case.

Literature describes three histopathological patterns for neurological cryptococcosis in dogs and cats, which are not correlated with infecting species: a) pseudocyst formation, characterized by the expansion of cryptococcal organisms along ventricular and subarachnoid spaces, leading to random, multifocal, and variable-sized intraparenchymal pseudocysts; b) diffuse meningitis alone, without the presence of pseudocysts or involvement of the brain parenchyma; and c) meningoencephalitis without evident pseudocyst formation (Sykes et al. 2010). According to this classification, in our study, five cases (7, 11, 2, 4, 6) are compatible with the pseudocyst formation pattern (described in this case series as large aggregates of yeasts inside the neuropile), three cases (10, 5, 9) with the diffuse meningitis alone pattern, and three cases (1, 3, 8) with the meningoencephalitis pattern.

In one cat (case 5), no alterations were observed in the physical, hematological, and radiographic exams; however histopathological examination of this case revealed a severe perivascular lymphoplasmacytic inflammation observed expanding the Virchow-Robin spaces; yeasts were observed only in the meninges and the inflammatory infiltrate observed around them was distinctly different from the perivascular inflammatory infiltrate. A similar inflammatory infiltrate was seen causing a lymphoplasmacytic choroid plexitis and meningoencephalitis in a cat (case 6). This phenomenon could have been caused by the translocation of yeasts from the bloodstream to the brain, leading to severe damage to the micro-vascular structure. The presence of rare yeasts associated with the vascular cuff in one of the cases supports this possibility (Charlier et al. 2005). Another possibility is that this animal could have a non-diagnosed concomitant viral disease (Pedersen et al. 2009).

The most affected neurolocations in our study were the telencephalic cortex and cerebellum (100% each), followed by thalamus and hippocampus (72,7%), and pons (45,4%). Sykes et al. (2010) found similar CNS locations: cerebrotalamic (96%), cerebellum (88%), pons and medulla (72%), and midbrain (52%). In one cat the ependyma of the lateral ventricle showed infiltration by a mild number of yeasts and in a specific area the yeasts were seen causing ependymal disruption; and one case had the lateral ventricle markedly filled with yeasts. This finding may indicate the possibility of dissemination of the agent through the cerebrospinal fluid, Corroborating the findings reported by other authors. Choroid plexitis was seen in one dog and two cats. These lesions are more often described in dogs with neurocryptococcosis (Sykes et al. 2010). In a study in mice (Charlier et al. 2005), yeast cells were not detected in the choroid plexus, a structure that consistently exhibited normal morphology.

In four cases (36%) yeasts were observed in the spinal cord, mostly in the leptomeninges and in the subarachnoid and subdural spaces. Nerve root invasion was present in two cases (one dog and one cat). The paravertebral ganglia, however, were affected only in one cat; central canal or spinal cord parenchyma involvement was not observed. When comparing this to the literature, spinal cord involvement was observed in 18% of cats and 43% of dogs. Only one cat (9%) also had spinal nerve root involvement, and in 14% of the dogs, yeasts were seen in the central canal (Sykes, et al. 2010).

The predominant yeast morphological pattern observed in this study was a central fungal cell surrounded by a thick (polysaccharide) capsule that typically did not stain with HE technique, giving the characteristic vacuolated appearance, often described as a "soap bubble" lesion (Malik et al. 2006, Faria & Xavier 2009, Kronstad et al. 2011). The capsule of the agent was strongly stained by Alcian Blue. This staining proved to be an important tool in highlighting yeasts in tissues with very low fungal burden, as previously described (Galiza et al. 2014), particularly in the lungs, where the presence of yeasts was revealed in three cases (cats 1, 5, and dog 11) that were not previously detected by HE staining.

Only one cat (case 3) displayed an aberrant morphological feature, where multiple tissues showed a predominance of yeasts with absent to minimal capsule formation, having rare yeasts with regular capsule sizes. This particular case stood out as the sole patient in this study with a previous history of treatment (drug not informed) for cryptococcosis. This morphological change may have relation with the treatment, since studies demonstrate that although individual treatment with Amphotericin B or TRB Terbinafine does not lead to a reduction in capsule,

the combination of these two drugs significantly decreased capsule size compared to the control cells (Guerra et al. 2012).

In this case series, none of the cases had available information regarding the specific species of the agent. This does not prevent the study of tissue damage caused by infection with this fungus genus, as demonstrated in a similar study of neurocryptococcosis (Sykes et al. 2010) on 11 cats and 14 dogs submitted to necropsy, in which only one cat (infected with *C. gattii*) and six dogs (four infected with *C. neoformans* and two with *C. gattii*) had the infecting *Cryptococcus* species determined.

The observed heterogeneity in the inflammatory response and fungal burden reveals the complex nature of this infection. Authors describe that it can be related to the yeast's virulence factors and the host's immunological status (Buchanan & Murphy 1998, Steenbergen & Casadevall 2003, Caswell and Williams 2007). However, further investigations are still needed to elucidate the implications of this variability, as well as to explore it for disease progression and management strategies, contributing to a better understanding of the cryptococcosis pathogenesis.

### CONCLUSION

This study shows the neuropathological features of cryptococcosis in a series of cases in dogs and cats, emphasizing the importance of considering specific neurolocations for diagnosis of this fungal infection. The telencephalic cortex and the cerebellum were consistently involved in all cases, along with the lungs, despite not all cases presenting neurological and/or respiratory signs or gross lesions in these tissues. These findings highlight the significance of necropsy and histopathologic examination as valuable diagnostic tools for cryptococcosis.

**Acknowledgments.**- This research was financially supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil; M.D. Oliveira has a Master's scholarship from CAPES.

**Conflict of interest statement.**- The authors declare that there are no conflicts of interest.

### REFERENCES

- Baker, RP, Chrissian, C, Stark, RE, Casadevall, A. 2022. Cryptococcus neoformans melanization incorporates multiple catecholamines to produce polytypic melanin. Journal of Biological Chemistry, 298(1), 101519. <<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101519>>
- Bovers M, Hagen F, Boekhout T. 2008. Diversity of the Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii species complex. Revista Iberoamericana de Micología, 25(1):4-12. <[https://doi.org/10.1016/s1130-1406\(08\)70019-6](https://doi.org/10.1016/s1130-1406(08)70019-6)>
- Buchanan KL, Murphy JW. 1998. What makes Cryptococcus neoformans a pathogen?. Emerging Infectious Diseases, 4(1), 71-83. <<https://doi.org/10.3201/eid0401.980109>>
- Caswell LJ, Williams KJ. 2007. Infectious diseases of the respiratory system. In G. Maxie, K. Jubb, & N. Palmer (Eds.), Pathology of Domestic Animals, 5th ed., Vol. 2, p.579-650. ed: Elsevier, St. Louis: Saunders .
- Chang YC, Stins MF, McCaffery MJ, Miller GF, Pare DR, Dam T, Paul-Satyaseela M, Kim KS, Kwon-Chung KJ. 2004. Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. Infection and Immunity, 72(9):4985-4995. <<https://doi.org/10.1128/IAI.72.9.4985-4995.2004>>
- Charlier C, Chrétien F, Baudrimont M, et al. 2005. Capsule structure changes associated with Cryptococcus neoformans crossing of the blood-brain barrier. American Journal of Pathology, 166(2):421-432. <[https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62265-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62265-1)>
- Eghwurdjakpor, P. O., & Allison, A. B. (2009). Neurocryptococcosis in a 10-year-old immunocompetent girl. Acta neurochirurgica, 151(6), 711-712. <<https://doi.org/10.1007/s00701-009-0250-4>>
- Moretti, M. L., Resende, M. R., Lazéra, M. S., Colombo, A. L., Shikanai-Yasuda, M. A. Consenso em criptococose: 2008. 2008. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 41(5):524-544. <<https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000500022>>
- Feldmesser M, Kress Y, Casadevall A. 2001. Dynamic changes in the morphology of Cryptococcus neoformans during murine pulmonary infection. Microbiology, 147(8):2355-2365. <<https://doi.org/10.1099/00221287-147-8-2355>>
- Galiza GJN, Silva TM, Caprioli RA, et al. 2014. Características histomorfológicas e histoquímicas determinantes no

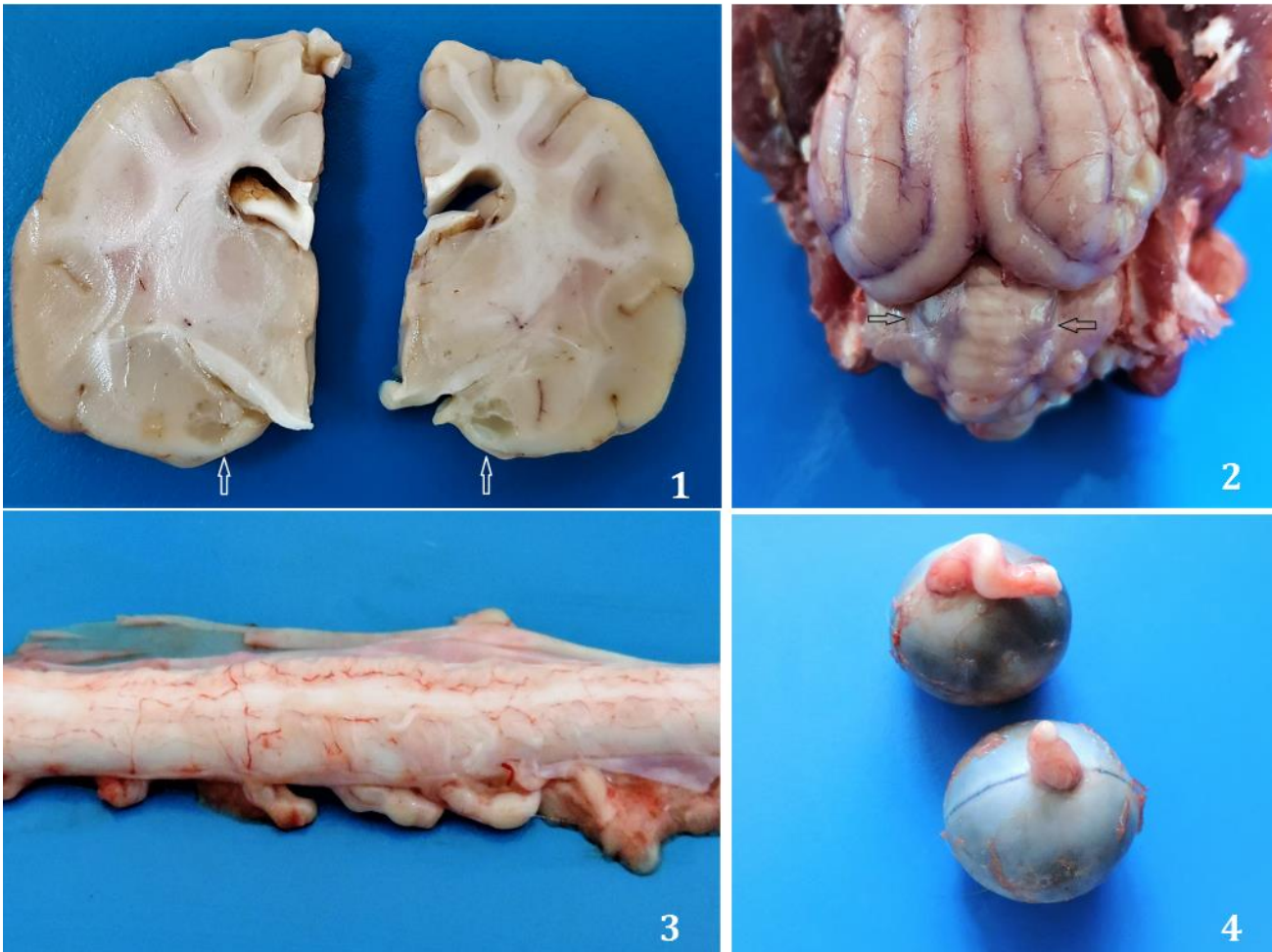
- diagnóstico da criptococose em animais de companhia. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 34(3):261–269. <<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000300011>>
- Guerra CR, Ishida K, Nucci M, Rozental S. 2012. Terbinafine inhibits *Cryptococcus neoformans* growth and modulates fungal morphology. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(5):582–590. <<https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000500003>>
- Guevara-Campos J, González-Guevara L, Urbáez-Cano J, Fermín S. 2009. Meningoencefalitis por *Cryptococcus neoformans* en escolares inmunocompetentes. *Investigación Clínica*, 50(2):231-239. Retrieved June 5, 2023, from <[http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0535-51332009000200010&lng=pt&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332009000200010&lng=pt&tlng=es)>
- Guarner J, Brandt ME. 2011. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(2):247-280. <<https://doi.org/10.1128/CMR.00053-10>> <PMid: 21482725>
- Kronstad JW, Attarian R, Cadieux B, Choi J, D'Souza CA, Griffiths EJ, Geddes JM, Hu G, Jung WH, Kretschmer M, Saikia S, Wang J. 2011. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nature Reviews Microbiology*, 9(3):193-203. <<https://doi.org/10.1038/nrmicro2522>> <PMid:21326274>
- Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Takahashi de Melo N. 2002. *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De São Paulo*, 44(5):297–298. <<https://doi.org/10.1590/S0036-46652002000500013>>
- Lester SJ, Kowalewich NJ, Bartlett KH, Krockenberger MB, Fairfax TM, Malik R. 2004. Clinicopathologic features of an unusual outbreak of cryptococcosis in dogs, cats, ferrets, and a bird: 38 cases January to July 2003. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 225(11):1716-1722. <<https://doi.org/10.2460/javma.2004.225.1716>>
- Love GL, Boyd GD, Greer DL. 1985. Large *Cryptococcus neoformans* isolated from brain abscess. *Journal of Clinical Microbiology*, 22(6), 1068-1070. <<https://doi.org/10.1128/jcm.22.6.1068-1070.1985>>
- Malik R, Krockenberger M, O'Brien CR, Martin P, Wigney D, et al. 2006. *Cryptococcus*. In C. E. Greene (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 3, 584-598. Elsevier, St. Louis: Saunders.
- Miller AD, Zachary JF. 2016. Nervous system. In J. F. Zachary (Ed.), *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, 6th Edition, p. 841-843. St. Louis, MO: Mosby, Inc.
- Okagaki LH, Strain AK, Nielsen JN, Charlier C, Baltés NJ, Chrétien F, Heitman J, Dromer F, Nielsen K. 2010. Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. *PLoS Pathogens*, 6(6):e1000953. <<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000953>> Erratum in: *PLoS Pathog.* 2010;6(6). <<https://doi.org/10.1371/annotation/1b59fd9e-9ac9-4ea8-a083-14c413c80b0>> <PMid:20585559>
- Pinto LIS. 2010. A criptococose meníngea em doentes com infecção HIV. *Revista Arquivos de Medicina, Faculdade de Medicina do Porto*.
- QUEIROZ, JPA F; SOUSA, FDN; LAGE, RA et al. 2008. Criptococose: uma revisão bibliográfica. *Acta Vet. Bras*, 2(2), 32-8. <<https://doi.org/10.21708/avb.2008.2.2.699>>
- Ristow LC, Davis JM. 2021. The granuloma in cryptococcal disease. *PLoS Pathog.* 17(3):e1009342. <<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009342>> <PMid:33735307>
- Steenbergen JN, Casadevall A. 2003. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes and infection*, 5(7):667-675. <<https://doi.org/10.1016/s1286-4579'03'00092-3>>
- Summers BA. 1995. Inflammatory diseases of the central nervous system. In J. F. Cummings & A. de Lahunta (Eds.), *Veterinary Neuropathology*, p. 151-155. St. Louis, MO: Mosby-Year Book, Inc.
- Sykes JE, Malik R. 2015. Cryptococcosis. *Infectious diseases of the dog and cat*, 621-634. In: In: Greene C.E. (Ed.), *Infectious*. 4th ed. Elsevier, St. Louis, Missouri.
- Sykes JE, Sturges BK, Cannon MS, Gericota B, Higgins RJ, Trivedi SR, Dickinson PJ, Vernau KM, Meyer W, Wisner ER. 2010. Clinical signs, imaging features, neuropathology, and outcome in cats and dogs with central nervous system cryptococcosis from California. *J Vet Intern Med.* 24(6):1427-38. <<https://doi.org/10.1111/j.1939->

1676.2010.0633.x> <PMid:21054543>

Williamson P R, Wakamatsu K, & Ito, S. 1998. Melanin biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Bacteriology*, 180(6), 1570-1572. <<https://doi.org/10.1128/JB.180.6.1570-1572.1998>>

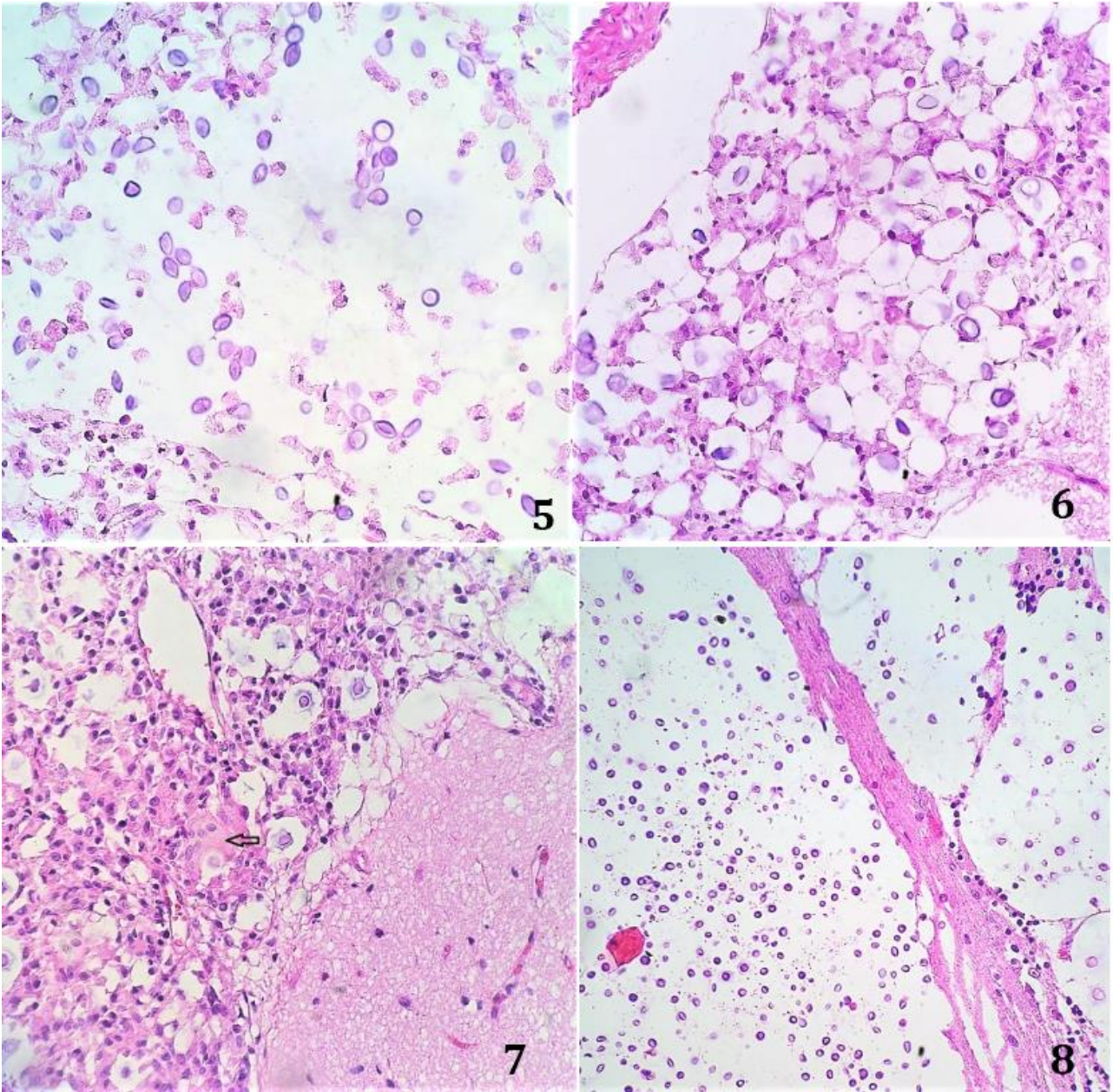
Trivedi S R, Sykes, J E, Cannon M S, Wisner E R, Meyer W, Sturges B K, Dickinson P J, Johnson L R. 2011. Clinical features and epidemiology of cryptococcosis in cats and dogs in California: 93 cases (1988-2010). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 239(3), 357-369. <<https://doi.org/10.2460/javma.239.3.357>>

## Figures



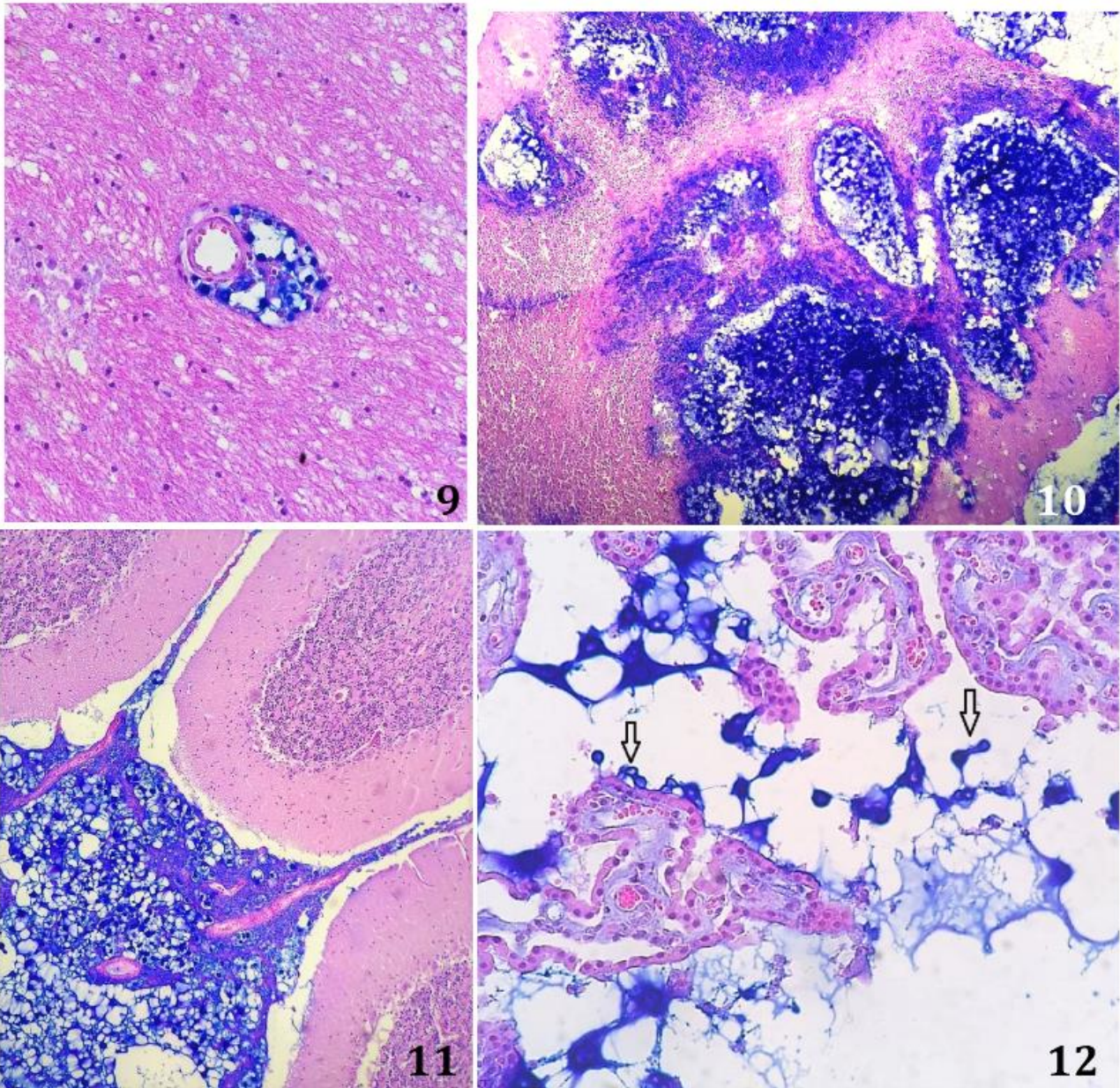
**Fig. 1-4.** 1. Arrows: piriform lobes with friable, soft, round, gelatinous, and grayish nodules expanding the parenchyma, ranging from 0.1 to 2 cm. Neurocryptococcosis, cut surface of telencephalic cortex, cat, case 7. 2. Arrows: soft, round, gelatinous, and grayish nodules expanding the meninges, and causing meningeal opacity. Ranging from 0,1 to 1 cm. Neurocryptococcosis, cerebellum, cat, case 6. 3. Enlargement of the nerve roots. Neurocryptococcosis, spinal cord (lumbar region), dog, case 11. 4. Bilateral swelling of the extracranial portion of the optic nerve Neurocryptococcosis, eye, dog, case 11.





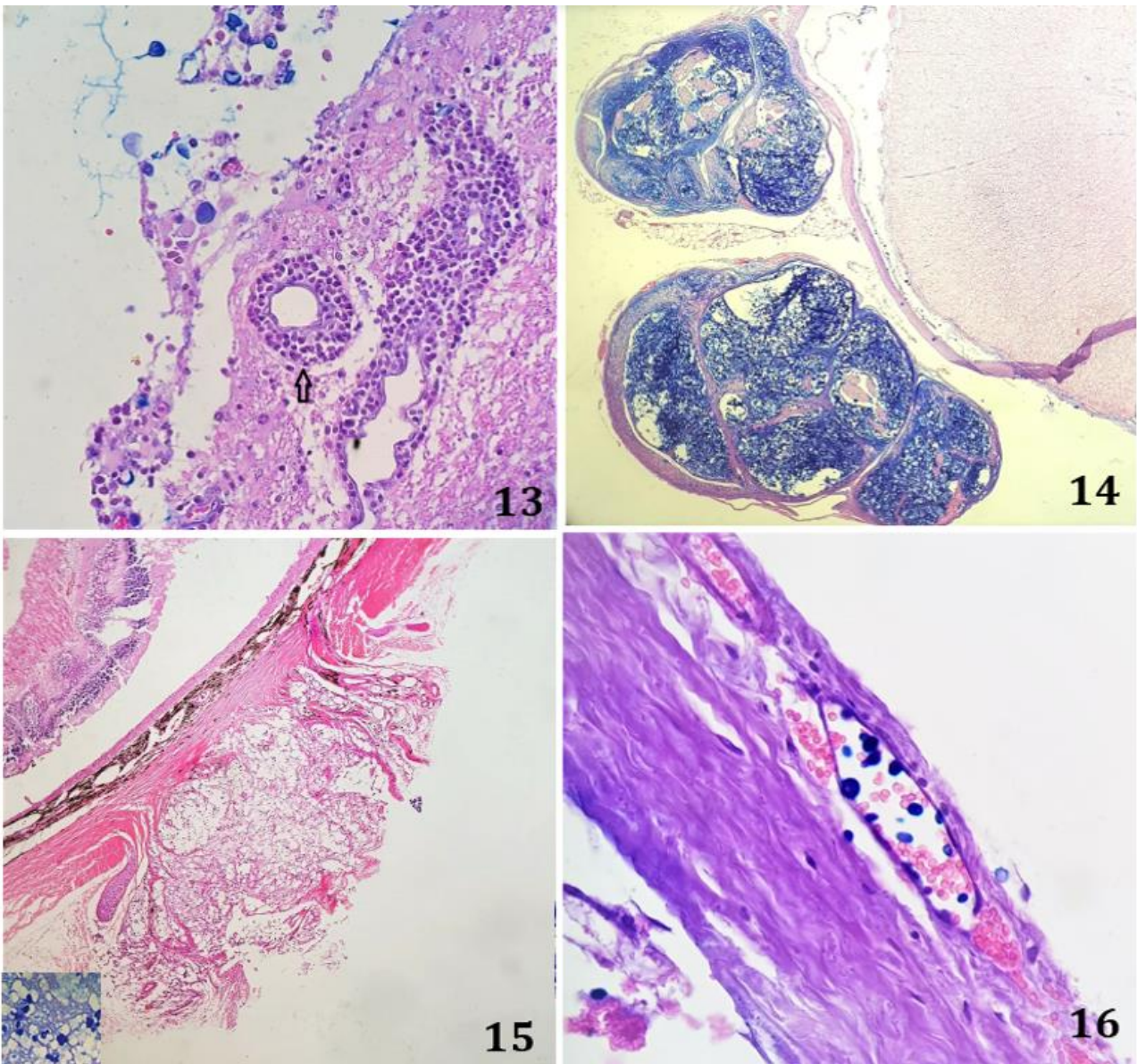
**Fig. 5-8.** 5. Yeast's aggregate surrounded by mild inflammation; predominance of foamy macrophages, fewer lymphocytes and plasma cells; severe fungal burden. Neurocryptococcosis, telencephalic cortex (meninges), cat, case 7. HE (obj.40x). 6. Aggregated to individualized yeasts, surrounded by moderate inflammation; predominance of foamy macrophages, slight increase in the number of lymphocytes and plasma cells; moderate fungal burden. Neurocryptococcosis, telencephalic cortex (meninges), cat, case 4. HE (obj.40x). 7. Individualized and interspersed yeasts by severe inflammation; predominance of lymphocytes and plasma cells, with fewer macrophages; mild fungal burden. Arrow: indicates multinucleated giant cell engulfing a yeast. Neurocryptococcosis, telencephalic cortex (meninges), dog, case 1. HE (obj.40x). 8. Aggregated yeasts surrounded by no inflammation; severe fungal burden. Neurocryptococcosis, cerebellum (meninges), cat, case 2. HE (obj.20x).





**Fig. 9-12.** **9.** Blue-stained yeasts around blood vessels in the neuropil, expanding the Virchow-Robin spaces. Neurocryptococcosis, telencephalic cortex (white matter), cat, case 3. Alcian Blue (obj.40x). **10.** Blue-stained yeast's aggregates in the neuropile; high fungal burden with mild to absent inflammatory infiltrate. Neurocryptococcosis, cerebellum, cat, case 7. Alcian Blue (obj.20x). **11.** Blue stained yeast's aggregates in the meninges forming large aggregates; high fungal burden with mild to absent inflammatory infiltrate. Neurocryptococcosis, cerebellum, cat, case 6. Alcian Blue (obj.20x). **12.** Blue stained yeasts around choroid plexus blood vessels; severe fungal burden and mild inflammation. Arrows: indicate narrow based budding and chain budding. Neurocryptococcosis, choroid plexus, cat, case 6. Alcian Blue (obj.40x).





**Fig. 13-16.** **13.** Blue-stained yeasts in the meninges, low fungal burden and moderate inflammation. Arrow: indicates accentuated perivascular lymphoplasmacytic inflammation. Neurocryptococcosis, telencephalic cortex, cat, case 5. Alcian Blue (obj.40x). **14.** Blue-stained yeasts invading and partially replacing the nervous tissue, severe fungal burden with minimal inflammation. Neurocryptococcosis, spinal cord, nerve roots (lumbar region), dog, case 11. Alcian Blue (obj.10x). **15.** Invasion and replacement of the optic nerve region by yeasts. Neurocryptococcosis, eye, dog, case 11. HE (obj.20x). Inset. Alcian blue-stained yeasts in the optic nerve. Alcian Blue (obj.20x). **16.** Blue-stained yeasts inside a blood vessel (fungal emboli) of the dura mater. Neurocryptococcosis, spinal cord (thoracic region), cat, case 9. Alcian Blue (obj.40x).

## Tables

**Table 1.** Neurocryptococcosis in cats and dogs. Inflammatory intensity and fungal burden average score in the CNS of each neurolocation (n=11).

Nervous system location	Cases* (n)	Inflammatory response **(average value)	Fungal burden **(average value)
Telencephalic cortex	11 (11)	1,36	2,27
Basal ganglia	1 (1)	3	1
Thalamus and hippocampus	8 (9)	1,11	1,88
Mesencephalon	3 (4)	0,75	2
Cerebellum	11 (11)	1,45	1.9
Choroid plexus	3 (3)	2,25	1
Pons	5 (6)	1	1,66
Spinal cord (cervical, thoracic and lumbosacral) /nerve roots/ para-vertebral ganglia	4 (4)	0,75	2
Optic nerve	2 (2)	1,5	2,5

\* The number of cases with each specific affected neurolocation was considered among the available paraffin blocks (n). \*\*The score of each case for inflammatory response and fungal burden was added and divided by the number of individuals with involvement of each neurolocation, resulting in an average value of each coefficient.

**Table 2.** Neurocryptococcosis in cats and dogs. Intensity of inflammation and fungal burden for each case (n=11).

Case	Inflammatory intensity	Fungal burden
1	moderate	severe
2	mild	severe
3	mild	severe
4	moderate	moderate
5	severe	mild
6	moderate	severe
7	mild	severe
8	moderate	severe
9	severe	mild
10*	moderate	moderate
11*	moderate	moderate

\* cases of dogs

**Table 3.** Neurocryptococcosis in cats and dogs. Intensity of inflammation and fungal burden for each case (n=11).

Case	Capsule thickness	Wall thickness	Budding frequency
1	regular**	Increased	regular
2	increased	regular**	regular
3	decreased to absent	decreased	high
4	increased	increased	high
5	regular	regular	low
6	regular	regular	high
7	increased	increased	low
8	increased	increased	high
9	decreased	decreased	high
10*	regular	regular	low
11*	regular	regular	low

\* cases of dogs. \*\* The thickness of the wall and of the capsule were classified as decreased, regular, or increased subjectively compared to parameters of Galiza et al. (2014).

## 4 CONCLUSÃO

Este estudo apresenta as características neuropatológicas da criptococose em cães e gatos, enfatizando a importância de considerar neurolocalizações específicas nesta infecção. Observou-se que o córtex telencefálico e o cerebelo estavam consistentemente envolvidos, juntamente com os pulmões, mesmo nos casos que não apresentavam sinais neurológicos e respiratórios ou lesões macroscópicas nestes órgãos. Os resultados demonstram a importância da necropsia, não só para o diagnóstico da neurocriptococose, mas para a identificação de nuances da doença que não são facilmente discerníveis em exames clínicos ou de imagem. A avaliação integrada de lesões macroscópicas, histologia e sinais clínicos, e a correlação cuidadosa entre estes espectros, não só possibilitou a descrição mais precisa da doença, mas também permitiu a apreciação da complexidade de suas manifestações. Os resultados contribuem para uma melhor elucidação da distribuição e da patogênese da neurocriptococose, podendo também contribuir para melhorias na precisão dos diagnósticos e na eficácia das intervenções terapêuticas.

## 5 REFERÊNCIAS

ALVES, Luciano Marra; PORTO, Hayla Kristine Paes. Criptococose. *In*: MAZZOTTI, Giovana Adorni; ROZA, Marcello Rodrigues. **Medicina Felina Essencial: Guia prático**. 1. ed. Curitiba: Equalis, p. 475 - 479. 2016.

BARRS, Vanessa R. et al. Feline pyothorax: a retrospective study of 27 cases in Australia. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 7, n. 4, p. 211-222, 2005.

BOSCO, Sandra de Moraes Guimes et al. Criptococose. *In*: MEGID, Jane.; RIBEIRO, Marcio Garcia; PAES, Antonio Carlos. **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca, cap. 82, p. 878-886. 2016.

CASWELL L. Jeff; WILLIAMS Kurt J. Infectious diseases of the respiratory system, *In*: MAXIE Grant; JUBB, Kennedy; PALMER. **Pathology of Domestic Animals**. 5 ed. Saunders Elsevier, St Louis. Vol. 2. p. 579-650. 2007.

CHARLIER, C.; CHRÉTIEN, F.; BAUDRIMONT, M. et al. Capsule structure changes associated with *Cryptococcus neoformans* crossing of the blood-brain barrier. **American Journal of Pathology**, v. 166, n. 2, p. 421-432, 2005.

CASTELLÁ, G.; ABARCA, M.L.; CABAÑES, F.J. Criptococosis y animales de compañía. **Revta Iberoam. Micol**, v. 225, p. 19-24, 2008.

CHANG, Yun C. et al. Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. **Infection and immunity**, v. 72, n. 9, p. 4985-4995, 2004.

CHRISMAN, C.L. **Neurologia dos Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, p. 432, 1985.

CORRÊA, G. L. B. Criptococose em gatos. **Ciência Rural**, v. 24, n. 2, p. 439-447, 1994.

DAVIES, C.; TROY, G. C. Deep mycotic infections in cats. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 32, n. 5, p. 380-391, 1996.

DEWEY, C.W. Neuroanatomia funcional e não funcional: a chave para a localização da lesão. *In*: DEWEY, C.W. (Org.) **Neurologia de cães e gatos: Guia prático**. São Paulo: Roca, cap. 1, p. 1-18, 2006.

FARIA, Natália Romão; XAVIER, Melissa O. Criptococose. *In*: CRUZ, Luiz Celso Hygino. **Micologia Veterinária**. 1. ed. Pelotas: Editora Universitária UFPEL, cap. 5.3, p. 191-203, 2009.

FERNANDES, Carla Cristiane. **Caracterização imuno-histoquímica de infiltrado inflamatório em tumores mamários espontâneos caninos**. 2012. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

FRY, M. M.; MCGAVIN, M. D. Medula Óssea, Células Sanguíneas e Sistema Linfático. *In*: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da patologia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, cap. 13. p. 729-731, 2013.

GALIZA, G. J. N. et al. Ocorrência de micoses e pitiose em animais domésticos: 230 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio de Janeiro. v. 34, n. 3, p. 224-232, 2014a.

GALIZA, G. J. N. et al. Características histomorfológicas e histoquímicas determinantes no diagnóstico da criptococose em animais de companhia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 3, p. 261–269, 2014b.

GAMBALE, Valderez. Morfologia, reprodução e taxonomia dos fungos. In: GOMPERTZ, Olga Fischman et al. et al. **Compêndio de micologia médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 8. p. 89-98, 2010.

GANGNEUX, J. P. et al. Invasive fungal diseases during COVID-19: we should be prepared. **Journal de mycologie medicale**. v. 30. n. 2. p. 1-2, apr., 2020.

GARCÍA, Alonso M, et al. Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**. v.18, n. 12, p. 617-623, 1996.

GEORGI, A.; SCHNEEMANN, M.; TINTELNOT, K.; CALLIGARIS-MAIBACH, R.C.; MEYER, S.; WEBER, R. et al. Cryptococcus gattii meningoencephalitis in an immunocompetent patient 13 months after exposure. **Infection**, v. 37, p. 370-373, 2009.

GUARNER, J.; BRANDT, M. E. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 24. n. 2. p. 247-280, 2011.

GUEVARA-CAMPOS, José et al. Meningoencefalitis por Cryptococcus neoformans en escolares inmunocompetentes. **Investigación Clínica**, v. 50, n. 2, p. 231-239, 2009.

HONSHO, C.S.; MINE, S.Y.; ORIÁ, A.P.; BENATO, N.; CAMACHO, A.A.; ALESSI, A.C.; LAUS, J.L. Generalized systemic cryptococcosis in a dog after immunosuppressive corticotherapy. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 2, p. 155-159, 2003.

JONG, Ambrose et al. Involvement of human CD44 during Cryptococcus neoformans infection of brain microvascular endothelial cells. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 6, p. 1313-1326, 2008.

KRONSTAD, James W. et al. Expanding fungal pathogenesis: Cryptococcus breaks out of the opportunistic box. **Nature reviews Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 193-203, 2011.

LAPPIN, M. R. Infecções Micóticas Multissistêmicas. **Medicina interna de pequenos animais**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, cap. 95, p. 1360-1363, 2015.

LIMA, A. O. et al. **Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica**. 5. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 1977.

LESTER S. J., KOWALEWICH N. J., BARTLETT K. H., KROCKENBERGER M. B., FAIRFAX T. M., MALIK R. Clinicopathologic features of an unusual outbreak of cryptococcosis in dogs, cats, ferrets, and a bird: 38 cases January to July 2003. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, n.11, p. 1716-1722, 2004.

LARSSON, C. E. et al. Canine ocular cryptococcosis: a case report. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 55, n. 5, p. 533-538, 2003.

MA, Hansong; MAY, Robin C. Virulence in Cryptococcus species. **Advances in applied microbiology**, v. 67, p. 131-190, 2009.

MARCASSO, R.A.; SIERRA, S.; ARIAS, M.V.B.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; YAMAMURA,

- A.A.M.; BIASI, F.; LOPES, B.A.; AMUDE, A.M.; CORTÊZ, D.E.A. Criptococose no sistema nervoso de cães - relato de três casos. **Ciências Agrárias**, v. 26, n. 2, p. 229-238, 2005.
- McGRATH, J. D. Inflammatory and infectious diseases. In: McGRATH, J.D. **The Neurologic Examination of the Dog With Clinic-pathological Observations**, 2. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, cap. 12, p. 123-147, 1960.
- MCGILL, S.; MALIK, R.; SAUL, N.; BEETSON, S.; SECOMBE, C.; ROBERTSON, I.; IRWIN, P. Cryptococcosis in domestic animals in Western Australia: a retrospective study from 1995-2006. **Med. Mycol.**, v. 47, p. 625-639, 2009.
- MALIK, R.; HUNT, G. B.; BELLENGER, C.R. et al. Intra-abdominal cryptococcosis in two dogs. **J Small Anim Pract**, v. 40, p. 387-391, 1999.
- MORETTI, M. L.; RESENDE, M. R.; LAZÉRA, M. S.; COLOMBO, A. L.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Consenso em criptococose: 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 524-544, 2008.
- MÜLLER, M.; NISHIZAWA, M. A criptococose e sua importância na Medicina Veterinária *In: Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia*. São Paulo: Conselho Regional de Medicina Veterinária, v. 15, n. 1, p. 24-29, 2017.
- NOBRE, M. O.; NASCENTE, O. S.; MEIRELES, M. C.; FERREIRO, L. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. **Ciência Rural**, v. 32, p. 175-184, 2002.
- O'BRIEN, C.R.; KROCKENBERGER, M.B.; MARTIN, P. et al. Long-term outcome of therapy for 59 cats and 11 dogs with cryptococcosis. **Aust Vet J**, v. 84, p. 384-392, 2006.
- OSTERHOLZER, J. J., MILAM, J. E., CHEN, G. H., TOEWS, G. B., HUFFNAGLE, G. B.; OLSZEWSKI, M. A. Role of dendritic cells and alveolar macrophages in regulating early host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 77, p. 3749-3758, 2009.
- PAULIN, J.; MORSHED, M.; ARMIÉN, Anibal G. Otitis interna induced by *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* in a cat. **Veterinary pathology**, v. 50, n. 2, p. 260-263, 2013.
- PAL, M. Feline meningitis due to *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and review of feline cryptococcosis. **Mycoses**, v. 34, n. 7, p. 313-316, 1991.
- PAPPALARDO, Mara CSM; MELHEM, Márcia SC. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, p. 299-305, 2003.
- PEREIRA, A.P.C.; COUTINHO, S.D.A. Criptococose em cães e gatos – revisão. **Rev. Clin. Vet.**, v. 8, n. 45, p. 24-32, 2003.
- QUINN, P. J. et al. **Microbiologia Veterinária: Essencial**. Artmed Editora, 2018.
- RODRIGUES, M. L. et al. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*: virulence factors and immunological mechanisms. **Microbes Infection**. v. 1 p. 293-301. 1999.
- REGALLA, D.; VANNATTA, M.; ALAM, M.; MALEK, A. E. COVID-19-associated *Cryptococcus*



infection (CACI): a review of literature and clinical pearls. **Infection**, v. 50, n. 4, p. 1007–1012, 2022.

SANTOS, R. L.; ALESSI, A. C. **Patologia Veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Roca. 2018.

SEYEDMOUSAVI, Seyedmojtava et al. Fungal infections in animals: A patchwork of different situations. *In: Medical Mycology*. 2018. v. 56, p. 165-187. 2022.

SUMMERS, B. A. Inflammatory diseases of the central nervous system. *In: J. F. Cummings & A. de Lahunta (Eds.), Veterinary Neuropathology*, St. Louis, MO: Mosby-Year Book, Inc. p. 151-155. 1995.

SORREL; T. C. Cryptococcus neoformans variety gattii. **Medical Mycology**. v. 39, p. 155-168, abr. 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11346263/>> Acesso em: 25 mai. 2023.

STEENBERGEN, Judith N.; CASADEVALL, Arturo. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus Cryptococcus neoformans. **Microbes and infection**, v. 5, n. 7, p. 667-675, 2003.

STOKES, J. Doenças Infeciosas – Doenças Fúngicas e Causadas por Riquetsias. *In: LITTLE, S. E. O gato*. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca, cap. 33, p. 978-980, 2016.

SYKES, Jane E.; MALIK, R. Criptococose. *In: GRENNE, Craig E. Doenças infecciosas em cães e gatos*. 4. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 59, p. 653-666, 2015.

TINTELNOT, K. et al. Cryptococcus gattii meningoencephalitis in an immunocompetent person 13 months after exposure. *Infection*, v. 37, p. 370-373, 2009.

TRIVEDI, S. R.; SYKES, J. E.; CANNON, M. S.; WISNER, E. R.; MEYER, W.; STURGES, B. K.; DICKINSON, P. J.; JOHNSON, L. R. Clinical features and epidemiology of cryptococcosis in cats and dogs in California: 93 cases (1988-2010). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 239, n. 3, p. 357-369, 2011.

VANDEVELDE, M.; HIGGINS, R.J.; OEVERMANN, A. **Veterinary Neuropathology: Essentials of Theory and Practice**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2012.

WILLIAMSON, P. R.; WAKAMATSU, K.; ITO, S. Melanin biosynthesis in Cryptococcus neoformans. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 6, p. 1570-1572, 1998.

WILKINSON, G.T. Cryptococcosis. *In: BARLOUGH, J.E. (Ed.) Manual of Small Animal Infectious Diseases*. Nova York: Churchill Livingstone, p. 319-326, 1988.

XIE, S.; SAO, R.; BRAUN, A.; BOTTONE, E. J. Difference in Cryptococcus neoformans cellular and capsule size in sequential pulmonary and meningeal infection: a postmortem study. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, p. 49-52, 2012.