



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

MARIA AUXILIADORA BEZERRA FECHINE

HISTOPLASMOSE EM INDIVÍDUOS HIV POSITIVOS NO
ESTADO DO CEARÁ: ESTUDO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO E
TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE
HISTOPLASMA CAPSULATUM VAR. *CAPSULATUM*

FORTALEZA

2011

MARIA AUXILIADORA BEZERRA FECHINE

HISTOPLASMOSE EM INDIVÍDUOS HIV POSITIVOS NO ESTADO DO
CEARÁ: ESTUDO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO E TESTE DE
SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE *HISTOPLASMA*
CAPSULATUM VAR. *CAPSULATUM*

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante
Coorientador: Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim

FORTALEZA

2011

F316h Fechine, Maria Auxiliadora Bezerra

Histoplasmose em indivíduos HIV positivos no Estado do Ceará: estudo clínico-epidemiológico e teste de sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*/ Maria Auxiliadora Bezerra Fechine. – Fortaleza, 2010.

145 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza-CE, 2011

1. Testes de Sensibilidade Microbiana 2. Histoplasma 3. Síndrome de Imunodeficiência Adquirida 4. Antimicóticos I. Brilhante, Raimunda Sâmia Nogueira (orient.) II. Título

CDD: 616.96901

MARIA AUXILIADORA BEZERRA FECHINE

HISTOPLASMOSE EM INDIVÍDUOS HIV POSITIVOS NO ESTADO DO CEARÁ:
ESTUDO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO E TESTE DE SENSIBILIDADE
ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE *HISTOPLASMA CAPSULATUM* VAR.
CAPSULATUM

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Medicina,
da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Aprovada em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Eveline Pipolo Milan
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo
Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Universidade Estadual do Ceará

Dedico este trabalho a Deus, meu único e verdadeiro pai.

Ao meu marido Valderlan, companheiro de todos os momentos e meu grande incentivador. A meus filhos, Anna Cecília, Gustavo e Anna Helena, para que pelo exemplo aprendam a importância dos estudos. E à minha mãe, Cleomar, que apesar da humildade soube “sonhar grande”.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, pelo exemplo de mestre e pai na ciência.

À Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, pela forma como me orientou, não como uma professora simplesmente, mas como uma amiga, mostrando os erros e os caminhos certos, e demonstrando total compromisso com o ensino e a pesquisa.

À Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro, cuja filosofia de vida e o entendimento da ciência ampliaram minha visão do mundo científico.

Ao Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, pelo carinho de um orientador que ajuda a todos de forma despreendida.

A Profa. Dra. Maria José Nogueira Diógenes que segurou em minha mão e me guiou nos meus primeiros passos e me orienta até os dias de hoje.

À Profa. Dra. Terezinha do Menino Jesus Silva Leitão, médica infectologista do Hospital São José de Doenças Infecciosas, e, docente da Universidade Federal do Ceará, que sempre esteve disponível para responder aos questionamentos e solicitações.

A todos da família do Centro Especializado em Micologia Médica, pois, na minha consciência, sei que devo a eles a presente tese.

Às minhas grandes amigas Rita Amanda Chaves de Lima e Joyce Fonteles Ribeiro, que não mediram esforços para me ajudar, e às quais devo todos os louros da vitória.

Às minhas amigas Érica Pacheco Caetano, Francisca Jakelyne de Farias Marques, Lauro Perdigão Neto e Kharla Kharolyni Nobre Rabelo Patoilo, pela relevante contribuição à presente tese.

A todos os funcionários da Universidade Federal do Ceará, em especial à Terezinha de Jesus Santos Rodrigues e Daniel Teixeira Lima pelo apoio constante.

A todos os professores da Pós-Graduação em Ciências Médicas – UFC, bem como às secretárias Ivone Mary Fontenele de Sousa e Rita de Cássia Antunes.

Ao Prof. Dr. André Jalles Monteiro, pela análise estatística, que não era apenas uma análise, mas uma verdadeira aula de Estatística.

Ao Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo, pelo fornecimento das cepas oriundas do Sudeste do Brasil.

A todos os que fazem o Hospital São José de Doenças Infecciosas pela contribuição relevante à presente tese, sem ajuda dos quais nada poderia ter sido realizado.

Ao Médico Patologista da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, Jacó Ricarte Lima Mesquita, por estar sempre disponível para esclarecimentos e pelo fornecimento das cepas utilizadas nesta pesquisa.

Ao Prof. João Vianney Campos de Mesquita, da Universidade Federal do Ceará e Academia Cearense de Língua Portuguesa, pela revisão estilística e gramatical desta tese.

À Rosane Maria Costa, bibliotecária da Universidade Federal do Ceará, Biblioteca de Ciências da Saúde, UFC/BU/BCS, pela normalização desta tese.

À Divisão de Monitoramento da Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos (FUNCEME), pelos dados meteorológicos fornecidos.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FUNCAP, pelo apoio financeiro.

RESUMO

A histoplasmose, causada pelo fungo *Histoplasma capsulatum*, é a mais prevalente das micoses sistêmicas e doença marcadora da síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS). Foi realizada análise descritiva de 254 casos de histoplasmose em pacientes com AIDS, no período de 2006 a 2010, no Estado do Ceará, Nordeste do Brasil, descrevendo os aspectos epidemiológicos, clínicos, laboratoriais e terapêuticos. Adicionalmente, buscou-se determinar o perfil de sensibilidade *in vitro* de cepas de *H.capsulatum*. O teste de sensibilidade *in vitro* foi realizado, pelo método da microdiluição, segundo protocolo M-27A2 do CLSI, em cepas de *H. capsulatum* nas fases filamentosa e leveduriforme, frente os antifúngicos anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol e caspofungina, e o antimicrobiano sulfametoxazol-trimetoprim, comparando-se cepas obtidas dos casos do período analisado e cepas clínicas oriundas de pacientes do Sudeste do Brasil. Em 39,37% dos casos, a histoplasmose foi o primeiro evento definidor de SIDA e em 80,4% dos pacientes a contagem de células CD4 era menor do que 100 cells/ml. Os níveis de lactato desidrogenase estavam elevados em todos os pacientes avaliados, observando-se comprometimento da função hepática e renal, com evolução para óbito em 41,7% dos casos. O perfil de sensibilidade *in vitro* demonstrou que não há fenômeno de resistência antifúngica entre as cepas avaliadas, e todas as cepas foram sensíveis ao sulfametoxazol-trimetoprim. A CFM das drogas caspofungina, itraconazol, voriconazol e sulfametoxazol-trimetoprim foi mais elevada para as cepas oriundas do Nordeste em relação às cepas do Sudeste do Brasil. Existe aumento significativo no número de casos de histoplasmose em indivíduos HIV positivos no Estado do Ceará, Nordeste do Brasil, em relação a estudos anteriores, mas não há fenômeno de resistência entre as cepas de *H. capsulatum*, e estas demonstram sensibilidade ao sulfametoxazol-trimetoprim, com diferença no perfil de sensibilidade entre as cepas do Nordeste e Sudeste do Brasil.

Palavras-chave: Teste de sensibilidade antimicrobiana. *Histoplasma capsulatum*. Antifúngicos. Sulfametoxazol-Trimetoprim.

ABSTRACT

Histoplasmosis, caused by the fungus *Histoplasma capsulatum*, is the most prevalent of the systemic mycoses and a marker disease for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). A descriptive analysis was carried out of 254 cases of patients suffering from histoplasmosis and AIDS between 2006 and 2010 in the state of Ceará, northeastern Brazil, noting the epidemiological, clinical, laboratory and therapeutic aspects. Additionally, the *in vitro* sensitivity profile of strains of *H. capsulatum* in the filamentous and yeast phases was tested by the microdilution method against the antifungals amphotericin B, fluconazole, itraconazole, voriconazole and caspofungin and the combined antimicrobial sulfamethoxazol-trimethoprim, according to protocol M-27A2 from the CLSI. The results were compared with those of strains obtained from southeastern Brazil. In 39.37% of the cases, histoplasmosis was the first event indicating AIDS and in 80.4% of the patients the CD4 cell count was under 100 cells/ml. The levels of lactate dehydrogenase were high in all the patients evaluated, with impaired hepatic and renal function evolving to death being observed in 41.7% of the cases. The *in vitro* sensitivity profile demonstrated there was no antifungal resistance in the strains analyzed and all the strains were sensitive to sulfamethoxazol-trimethoprim. The MFC levels of caspofungin, itraconazole, voriconazole and sulfamethoxazol-trimethoprim were higher for the strains from the Northeast than those from the Southeast. In recent years there has been a significant increase in the number of histoplasmosis cases in HIV-positive individuals in the state of Ceará, but the results showed no resistance among the strains of *H. capsulatum* tested. These showed sensitivity of sulfamethoxazol-trimethoprim, but there was a difference in sensitivity between the strains from the northeastern and southeastern regions of Brazil.

Keywords: Antimicrobial Susceptibility Tests. *Histoplasma capsulatum*. Antimicrotics. Sulfamethoxazole-Trimethoprim.

LISTA DE FIGURAS

1	Samuel Taylor Darling (1872-1925) patologista dos Estados Unidos da América, que relatou o primeiro caso de histoplasmose por <i>Histoplasma capsulatum</i> , em 1906	18
2	Henrique da Rocha Lima (1879-1956), pesquisador brasileiro que demonstrou em 1912 a natureza fúngica do <i>Histoplasma capsulatum</i>	19
3	<i>Histoplasma capsulatum</i> à microscopia eletrônica: A – Macroconídio com projeções apendiculares, semelhantes a tubérculos, conhecidos como macroconídios tuberculados ou corpos mamilonados com diâmetro de 8-14µm; B – microconídio, estruturas ovaladas, com paredes lisas que apresentam diâmetro de 2-5µm.....	23
4	<i>Histoplasma capsulatum</i> : A - aspecto macromorfológico em ágar-batata dextrose, demonstrando colônia algodonosa branca; aspecto micromorfológico em lactofenol azul de algodão, mostrando os macroconídios tuberculados (estalagmosporos); B – forma leveduriforme a 37°C em ágar-BHI, demonstrando colônias de aspecto úmido, coloração branco-amarelada e à microscopia, estrutura leveduriforme com halo claro e brotamento.....	24
5	Ciclo biológico do <i>H. capsulatum</i>	31
6	Radiografia do tórax, com infiltrado intersticial difuso, com predomínio paracardíaco direito	34
7	A. Radiografia de tórax, demonstrando micronódulos difusamente distribuídos em ambos os pulmões; B. Tomografia computadorizada de tórax, demonstrando nódulo pulmonar à direita	35
8	Lesões cutâneas (pápulas e nódulos eritematovioláceos) em tronco e membros	36
9	Histoplasmose pulmonar aguda com pericardite. A sombra cardíaca está aumentada pela efusão pericárdica, com linfadenopatia paratraqueal	37
10	Nódulos, placas e lesões semelhantes a molusco na face em indivíduo do sexo masculino com AIDS.....	39
11	Ressonância magnética em cortes axiais pré (A) e pós-contraste (B), e em cortes coronais (C) e sagitais (D) pós-contraste. Na topografia do tálamo, hipotálamo e quiasma óptico, à esquerda, evidencia-se lesão expansiva irregularmente arredondada, isointensa ao parênquima encefálico, com impregnação anelar pelo gadolínio.....	40
12	Taxa de incidência de AIDS, por ano de diagnóstico e sexo, no Estado do Ceará do ano de 1983 a 2010.....	42

13	Número e incidência de casos de AIDS por faixa etária, no Estado do Ceará, em 2009.....	43
14	A. Histoplasmose cutânea ulcerada; B. Histoplasmose cutânea disseminada em paciente com AIDS.....	44
15	Histoplasmose miliar dos pulmões em paciente com AIDS.....	44
16	Esfregaço de sangue periférico de paciente com histoplasmose disseminada, mostrando elementos leveduriformes de <i>H. capsulatum</i> dentro de monócitos (GIEMSA).....	46
17	Aspecto histopatológico de amostra da medula óssea, mostrando o <i>H. capsulatum</i> na forma leveduriforme (prata-metenamina).....	47
18	Reação de imunodifusão radial dupla, demonstrando no orifício do centro soro humano positivo para histoplasmose; EH-53, cepa humana de referência; EH-313, cepa de <i>H. capsulatum</i> isolado de guano de morcego; EH-314, cepa de <i>H. capsulatum</i> isolada de fezes de galinha; EH-315, cepa de <i>H. capsulatum</i> de um morcego infectado; EH-323, cepa de <i>H. capsulatum</i> isolada de um paciente com AIDS e histoplasmose.....	48
19	Foto da entrada principal do Hospital São José de Doenças Infecciosas do Estado do Ceará.....	67
20	Cabine de segurança biológica classe II-B2, em laboratório de biossegurança nível 3	71
21	A-Cultura de <i>H. capsulatum</i> na fase leveduriforme obtida em ágar-BHI suplementado com sangue de carneiro a 10% e à 35°C. B- Cultura de <i>H. capsulatum</i> na fase filamentosa obtida em BHI a 28°C	73
22	Mapa da Região Metropolitana de Fortaleza (RMF), com destaque para os municípios com casos de histoplasmose em indivíduos HIV positivos (N=254).....	78
23	Mapa do Estado do Ceará, com destaque para os municípios com casos de histoplasmose em indivíduos HIV positivos.....	79
24	Mapa da cidade de Fortaleza, com destaque para a distribuição dos casos novos de histoplasmose em pacientes HIV positivos internados no HSJ.....	80
25	Aspectos clínicos da histoplasmose – A – lesão purpúrica perioral e candidíase oral; B – lesões ulceradas em palato; C - lesões eritemato-papulosas em dorso; D - lesões purpúricas em membros inferiores; E – lesões purpúricas disseminadas; E – radiografia de tórax, demonstrando infiltrado intersticial difuso.....	82
26	<i>H. capsulatum</i> : A e B - aspecto macromorfológico em ágar-batata dextrose e ágar-	

BHI, demonstrando colônia algodonosa branca; C - aspecto micromorfológico em lactofenol azul de algodão, mostrando os macroconídios tuberculados (estalagmosporos); D – exame direto de amostra de lavado broncoalveolar, demonstrando forma parasitária dentro de macrófago polimorfonucleado; E – forma leveduriforme a 37°C em ágar BHI suplementado com sangue de carneiro a 10%, demonstrando colônias de aspecto úmido, coloração branco-amarelada; F - à microscopia, estrutura leveduriforme com e brotamento..... 85

27 Correlação entre índices pluviométricos e número de casos novos internados por histoplasose e AIDS no HSJ, de janeiro de 2006 a dezembro de 2010..... 88

28 Correlação entre a velocidade dos ventos e número de casos novos internados por histoplasose e AIDS no HSJ, de janeiro de 2006 a dezembro de 2010..... 88

LISTA DE QUADROS

1	Registro da ocorrência dos eventos <i>El Niño</i> e <i>La Niña</i> , de 2000 a 2010.....	29
2	Drogas antifúngicas e concentrações testadas.....	74
3	Cepas de <i>H. capsulatum</i> utilizadas na pesquisa.....	133
4	Número de casos de histoplasmose disseminada e AIDS, por município, no Estado do Ceará.....	135

LISTA DE TABELAS

1	Número de internamentos no HSJ por casos novos de histoplasmose e AIDS, entre janeiro de 2006 e dezembro de 2010.....	77
2	Principais características epidemiológicas dos casos novos internados no HSJ por histoplasmose e AIDS, entre janeiro de 2006 e dezembro de 2010.....	78
3	Manifestações clínicas da histoplasmose em pacientes com AIDS no Ceará, entre janeiro de 2006 e dezembro de 2010.....	81
4	Resultados dos exames laboratoriais em pacientes com histoplasmose e AIDS no Ceará, entre janeiro de 2006 e dezembro de 2010-grupo dos positivos.....	83
5	Resultados dos exames laboratoriais em pacientes com histoplasmose e AIDS no Ceará, entre janeiro de 2006 e dezembro de 2010-grupo dos negativos.....	84
6	Resultados dos exames laboratoriais em pacientes com histoplasmose e AIDS no Ceará, entre janeiro de 2006 e dezembro de 2010.....	87
7	Variação da CIM dos antifúngicos ante cepas de <i>H. capsulatum</i> , oriundas do Nordeste (NE) ou Sudeste (SE) do Brasil.....	89
8	Variação da CFM dos antifúngicos ante cepas de <i>H. capsulatum</i> , na forma filamentosa, oriundas do Nordeste (NE) ou Sudeste (SE) do Brasil.....	90
9	CIM de SMX-TMP ante cepas de <i>H. capsulatum</i> , oriundas do Nordeste (NE) e Sudeste (SE) do Brasil.	91
10	CFM de SMX-TMP ante cepas de <i>H. capsulatum</i> oriundas do Nordeste (NE) e Sudeste (SE) do Brasil.....	91
11	Número de casos de histoplasmose disseminada e AIDS ao longo dos meses e anos.....	136
12	Estatística básica da CFM, conforme região.....	136
13	Distribuição de frequência das CFM's, conforme a região, para anfotericina B.....	137
14	Distribuição de frequência das CFM's, conforme a região, para caspofungina.....	137
15	Distribuição de frequência das CFM's, conforme a região, para fluconazol.....	137
16	Distribuição de frequência das CFM's, conforme a região, para itraconazol.....	138
17	Distribuição de frequência das CFM's, conforme a região, para voriconazol.....	138
18	Comparação das CFM's entre as regiões, para cada droga utilizada.....	138
19	Comparação das CIM's entre as regiões, para cada droga utilizada, na forma filamentosa.....	138
20	Comparação das CIM's entre as regiões, para cada droga utilizada, na forma leveduriforme.....	139

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AFST-EUCAST	<i>Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility</i>
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
ABCL	Anfotericina B em complexo lipídico
ABDC	Anfotericina B em dispersão coloidal
AL	Anfotericina lipossomal
AMB	Anfotericina B
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CAS	Caspofungina
CDC	<i>Centers for Disease Control And Prevention</i>
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FLU	Fluconazol
FUNCEME	Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hidricos
HE	Hematoxilina-Eosina
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon-gama
ITR	Itraconazol
HSJ	Hospital São José de Doenças Infecciosas
K ⁺	Íon potássio
KOH	Hidróxido de potássio
LDH	Lactato desidrogenase

METROFOR	Metrô de Fortaleza
Mg ²⁺	Íon magnésio
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico
NE	Nordeste
NCCLS	<i>National Commitee for Clinical Laboratory Standards</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PABA	Ácido para-aminobenzóico
PAS	Periódico ácido de Schiff
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RMF	Região Metropolitana de Fortaleza
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SE	Sudeste
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SMX/TMP	Sulfametoxazol/trimetoprim
SNC	Sistema nervoso central
TARV	Terapia antiretroviral
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VRZ	Voriconazol
WFCC	<i>World Federation of Culture Collections</i>
ZCIT	Zona de Convergência Intertropical

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	Os aspectos históricos da histoplasmose.....	18
1.2	<i>Histoplasma capsulatum</i>: as características gerais.....	22
1.2.1	A taxonomia do <i>Histoplasma capsulatum</i>	22
1.2.2	A morfologia do <i>Histoplasma capsulatum</i>	22
1.3	A ecologia e a distribuição geográfica da histoplasmose.....	26
1.4	Os fatores ambientais que podem estar envolvidos com a patogenia da histoplasmose.....	28
1.5	A patogenia da histoplasmose.....	30
1.6	Os aspectos clínicos da histoplasmose.....	32
1.6.1	Infecção primária assintomática.....	33
1.6.2	Histoplasmose pulmonar aguda.....	34
1.6.3	Histoplasmose pulmonar crônica.....	37
1.6.4	Histoplasmose disseminada.....	38
1.7	A histoplasmose e a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS)	41
1.8	O diagnóstico laboratorial da histoplasmose.....	45
1.9	O tratamento da histoplasmose.....	51
1.9.1	O tratamento da histoplasmose pulmonar aguda.....	51
1.9.2	O tratamento da histoplasmose pulmonar crônica.....	51
1.9.3	O tratamento da histoplasmose disseminada.....	52
1.10	A profilaxia da histoplasmose.....	53
1.11	Os agentes antifúngicos utilizados no tratamento da histoplasmose.....	54
1.11.1	Anfotericina B.....	54
1.11.2	Derivados azólicos.....	55
1.11.3	Esquinocandinas.....	57
1.12	Sulfametoxazol-trimetoprim: antimicrobiano com potencial para uso na terapêutica antifúngica.....	58
1.13	Os testes de sensibilidade antifúngica <i>in vitro</i>.....	59
2	PERGUNTAS DE PARTIDA.....	64
3	HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....	65
4	OBJETIVOS.....	66

4.1	Objetivo Geral.....	66
4.2	Objetivos Específicos.....	66
5	METODOLOGIA.....	67
5.1	O desenho e o local de realização do estudo.....	67
5.2	Os aspectos éticos.....	68
5.3	A população do estudo.....	68
5.3.1	Os grupos de estudo.....	68
5.3.2	Os critérios de inclusão.....	68
5.3.3	Os critérios de exclusão.....	69
5.3.4	A coleta dos dados clínicos.....	69
5.4	As amostras clínicas.....	70
5.4.1	A metodologia de transporte desde o HSJ até o CEMM.....	70
5.5	As cepas de <i>H. capsulatum</i> estudadas.....	70
5.5.1	A caracterização macro e micromorfológica das cepas	70
5.5.2	Estocagem e processamento das cepas de <i>H. capsulatum</i>	71
5.6	O teste de sensibilidade a antifúngicos <i>in vitro</i>.....	72
5.6.1	Preparação do inóculo para teste de sensibilidade antifúngica.....	72
5.6.2	Drogas antimicrobianas.....	73
5.6.3	Teste de sensibilidade <i>in vitro</i>	74
5.7	Controle de qualidade.....	75
5.8	Análise ambiental.....	75
5.9	Análise estatística.....	76
6	RESULTADOS.....	77
6.1	Características gerais da população estudada.....	77
6.2	Características clínicas da população estudada.....	80
6.3	Características laboratoriais da população estudada.....	82
6.3.1	Exames hematológicos e radiológicos.....	82
6.3.2	Diagnóstico micológico.....	85
6.4	Características do tratamento e evolução.....	86
6.5	Aspectos ambientais.....	87
6.6	Teste de sensibilidade antimicrobiana <i>in vitro</i> de cepas de <i>H. capsulatum</i> ante a antifúngicos.....	89
6.7	Teste de sensibilidade antimicrobiana <i>in vitro</i> de cepas de <i>H. capsulatum</i> ante combinação sulfametoxazol-trimetoprim (SMX-TMP).....	90

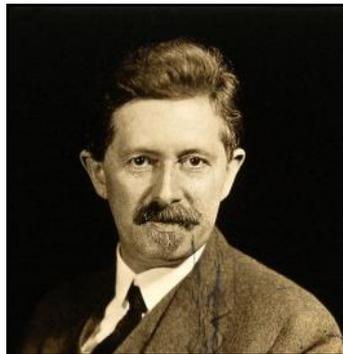
7	DISCUSSÃO.....	93
8	CONCLUSÕES.....	115
	REFERÊNCIAS	116
	APÊNDICE A.....	133
	APÊNDICE B	140
	APÊNDICE C.....	143

1 INTRODUÇÃO

1.1 Os aspectos históricos da histoplasmose

A histoplasmose, também conhecida como doença de Darling, doença das cavernas, reticuloendoteliose e histoplasmose capsulata, inicia sua história em 1905, quando Samuel Taylor Darling (Figura 1), patologista dos Estados Unidos, trabalhando para o exército do seu País, durante a construção do Canal do Panamá, realizou necropsia em um carpinteiro de 27 anos de idade, com suspeita de calazar. Este havia apresentado quadro clínico de febre irregular, hepatoesplenomegalia acentuada, associado a progressiva anemia e leucopenia. Darling observou, em cortes histológicos dos pulmões, baço e fígado, a presença de numerosas estruturas intracelulares, em histiócitos, de formato redondo ou oval, semelhantes a protozoários do gênero *Leishmania*, mas parecendo conter uma cápsula. No ano seguinte, dois novos casos fatais, com quadro semelhante, foram diagnosticados, configurando-se em uma nova doença, que, segundo Darling, era causada por um protozoário, o qual denominou *Histoplasma capsulatum* (LACAZ *et al.*, 2002).

Figura 1 - Samuel Taylor Darling (1872-1925), patologista dos Estados Unidos, que relatou o primeiro caso de histoplasmose por *Histoplasma capsulatum*, em 1906.



Fonte: www.antimicrobe.org.

Concomitantemente ao achado de Darling, também em 1906, nas Filipinas, R.P.Strong observou microrganismos idênticos ao *H. capsulatum*, em lesão de pele de cavalos com linfangite epizoótica equina, denominando-o de *Cryptococcus farciminosus*, redenominado posteriormente de *Histoplasma farciminosus* (BAUM; SCHWARZ, 1962).

Coube, entretanto, ao pesquisador brasileiro Henrique da Rocha Lima (Figura 2) o reconhecimento desta nova patologia como uma micose, ao comparar, em 1912, o material estudado por Darling, com casos de linfangite epizoótica equina, e esfregaços de sangue de

casos de leishmaniose, verificando que o *H. capsulatum* era mais semelhante morfológicamente a leveduras do que a protozoários (LACAZ *et al.*, 2002).

Figura 2 - Henrique da Rocha Lima (1879-1956), pesquisador brasileiro que demonstrou em 1912 a natureza fúngica do *Histoplasma capsulatum*.



Fonte: www.medbiography.blogspot.com.

Os médicos Dodd e Tompkins, em 1932, diagnosticaram a histoplasmose pela primeira vez em indivíduo vivo, por meio de esfregaços de sangue periférico, quando acompanhavam a evolução clínica de uma criança portadora de anemia e doença febril de etiologia desconhecida, residente no Estado do Tennessee, Estados Unidos da América (EUA). O material foi enviado para De Monbreun, também nos EUA, e este, após isolamento do fungo sob forma filamentosa, em cultura, produziu infecções experimentais em animais de laboratório, observando a sua reversão para a forma leveduriforme, concluindo que o fungo apresentava dimorfismo térmico (LACAZ *et al.*, 2002). Esse mesmo autor descreveu, em 1936, o primeiro caso de histoplasmose naturalmente adquirida em um cão (DANIEL; BAUM, 2002).

Em busca de novas formas de diagnóstico da infecção, Van Pernes *et al.* (1941), utilizaram em teste intradérmico antígeno preparado com base no filtrado de cultura da fase filamentosa do *H. capsulatum*, obtendo positividade em um paciente com histoplasmose, e seus familiares, o que deu início aos inquéritos epidemiológicos com histoplasmina (LACAZ *et al.*, 2002).

Até o ano de 1945, entretanto, apenas 80 casos da doença haviam sido relatados na literatura, sob o conceito de que a histoplasmose era uma doença rara, com mecanismo de transmissão desconhecido, capaz de apresentar disseminação sistêmica e quase sempre fatal (PARSONS; ZARAFONETIS, 1945).

Neste mesmo ano, porém, Christie e Peterson (1945), nos Estados Unidos, estudando indivíduos com diagnóstico de tuberculose e focos de calcificações pulmonares, e com negatividade à prova da tuberculina, observaram positividade no teste intradérmico com

histoplasmina, demonstrando que a histoplasmose podia se manifestar sob formas clínicas benignas. Esse achado também foi ressaltado por Furcolow, que demonstrou ter a histoplasmose manifestações muito semelhantes à tuberculose, e mesmo ser confundida com esta, estimando que muitos pacientes com histoplasmose ocupavam leitos em hospitais para tuberculosos (FURCOLOW; BRASHER, 1956).

A primeira epidemia de histoplasmose foi descrita em 1947, por Cain, Devins e Downing, e, a partir de então, em estudos epidemiológicos, foi demonstrada a elevada prevalência da infecção na região central dos Estados Unidos, correspondendo à região do rio Mississippi, bem como em várias partes do mundo (EDWARDS; BILLINGS, 1971).

Os estudos morfológicos da fase saprofitária do *H. capsulatum* foram realizados por Emmons (1949, 1950), que obteve o primeiro isolamento do fungo, com base em duas amostras de solo dos Estados Unidos, e por Ajello e Zeidberg (1951), que o isolaram em solo rico em dejetos de aves e morcegos. Somente em 1972, porém, foi descrita por Kwon-Chung a fase sexuada do *H. capsulatum*, denominando-a de *Emmosiella capsulata*, redenominada, por McGinnis e Katz, de *Ajellomyces capsulatus* (MCGINNIS; KATZ, 1979).

Histórias interessantes também são contadas, como a “doença misteriosa” que vitimou alguns participantes do grupo que teve acesso ao túmulo do faraó egípcio *Tutankhamon*. Assim, por vários anos, a doença conhecida como “Maldição de *Tutankhamon*” ficou no imaginário popular até que a autópsia dos pulmões de algumas vítimas da “maldição” viria a resolver este famoso enigma, com a identificação do *H. capsulatum* nos pulmões autopsiados (DEAN, 1975; WALDRON, 1985; DEAN, 2002).

O *H. capsulatum* foi isolado pela primeira vez no Brasil em 1939, por Almeida e Lacaz (ALMEIDA; LACAZ, 1939), em um paciente que concomitantemente apresentava cromoblastomicose. E em 1941, no Estado de São Paulo, foi identificado o segundo caso em paciente internado em sanatório para tuberculosos, mas que apresentou a cultura de escarro positiva para histoplasmose (WANKE, 1985).

No mesmo ano, foi relatado por Villela e Madureira Pará o primeiro caso fatal de histoplasmose disseminada no Brasil, em uma criança de três anos, no Estado de Minas Gerais, com a observação, ao exame de fragmentos do fígado, de células retículo-endoteliais parasitadas pelo *H. capsulatum* (LACAZ *et al.*, 2002). Para avaliar a frequência da infecção pelo *H. capsulatum*, o pesquisador Alvimar Carvalho, em 1954, realizou inquérito epidemiológico com histoplasmina na zona urbana do Rio de Janeiro, obtendo 16,4% de positividade em 3653 indivíduos avaliados. Apesar dessa elevada taxa de infecção na

população urbana, Londero e Ramos, em 1978, após revisão de literatura, citaram apenas 34 casos publicados de histoplasmose aguda.

A primeira microepidemia no Brasil foi descrita em 1959, com o relato de 12 crianças, um adulto e um cão, acometidos por histoplasmose, após visita a uma gruta em Paraíba do Sul, município do Estado do Rio de Janeiro (PAULA, 1959). Nesse mesmo Estado, em 1986, foi realizado o primeiro isolamento do *H. capsulatum* em animais silvestres assintomáticos, capturados em Rio da Prata, região periurbana do Município do Rio de Janeiro (ZANCOPÉ-OLIVEIRA; WANKE, 1986), com determinação do índice de contaminação do solo nessa região, semelhante aos níveis observados em áreas endêmicas de histoplasmose nos Estados Unidos (ZANCOPÉ-OLIVEIRA; WANKE, 1987). Nesse Estado, já foram relatadas mais de 18 microepidemias, o que o faz detentor da maioria dos casos relatados no Brasil de histoplasmose aguda, apesar de a histoplasmose ser observada em todas as regiões brasileiras, tanto em seres humanos como em animais (NAIFF *et al.*, 1996; AIDÉ, 2009).

O *H. capsulatum* foi isolado do solo em diferentes estados no Brasil (Bahia, São Paulo, Minas Gerais, Brasília, Mato Grosso e Rio Grande do Sul) (SILVA, 1956; FAVA NETTO, 1967; ARAUJO, 1970; SCHMIDT; MACHADO; GALVÃO, 1973; MORAES; ALMEIDA, 1976; SEVERO *et al.*, 1986; ZANCOPE-OLIVEIRA; WANKE, 1987; LONDERO; WANKE, 1988).

No Estado do Ceará, foram realizados quatro inquéritos epidemiológicos utilizando a histoplasmina em intradermoreação, sendo o primeiro em 1986 por Coêlho, Gadelha e Câmara, em 39 indivíduos, obtendo 23,7% de positividade na leitura de 48 horas.

Diógenes *et al.* (1990) realizaram inquérito com 138 indivíduos, na Serra de Pereiro, Ceará, obtendo 61,5% de positividade (DIÓGENES *et al.*, 1990), e, dois anos depois, Alencar, Augusto Borges e Diógenes obtiveram, na cidade de Aracati, Ceará, em amostra com 316 participantes, 87,34% de positividade (ALENCAR; AUGUSTO BORGES; DIÓGENES, 1992). Mapurunga *et al.* (1990), estudaram os casos de micoses profundas diagnosticadas no período de janeiro de 1983 a dezembro de 1988, no Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Ceará, obtendo apenas um caso de histoplasmose (MAPURUNGA *et al.*, 1990). Em inquérito soropidemiológico de paracoccidiodomicose e histoplasmose infecção realizado na cidade de Palmácia, Ceará, por Façanha *et al.* (1991), obtiveram 38,93% de positividade a histoplasmina. Daher *et al.* (2007) publicaram estudo retrospectivo, realizado de janeiro de 1995 a janeiro de 2004, no Hospital São José de

Doenças Infecciosas. Foram comparados os dados clínicos e laboratoriais de 378 pacientes, consistindo em 164 com histoplasmose disseminada e 214 pacientes com outras doenças oportunistas, demonstrando assim, elevada frequência da histoplasmose disseminada com altas taxas de óbito no Estado do Ceará.

Com o advento da AIDS, no início da década de 1980, houve aumento no número de casos de histoplasmose disseminada associada a esta patologia, o que levou o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), em 1985, a incluir a histoplasmose entre as doenças definidoras de AIDS, em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (CDC, 1987).

1.2 *Histoplasma capsulatum*: características gerais

1.2.1 A taxonomia do *Histoplasma capsulatum*

O fungo *H. capsulatum* é um organismo eucarionte pertencente ao Reino Fungi, e encontra-se na divisão (filó) Ascomycota, classe Eurotiomycetes, ordem Onygenales, família Ajellomycetaceae, gênero *Histoplasma* (*Ajellomyces*), espécie *Histoplasma capsulatum*, cuja forma teleomórfica denomina-se *Ajellomyces capsulatus* (UNTEREINER *et al.*, 2004).

Foram identificadas três formas assexuadas do *H. capsulatum*, subclassificadas em três variedades: *H. capsulatum* var. *capsulatum*, agente etiológico da histoplasmose clássica, de distribuição universal, e que faz cruzamento genético com o *H. capsulatum* var. *duboisii*, agente da histoplasmose africana, restrita a uma parte do Continente africano, e o *H. capsulatum* var. *farcinosum*, que não foi encontrado parasitando o ser humano, mas causa a linfangite epizoótica dos equinos (LACAZ *et al.*, 2002).

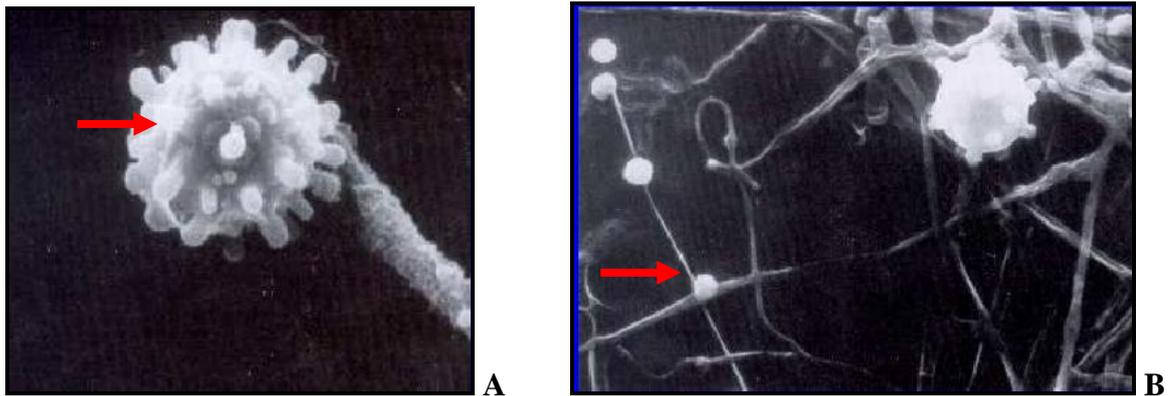
1.2.2 A morfologia do *Histoplasma capsulatum*

Trata-se de um fungo dimórfico, encontrado na forma filamentosa em solos ricos em matéria orgânica, com elevados teores de nitrogênio, e a temperatura ambiente entre 20-30°C, que, quando inalados por mamíferos ou quando cultivados em meios especiais a temperatura de 37°C, transformam-se em leveduras unibrotantes (WANKE; LAZÉRA, 2004).

Durante a fase filamentosa do ciclo biológico, o fungo cresce formando hifas hialinas septadas e ramificadas (diâmetro de 1-2,5 µm). Como estrutura de propagação

assexuada, apresenta dois tipos de conídios localizados lateralmente ou nas extremidades terminais das hifas, os macroconídios e os microconídios (Figura 3A e 3B) (WANKE; LAZÉRA, 2004).

Figura 3 - *Histoplasma capsulatum* à microscopia eletrônica: A – Macroconídio com projeções apendiculares, semelhantes a tubérculos, conhecidos como macroconídios tuberculados ou corpos mamilonados, com diâmetro de 8-14 μ m; B – Microconídio, estruturas ovaladas, com paredes lisas que apresentam diâmetro de 2-5 μ m.



Fonte: Hoog *et al.* (2000).

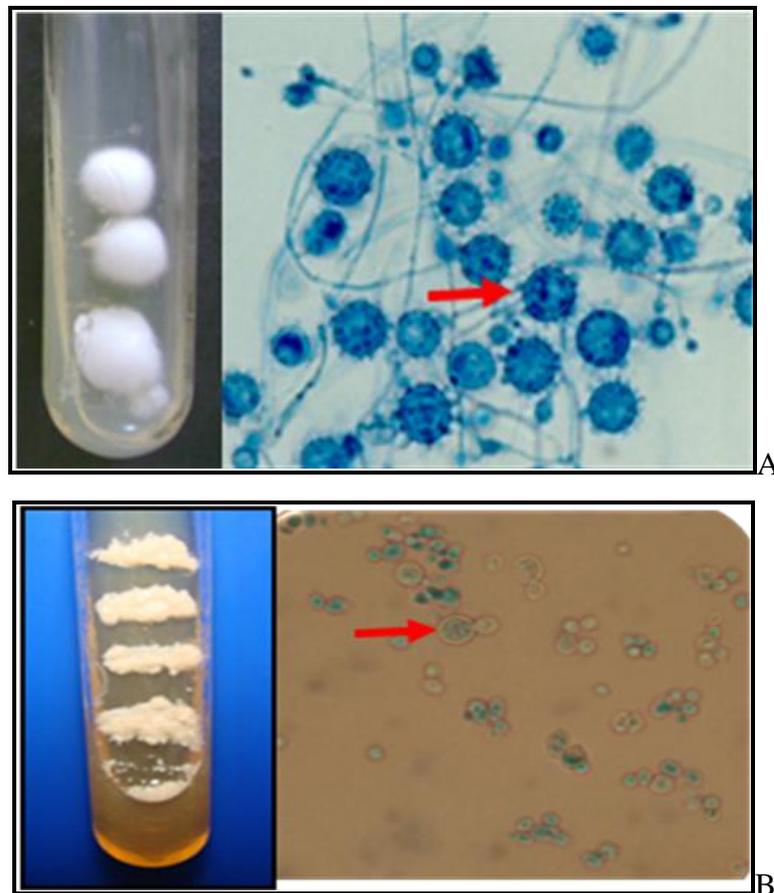
Os macroconídios apresentam diâmetro de 8-14 μ m e são redondos, inicialmente de parede lisa, desenvolvem com o envelhecimento da colônia projeções apendiculares, semelhantes a tubérculos, passando a ser conhecidos como macroconídios tuberculados, estalagmosporos ou corpos mamilonados (WANKE; LAZÉRA, 2004).

Os microconídios são estruturas ovaladas, com paredes lisas, e apresentam diâmetro de 2-5 μ m. Os conídios são facilmente destacados, dispersando-se às vezes a grandes distâncias na natureza, e, ao cair em solo favorável, podem dar início à formação de novo micélio (LACAZ *et al.*, 2002; WANKE; LAZÉRA, 2004).

No cultivo em laboratórios de biossegurança nível III, as culturas de *H. capsulatum* podem ser separadas em dois tipos: o A (albina) com hifas aéreas brancas e poucos macroconídios, e o B (*brown*) com hifas esparsas e numerosos macroconídios tuberculados. Em meios de cultura convencionais, observa-se o tipo A, mas, em meios de cultura contendo guano de pássaros ou morcegos, o tipo B é mais visível. Estudos em camundongos não demonstraram diferença na virulência entre esses dois tipos, mas eles diferem quanto a sua capacidade de dispersão e tamanho do inóculo no meio ambiente (EISSENBERG; GOLDMAN, 1991) (Figura 4A e 4B).

Em razão do dimorfismo do *H. capsulatum*, nos tecidos infectados e em meios de cultura a 37°C, o fungo é observado na forma de blastoconídios de leveduras, arredondados ou ovalados, unibrotantes, medindo de 1-3µm de diâmetro, com colônias de aspecto úmido e de coloração branco-amarelada (HOSPENTHAL; ROGERS, 1995; WANKE; LAZÉRA, 2004). O *H. capsulatum* não possui cápsula, mas em tecidos existe uma zona clara ao redor que foi confundida com uma cápsula por Darling (KAUFFMAN, 2007).

Figura 4 - *Histoplasma capsulatum*: A - aspecto macromorfológico em ágar batata dextrose, demonstrando colônia algodonosa branca; aspecto micromorfológico em lactofenol azul de algodão, mostrando os macroconídios tuberculados (estalagmosporos); B – forma leveduriforme a 37°C em ágar-BHI demonstrando colônias de aspecto úmido, coloração branco-amarelada e à microscopia, estrutura leveduriforme com brotamento.



Fonte: UFC/CEMM (2010).

Os eventos que ocorrem durante a transição da fase filamentosa para a leveduriforme sempre foram motivo de curiosidade entre os pesquisadores, e os estudos confirmam que as modificações ocorrentes na estrutura e metabolismo do *H. capsulatum* acontecem paulatinamente ao longo de três estádios, de acordo com a variação na temperatura

de 25° a 37°C. No início do processo, há um declínio progressivo na respiração e na síntese de proteínas e RNA (estádio 1). Entre 24 e 40h, a célula entra em um período de latência (estádio 2) que dura de quatro a seis dias. Nesse estágio, acontecem níveis muito baixos de respiração e forte inibição da síntese de proteínas e RNA. A cisteína exógena e outros compostos sulfidrílicos são necessários durante o estágio 2 para reativar a respiração mitocondrial. O estágio 3 é caracterizado pelo aumento nas concentrações dos componentes, recomeço da respiração normal, indução da cisteína oxidase específica da fase leveduriforme e conclusão da transição para a morfologia de levedura. A transição morfológica pode ser vista, assim, como um choque térmico pelo calor, seguido de adaptação celular a temperatura elevada (RAPPEYE, 2010).

O termodimorfismo é considerado um dos principais fatores de virulência do *H. capsulatum*, mas ele possui vários deles que permitem seu crescimento nas condições adversas oferecidas pelo hospedeiro, propiciando o estabelecimento da relação parasitária e contribuindo no processo de doença. Esses fatores auxiliam na aderência, colonização, disseminação e habilidade do fungo para resistir ao ambiente hostil dentro dos macrófagos e escapar dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro. Dentre os fatores de virulência do *H. capsulatum*, pode-se mencionar, além do dimorfismo, como já expresso, a termotolerância, composição da parede celular, presença de moléculas de adesão e capacidade de evasão das defesas do organismo (sobrevivência intracelular e multiplicação, imunossupressão induzida por antigenemia e interferência com a atividade fungicida dos fagócitos) (KUROKAWA; SUGIZAKI; PERAÇOLI, 1998).

Quanto à termotolerância, estudos demonstram que cepas de *H. capsulatum* pouco virulentas necessitam de mais tempo para realizar a transformação completa da forma micelial para leveduriforme, na temperatura de 37°C, enquanto as cepas mais virulentas realizam essa passagem de maneira mais rápida e são mais resistentes a variações drásticas na temperatura (KUROKAWA; SUGIZAKI; PERAÇOLI, 1998).

Quanto à composição da parede celular, foi observado que a presença de α -1,3-glucana na parede celular do *H. capsulatum* na fase leveduriforme confere-lhe maior rigidez e resistência ao metabolismo oxidativo dos fagócitos. Também foi demonstrado que as cepas apresentando o pigmento melanina em sua parede celular exibem maior resistência a antifúngicos, como anfotericina B (VAN DUIN; CASADEVALL; NOSANCHUK, 2002; TABORDA *et al.*, 2008).

Outro mecanismo de virulência são as moléculas de adesão, que parecem estar associadas com a instalação, replicação e disseminação do fungo no hospedeiro, assim como

estão relacionadas com o estímulo ao estresse oxidativo ou síntese de citocinas pelas células fagocíticas (CASADEVALL, 2007).

A interferência com a atividade fungicida dos fagócitos é um mecanismo de evasão das defesas do organismo, atuando por meio da ligação com os receptores CD18 dos fagócitos e inibindo a liberação de espécies reativas de oxigênio tóxicas para o fungo. Outro mecanismo é a modulação do pH lisossomal, pois, apesar de a fusão fagolisossomo ocorrer, o *H. capsulatum* resiste ou inativa a atividade fungicida dos lisossomos. Desta forma, os macrófagos fornecem um microambiente para o fungo crescer e facilitam sua disseminação para outros tecidos. Outras células podem também facilitar essa disseminação, como as células epiteliais alveolares e as células endoteliais (VAN BURIK; MAGEE, 2001).

O sequestro do ferro realizado por macrófagos ativados pelo IFN- γ , com diminuição do transporte do íon para o interior da célula, é um dos mecanismos de defesa do hospedeiro contra a infecção pelo *H. capsulatum*, pois a quelação do ferro inibe o crescimento do fungo nos macrófagos. O *H. capsulatum*, entretanto, pode manipular o pH dos fagolisossomos, possibilitando o aumento na capacidade do organismo em adquirir ferro, e, além disso, o fungo secreta sideróforos e produz compostos redutores do ferro que facilitam a captura do ferro de fontes do hospedeiro *in vitro* (SZYMCZAK; DEEPE; WINTERS, 2008).

1.3 A ecologia e a distribuição geográfica da histoplasmose

O *H. capsulatum* é um fungo saprófita do solo, encontrado em regiões de climas tropical, subtropical ou temperado, principalmente na área compreendida entre 45° de latitude norte e 30° de latitude ao sul do Equador, com temperatura média anual entre 20-30°C, índice pluviométrico de 1000 mm e umidade relativa do ar acima de 90% (LACAZ *et al.*, 2002; NEGRONI, 2003). Os conídios são muito resistentes a condições adversas, como temperaturas e umidades baixas, mas sensíveis a temperaturas superiores a 40°C, necessitando que a umidade do ar esteja elevada para se desprenderem das hifas (WANKE, 1985).

Foram descritas microepidemias após exploração de cavernas, limpezas de galinheiro e sótãos, demolições de construções antigas, acampamentos, desflorestamentos e durante atividades ocupacionais ou recreativas, em que há revolvimento de solo, principalmente quando enriquecidos por dejetos e guanos de aves e morcegos, com elevado teor de compostos nitrogenados (ureia, creatinina e ácido úrico) e fósforo (SHIMAMOTO *et al.*, 2007).

O *H. capsulatum* cresce na faixa de pH entre 5 e 10, sendo, entretanto, mais isolado em solos com pH ácido (o que pode inibir microrganismos competidores), e até 60 cm de profundidade, sendo observado que solos contaminados podem ser potencialmente infecciosos por anos (ZEIDBERG; AJELLO; WWEBSTER, 1955). Nunca se comprovou, porém, a contaminação de solo por meio do enterro de animais infectados pelo *H. capsulatum* (GOODWIN; LOYD; DES PREZ, 1981).

As aves são colonizadas, mas não desenvolvem nem transmitem a doença, porque sua elevada temperatura corporal (39 a 40°C) inibe o crescimento do fungo, mas suas fezes contribuem para o enriquecimento do solo (WANKE, 1985). Já os morcegos tanto fornecem matéria orgânica para enriquecer o solo, como também são passíveis de adquirir a infecção, eliminando partículas viáveis do fungo em seus dejetos, possibilitando a disseminação do fungo de um local a outro (WANKE; LAZÉRA, 2004).

O *H. capsulatum* já foi isolado de vísceras de quirópteros, cães, gatos, ratos e marsupiais de vida silvestre (SILVA-VERGARA *et al.*, 2001), e inquéritos epidemiológicos revelaram que 50% dos cães e gatos abrigam esta espécie fúngica (ALVES, 1996; LACAZ *et al.*, 2002; ZANCOPE-OLIVEIRA; WANKE, 1986), podendo servir como indicador da presença do fungo em determinada área geográfica (WANKE, 1985).

A histoplasmose é uma doença cosmopolita, tendo sido descritos casos autóctones de histoplasmose clássica em cerca de 60 países nos diversos continentes, com maior frequência nos Continentes Africano e Americano, neste estendendo-se desde o sul do Canadá até as regiões centrais da Argentina (ZANCOPE-OLIVEIRA; WANKE, 1987). Na América do Norte, as áreas de maior endemicidade da doença são as regiões centrais dos Estados Unidos, principalmente as localizadas ao longo dos rios Mississipi, Ohio e Missouri. Na América Latina, as áreas de maior prevalência estão na Venezuela, Equador, Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina (GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPE-OLIVEIRA, 2006), e, na América Central, Porto Rico, El Salvador, Costa Rica e República Dominicana. São também descritos casos no sudeste asiático, África e Europa (UNIS; OLIVEIRA; SEVERO, 2004).

Nos Estados Unidos, estima-se que cerca de 40 milhões de pessoas estão infectadas pelo *H. capsulatum*, com 500.000 novos casos todo ano (KUROWSKI; OSTAPCHUK, 2002) e inquéritos epidemiológicos com histoplasmina demonstraram que 80% dos adultos jovens que residem nos Estados às margens dos rios Mississipi e Ohio foram infectados pelo *H. capsulatum* (KAUFFMAN, 2006).

Em inquérito epidemiológico realizado no ano de 2005, observou-se que, no Brasil, a prevalência de reatores positivos a intradermorreação com histoplasmina varia de 2,6

a 93,2%, dependendo da região, necessitando, desta forma, de condutas regionais específicas para atenção aos cuidados de prevenção, diagnóstico e tratamento (LEIMANN *et al.*, 2005).

Do ponto de vista geográfico, a capacidade de o *H. capsulatum* adaptar-se ao ambiente externo possibilita sua distribuição em várias regiões, com múltiplas cepas ou variantes com fenótipos distintos, que se apresentam sob condições favoráveis à sua sobrevivência, mas muitas vezes desfavorável à de outros microrganismos. Essas variações também concorrem para que algumas cepas sejam mais virulentas do que outras, tanto em relação à infectividade quanto na persistência no interior dos macrófagos, interferindo na apresentação clínica da histoplasmose (EISSENBERG; GOLDMAN, 1991).

No Brasil, de acordo com a Portaria nº 5, de 21 de fevereiro de 2006, a histoplasmose não se encontra na lista de doenças de notificação compulsória, ficando difícil o mapeamento da real distribuição deste processo infeccioso, apesar de estar incluído no item que se refere à agregação ou surto de casos ou de óbitos por agravos inusitados (BRASIL, 2006).

1.4 Os fatores ambientais que podem estar envolvidos com a frequência da histoplasmose

Existem poucos estudos acerca dos impactos ambientais e socioeconômicos das mudanças climáticas no Brasil, com poucas informações sobre os riscos em relação a saúde e manejo das doenças. O clima pode influenciar patógenos e vetores, e a variabilidade climática demonstra um impacto nas doenças infecciosas, com aumento na transmissão das infecções correlacionadas com o *El Nino*, como a dengue e doenças respiratórias, no Nordeste (EPSTEIN, 2001; ANYAMBA *et al.*, 2006).

O *El Niño* e a *La Nina* são alterações na distribuição da temperatura da superfície da água do oceano Pacífico, com profundos efeitos no clima da Terra (HURTLEY, 2009). São eventos que modificam o sistema de flutuação das temperaturas daquele Oceano, chamado fenômeno *El Nino* de Oscilação Sul (ENOS), que ocorrem periodicamente a cada dois a sete anos, tratando-se de uma associação com as variações nos padrões da pressão atmosférica e ventos que atravessam os oceanos Índico e Pacífico. É um fenômeno climático único na sua força, previsibilidade e influência global, projetando-se a partir do oceano Pacífico por meio de teleconexões atmosféricas (alterações climáticas simultâneas em regiões distantes produzidas por trocas de circulação atmosférica) que afetam os padrões físicos, biológicos, químicos e geológicos dos oceanos, atmosfera e superfície terrestre em todo o mundo (ZELL,

2004; MCPHADEN; ZEBIAK; GLANTZ, 2006). Os eventos do *El Niño* ocorrem por milênios, mas só foram reconhecidos no século XIX no Peru, com a observação de baixas capturas de peixes, ocorrência de temperaturas mais altas do que o normal nas águas da costa do Peru e Equador na época próxima ao Natal, sendo o evento denominado *El Niño*, em referência a Jesus Cristo (KOVATS *et al.*, 2003) (Quadro 1).

QUADRO 1 - Registro da ocorrência dos eventos *El Niño* e *La Niña* de 2000 a 2010

Anos de ocorrência do <i>El Niño</i>	Anos de ocorrência da <i>La Niña</i>
-	2000-2001
2002-2003	-
2004-2005	-
-	início 2006
2006-2007	-
-	2007-2009
2010	

Fonte: Adaptado de Ashok e Yamagata (2009).

Durante um ano “normal”, ou seja, sem a existência do fenômeno *El Niño*, os ventos alísios sopram na direção oeste através do oceano Pacífico tropical, originando um excesso de água no Pacífico ocidental, de tal modo que a superfície do mar é cerca de meio metro mais alta nas costas da Indonésia do que no Equador. Isto provoca a ressurgência de águas profundas, mais frias e carregadas de nutrientes na costa ocidental da América do Sul, que alimentam o ecossistema marinho, promovendo imensas populações de peixes. Quando acontece um *El Niño*, os ventos sopram com menor força em todo o centro do oceano Pacífico, resultando numa diminuição da ressurgência de águas profundas e na acumulação de água mais quente do que o normal na costa oeste da América do Sul e, conseqüentemente, na diminuição da produtividade primária e das populações de peixes (KOVATS *et al.*, 2003).

Pensa-se que este fenômeno é acompanhado pelo deslocamento de massas de ar no plano global, provocando alterações do clima em todo o mundo (MCPHADEN; ZEBIAK; GLANTZ, 2006), com estudos correlacionando o *El Niño* com a diminuição da precipitação de chuvas no Nordeste brasileiro (ACEITUNO, 1988; ROGERS, 1988; ROPELEWSKI; HALPERT, 1989).

O fenômeno *La Niña*, oposto ao *El Niño*, corresponde ao resfriamento anômalo das águas superficiais do oceano Pacífico Equatorial Central e Oriental, formando uma “piscina de águas frias” nesse oceano (KERR, 2005), entretanto nenhum serviço meteorológico consegue prever quando a *La Niña* surge (KERR, 2003).

À semelhança do *El Niño*, porém apresentando maior variabilidade do que este, a *La Niña* é um fenômeno natural que produz intensas mudanças na dinâmica geral da atmosfera, alterando o comportamento climático. Nele, os ventos alísios mostram-se mais intensos do que o habitual e podem vir a favorecer a ocorrência de chuvas acima da média sobre o semiárido do Nordeste. De modo geral, os anos do *El Niño* são quentes e os da *La Niña* são frios (RICKABY; HALLORAN, 2005).

Comrie (2005) demonstrou correlação entre casos de coccidioidomicose e *El Niño* e Barrozo *et al.* (2010) entre esse mesmo evento e casos de paracoccidioidomicose.

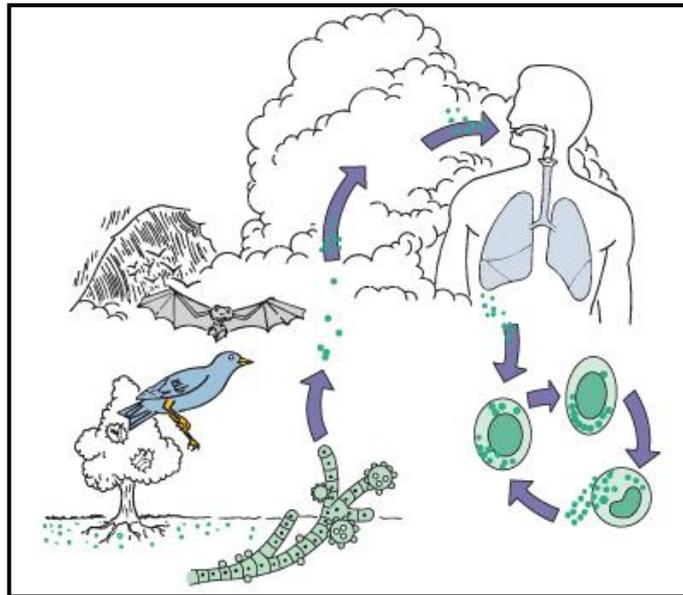
1.5 A patogenia da histoplasmose

Dentre as 1407 espécies patógenas humanas, 317 são fungos e, desses, 22(7%) estão classificados como emergentes ou reemergentes (WOOLHOUSE; GOWTAGE-SEQUERIA, 2005). A histoplasmose configura-se entre as doenças emergentes, entendendo-se como doenças novas, reemergentes ou infecções resistentes a medicamentos cuja incidência aumentou nas últimas duas décadas, ou cuja incidência ameaça aumentar. Foram identificados alguns fatores que influenciam na emergência de doenças infecciosas, muitos deles relacionados ao crescimento da suscetibilidade da população a doenças infecciosas ou aumento na exposição ou transmissão dos agentes infecciosos. A emergência de doenças é geralmente consequência de mudanças sociais ou tecnológicas, sendo frequentemente inesperada ou imprevisível, e a emergência de um agente específico resulta de uma complexa interação de fatores que variam de acordo com a área geográfica onde o fato ocorreu. Os fatores mais importantes que influenciam a suscetibilidade das populações são as doenças imunossupressoras (AIDS, doenças linfoproliferativas, diabetes, doenças autoimunes ou uso de imunossupressores). Os avanços da Medicina para o tratamento de doenças e prolongamento da vida, como a quimioterapia para o tratamento de malignidades, as unidades de terapia intensiva e os transplantes de órgão, com o consequente aumento da população de idosos, também contribuem na emergência de velhas e novas doenças. O comportamento humano criou outras oportunidades de se expor a patógenos, por meio de atividades laborativas e recreacionais (como arqueologia e espeleologia), viagens e interferências diretas no ambiente (construções). O uso indiscriminado de antibióticos concorre para o aumento da resistência bacteriana e fúngica, como no caso de algumas espécies de *Candida* (COHEN, 2000). As micoses são responsáveis por aproximadamente 7-8% das infecções nosocomiais e

uma importante fonte de morbidade e mortalidade em pacientes oncológicos e transplantados (HOSPENTHAL; ROGERS, 1995).

Os indivíduos contraem a histoplasmose mediante a inalação de fragmentos de hifas e microconídios que alcançam os alvéolos, onde são fagocitados por macrófagos alveolares ou neutrófilos, invadindo posteriormente os linfonodos hilomediastinais e disseminando-se pela corrente sanguínea (NOSANCHUK; GRACSER, 2008) (Figura 5).

Figura 5 - Ciclo biológico do *H. capsulatum*.



Fonte: Murray, Rosenthal e Pfaller (2006).

Após a inalação e deposição dos conídios nos espaços alveolares, eles devem se converter à forma leveduriforme para exercer sua patogenicidade. O tempo de conversão de conídios para leveduras pode variar de horas a dias, dependendo da variação da temperatura e do microambiente em que se encontram, sendo que, após a fagocitose pelos macrófagos e células reticuloendoteliais, a forma leveduriforme replica em aproximadamente 15-18 horas e, apesar da fusão dos lisossomos, a multiplicação continua nos fagolisossomos. As leveduras se multiplicam e são transportadas para os linfonodos hiliares e mediastinais, onde ganham acesso à circulação sanguínea para disseminação a vários órgãos (GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPE-OLIVEIRA, 2006).

Cerca de 10-14 dias após a exposição, a imunidade celular se desenvolve, e, em indivíduos imunocompetentes, é capaz de eliminar o fungo, desenvolvendo necrose nos sítios de infecção dos pulmões, linfonodos, fígado, baço e medula óssea, com produção de material caseoso, fibrose, deposição de cálcio e, em poucos anos após a infecção primária, granulomas

calcificados (KUROWSKI; OSTAPCHUK, 2002). A infecção pulmonar não confere imunidade protetora, podendo ocorrer reinfecção (ROSSINI; GOULART, 2006).

O controle da infecção depende, principalmente, da imunidade celular por meio dos linfócitos CD4, e suas citocinas e ativação de macrófagos (imunidade tipo TH1) com aumento na interleucina 12 (IL-12), interferon (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (TOBÓN *et al.*, 2005). Os linfócitos T CD4 reconhecem os antígenos da parede celular fúngica e proteínas do choque térmico e secretam interferon gama (IFN- γ), que ativa os macrófagos com produção de TNF- α para o estímulo de outros macrófagos. Se a resposta imune é adequada, ocorre intensa reação granulomatosa, seguida de cicatrização, fibrose e calcificação. Se não for controlada, a infecção pode alcançar os gânglios mediastinais, corrente sanguínea e outros órgãos do sistema monocítico-histiocitário, como fígado e baço (ROSSINI; GOULART, 2006). Ao se ligar à glicoproteína da superfície celular de células CD11b, o *H. capsulatum* inibe a produção de interleucina 12 (IL-12) pelos macrófagos, resultando na ausência ou resposta incompleta TH 1 (CUTLER; DEEPE; KLEIN, 2007).

1.6 Os aspectos clínicos da histoplasmose

Os fatores de risco para os indivíduos desenvolverem histoplasmose são as doenças imunossupressoras, como a AIDS, uso de terapias imunossupressoras, comprometimento da imunidade celular geneticamente adquirido, neoplasias malignas e hematológicas, diálise, os extremos de idade (crianças e idosos) e transplantes (em razão da capacidade de o *H. capsulatum* permanecer latente nos tecidos, ele pode ser transmitido em órgãos doados) (KAUFFMAN, 2009).

A reativação endógena de focos de histoplasmose aumentou em pacientes em uso de medicamentos anticitocinas, especialmente inibidores de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), como o etanercept (Enbrel®), infliximab (Remicade®), e adalimumab (Humira®) (NOSANCHUK; GRACSER, 2008; KAUFFMAN, 2009).

As formas primárias da doença e as reinfecções não têm predileção quanto à raça e ao sexo, enquanto as formas mais graves ocorrem, principalmente, em pacientes de menos de um ano ou em maiores de 50 anos de idade (WANKE; LAZÉRA, 2004). Não existe evidência de que a histoplasmose é mais grave na gravidez ou que ocorre disseminação para o feto (WHEAT *et al.*, 2000b).

O período de incubação da doença é de 3 a 14 dias na primoinfecção e de três a sete dias na reinfecção, após os quais a histoplasmose apresenta-se com amplo espectro de

manifestações clínicas, desde infecção assintomática a doença grave e disseminada, dependendo da magnitude da exposição (número de partículas fúngicas inaladas), estado imunológico do hospedeiro e virulência da cepa infectante, indicando que fatores ambientais e genéticos controlam as manifestações da doença (GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, 2006; AIDE, 2009). Assim, em indivíduos saudáveis, a exposição a uma carga leve de inóculo, comumente, causa infecção assintomática ou pouco sintomática, geralmente autolimitada, mas, em exposição a um grande número de partículas fúngicas, pode-se desenvolver enfermidade pulmonar grave com evolução para insuficiência respiratória e óbito (WHEAT *et al.*, 2000a). É observado que 20% dos casos de histoplasmose grave resultam de um inóculo pesado em pessoas saudáveis (KUROWSKI; OSTAPCHUK, 2002).

1.6.1 Infecção primária assintomática

Em áreas endêmicas, 90-95% das infecções primárias por *H. capsulatum* não são reconhecidas ou detectadas, e esses casos assintomáticos, geralmente, são identificados por exames sorológicos antes de transplantes ou durante inquéritos epidemiológicos (GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, 2006).

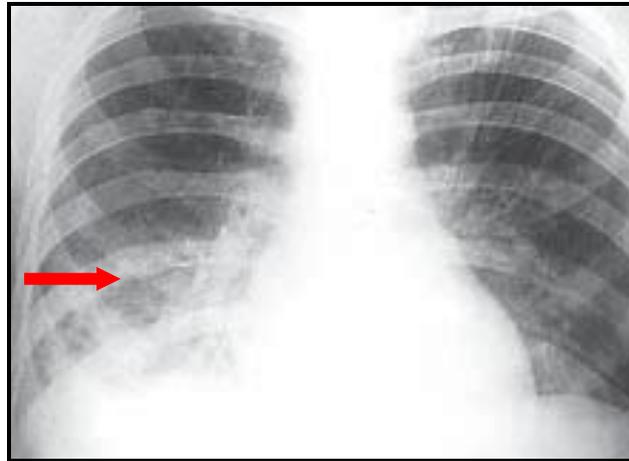
Os casos de histoplasmose pulmonar subaguda resultam da infecção por pouco inóculo, observando-se quadro clínico semelhante a um estado gripal com tosse seca, febre e adinamia, que ocorrem semanas após a exposição, demonstrada ao exame radiológico por infiltrado reticulonodular bilateral, adenopatia hilar e mediastinal, e raramente cavitação ou nódulos pulmonares solitários, mas a radiografia do tórax também pode ser normal. Quando a adenopatia hilar é unilateral, os achados são indistinguíveis do complexo primário da tuberculose (KUROWSKI; OSTAPCHUK, 2002).

1.6.2 Histoplasmose pulmonar aguda

É a forma pulmonar observada em 85-100% dos pacientes (WHEAT *et al.*, 2000a) e, nos casos em que existe imunidade celular instalada por exposição prévia, ocorrem diminuição na incidência e gravidade dos sintomas de febre, cefaleia, tosse não produtiva, calafrios, dor torácica do tipo pleurítica, perda de peso, mialgias e sudorese (MUKHERJEE *et al.*, 2010). Com um inóculo maior, os pacientes podem apresentar sintomas mais graves com dispneia e hipóxia. As manifestações sistêmicas detectadas ao exame físico são hepatoesplenomegalia, adenopatia, eritema nodoso e eritema multiforme. O exame

radiológico demonstra uma pneumonite com infiltrado intersticial difuso e em alguns casos se observam mudanças no padrão radiológico com poucas ou múltiplas cavidades nos lóbulos inferiores dos pulmões, adenopatia hilar e mediastinal e, nas infecções mais graves, nódulos pulmonares difusos (Figura 6) (ROSSINI; GOULART, 2006). Na maioria dos casos, ocorre melhora do quadro em duas semanas, e, em outros, os sintomas e sinais podem perdurar por mais de seis semanas, mas em alguns pacientes a fadiga pode permanecer por meses (ROSSINI; GOULART, 2006).

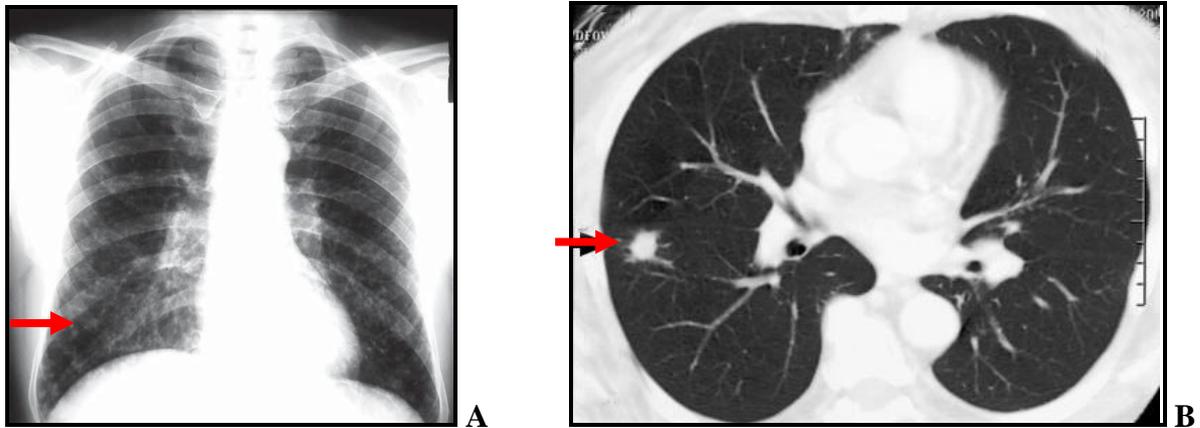
Figura 6 - Radiografia do tórax, com infiltrado intersticial difuso, com predomínio paracardíaco direito.



Fonte: Cruz *et al.*(2006).

A infecção pulmonar pode se estender aos linfonodos mediastinais com formação de múltiplos nódulos e necrose caseosa (granuloma mediastinal ou mediastinite granulomatosa), que pode permanecer por meses a anos, e em alguns casos podem ser visualizadas leveduras de *H. capsulatum*, em material de punção aspirativa dos nódulos (KAUFFMAN, 2007). Esse quadro pode ser assintomático e apenas detectado pela radiografia do tórax, mas também pode ocasionar dor torácica, tosse, hemoptise e dispneia por compressão na veia cava superior, brônquios ou esôfago, com sintomas variando de acordo com a estrutura envolvida. Os nódulos podem drenar espontaneamente para tecidos adjacentes na região cervical, nas vias aéreas, ou dentro do pericárdio. Esse quadro pode evoluir com remissão e calcificação dos linfonodos envolvidos (KAUFFMAN, 2009) (Figura 7A e 7B).

Figura 7 – A. Radiografia de tórax, demonstrando micronódulos difusamente distribuídos em ambos os pulmões; B. Tomografia computadorizada de tórax, demonstrando nódulo pulmonar à direita.



Fonte: Oliveira, Unis e Severo (2006).

A infecção dos linfonodos mediastinais pelo *H. capsulatum*, com fibrose progressiva envolvendo as estruturas do mediastino, chamada de fibrose mediastinal ou mediastinite fibrosante, é uma complicação pouco comum, mas letal, da histoplasmose pulmonar, que acomete adultos jovens, com pequena predominância entre as mulheres, cujas manifestações clínicas podem variar desde quadros assintomáticos, dispneia, tosse, hemoptise e dor torácica, a sintomas da síndrome da veia cava superior ou insuficiência cardíaca direita. Sua evolução é variável dependendo do grau de acometimento e estruturas envolvidas (KUROWSKI; OSTAPCHUK, 2002).

A histoplasmose pulmonar aguda pode se apresentar como um nódulo pulmonar solitário, conhecido como histoplasmoma, que ocorre por estímulo antigênico anormal e persistente, com excessivo depósito de fibra colágena na periferia do nódulo. Trata-se de lesão com necrose ou calcificação no centro, ou ambas, circundada por cápsula fibrótica, cuja ruptura pode causar broncolitíase, sendo importante o diagnóstico diferencial com câncer de pulmão (WANKE; LAZÉRA, 2004).

A broncolitíase ocorre, também, quando um linfonodo calcificado adjacente ao brônquio ulcera dentro do brônquio, causando obstrução, inflamação e subseqüente cicatrização, que pode ser visualizada a tomografia computadorizada do tórax. Ocasiona tosse com ou sem hemoptise até que a massa calcificada seja expelida durante a tosse ou removida por broncoscopia (KAUFFMAN, 2007).

A apresentação da histoplasmose na forma pulmonar aguda abrange manifestações reumatológicas e dermatológicas que ocorrem em 5% dos pacientes, com quadro clínico de artrite simétrica e poliarticular, sem alterações radiológicas, que decorrem

de uma reação à infecção primária, podendo haver resolução espontânea ou após tratamento com agentes anti-inflamatórios (PIETROBONA *et al.*, 2004).

Do ponto de vista dermatológico, o eritema nodoso e o eritema multiforme são as manifestações mais comuns da histoplasmose, ocorrendo mais frequentemente em mulheres jovens e parecem associados à resposta de hipersensibilidade aos antígenos do *H. capsulatum* (KAUFFMAN, 2007) (Figura 8). A histoplasmose cutânea primária é rara e ocorre por inoculação traumática do fungo na pele ou mucosa, apresentando-se com nódulos, úlceras, abscessos ou lesões semelhantes a molusco contagioso (VASUDEVAN *et al.*, 2010).

Figura 8 - Lesões cutâneas (pápulas e nódulos eritematovioláceos) em tronco.



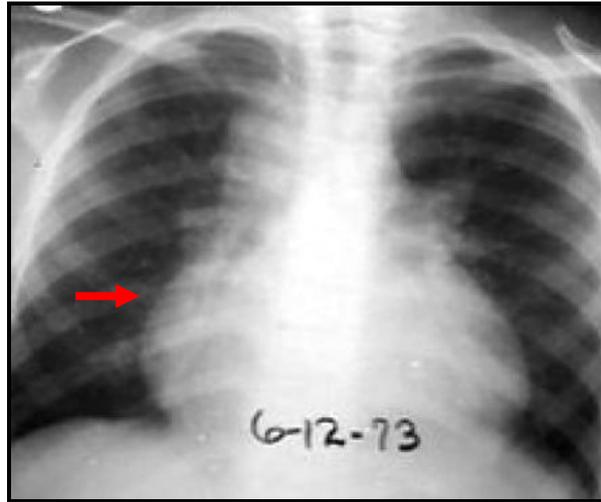
Fonte: Pietrobona *et al.* (2004).

O comprometimento do pericárdio pode cursar com pericardite aguda que ocorre em 5% dos pacientes sintomáticos, sendo causada por uma reação imune à infecção pelo *H. capsulatum* nos linfonodos mediastinais (SCAPELLATO; DESSE; NEGRONI, 1998).

O derrame pleural pode ser um achado concomitante em 40-60% dos pacientes com pericardite, também via reação imune e, desta forma, o fungo é raramente observado à microscopia dos líquidos pericárdico e pleural (KUROWSKI; OSTAPCHUK, 2002).

Cursa com dor torácica e febre semanas a meses após a infecção pulmonar, mas com evolução favorável em longo prazo, apesar do comprometimento hemodinâmico (KUROWSKI; OSTAPCHUK, 2002) (Figura 9).

Figura 9 - Histoplasmose pulmonar aguda com pericardite. A sombra cardíaca está aumentada pela efusão pericárdica, com linfadenopatia paratraqueal.



Fonte: kauffman (2007).

1.6.3 Histoplasmose pulmonar crônica

Está associada a defeito anatômico estrutural ou enfisema centrolobular ou bolhoso, onde há produção de material líquido rico em partículas fúngicas responsáveis pela cronicidade da doença (WHEAT *et al.*, 2000a). As lesões comumente afetam os lóbulos superiores, acarretando diagnóstico errôneo de tuberculose pulmonar primária ou reinfeção, sendo tratada como tal (AIDÉ, 2009).

É observada na relação de um caso para 100.000 indivíduos por ano em áreas endêmicas, ocorrendo mais comumente em homens brancos, com início na terceira década de vida, com sintomas de febre, calafrios, sudorese noturna, adinamia, anorexia, perda de peso, tosse produtiva, hemoptise e dispneia, semelhante aos sintomas da tuberculose, entretanto com menor gravidade do que esta (MUKHERJEE *et al.*, 2010). Há progressão até necrose e perda de tecido pulmonar em virtude da reação hiperimune aos antígenos fúngicos, e não da infecção propriamente dita. A radiografia do tórax revela enfisema pulmonar com bolha apical circundada por bronquiectasia. Pode ocorrer progressivo estreitamento das paredes da cavidade com subsequente necrose e aumento da fibrose, resultando na formação de

cavidades largas e persistentes, com retração do tecido pulmonar adjacente, mas com pouca ou nenhuma adenopatia. Na ausência de tratamento, pode evoluir para insuficiência cardíaca e respiratória, infecções recorrentes e óbito (KANG, *et al.*, 2006).

A fibrose mediastinal é incomum, mas é a complicação tardia mais grave da histoplasmose pulmonar crônica, ocorrendo fibrose e calcificação invasivas em linfonodos, obstrução de vasos sanguíneos e vias aéreas. Em 40% dos casos, é assintomática e o diagnóstico é sugerido pela radiografia do tórax ou tomografia computadorizada com observação de massa mediastinal ou hilar (GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPE-OLIVEIRA, 2006).

1.6.4 Histoplasmose disseminada

É a forma clínica mais grave, em que ocorre intensa multiplicação do fungo nos pulmões e em órgãos extrapulmonares (MUKHERJEE *et al.*, 2010). Tanto pode ser causada pela exposição recente ao *H. capsulatum* ou pela reativação de foco latente endógeno, o que pode ser demonstrado em casos de histoplasmose em área não endêmica, em pacientes que moraram ou visitaram previamente áreas endêmicas (TOBÓN *et al.*, 2005).

A histoplasmose disseminada ocorre em indivíduos imunocomprometidos, especialmente em pacientes com infecção pelo HIV e contagem de linfócitos CD4 menor do que 150 a 200 células/mm³. Os pacientes com neoplasia linforreticular e pacientes em uso de corticosteróides, terapia citotóxica e agentes imunossupressores também apresentam predisposição a histoplasmose disseminada. O espectro da doença disseminada vai desde um curso crônico e intermitente em imunocompetentes a uma infecção aguda e rapidamente fatal, em imunossuprimidos, mas também idosos, e crianças, que, em razão da imaturidade do sistema imune celular, desenvolvem doença grave quando expostos ao *H. capsulatum*. Os sítios de disseminação mais frequente são: fígado, baço, mucosa orofaríngea, gastrointestinal, pele e suprarrenal (WHEAT; KAUFFMAN, 2003).

A histoplasmose disseminada pode ser dividida em quatro subtipos: aguda (tipo infantil), subaguda (tipo juvenil), crônica (tipo adulto) e oportunística (SIDRIM; MOREIRA, 1999; WANKE; LAZÉRA, 2004).

A histoplasmose disseminada aguda ocorre em crianças menores de dois anos de idade, com sintomas iniciais de febre, irritabilidade, fadiga progressiva, perda de peso e tosse, seguidos de diarreia, vômito, linfadenomegalias superficiais e hepatoesplenomegalia. Os exames laboratoriais demonstram anemia, leucopenia e trombocitopenia, e a radiografia do

tórax evidencia lesões sugestivas de pneumonia intersticial. Na ausência de tratamento, evolui para o óbito em duas a cinco semanas (ROSSINI; GOULART, 2006).

No tipo juvenil (histoplasmose disseminada subaguda), ocorrem febre moderada e intermitente, mal-estar, astenia e emagrecimento progressivo, com envolvimento variável de múltiplos órgãos. Apresenta-se como doença ulcerativa intestinal, insuficiência suprarrenal, meningoencefalite, síndrome de compressão medular ou lesões osteolíticas, lesões cutâneas ou subcutâneas, hepatomegalia e esplenomegalia (ROSSINI; GOULART, 2006).

A histoplasmose disseminada crônica ou tipo adulto predomina em indivíduos acima dos 40 anos de idade com sintomas de febre intermitente, astenia, emagrecimento e lesões de orofaringe ou laringe. As lesões podem regredir espontaneamente e reaparecer no mesmo sítio ou em outro após vários anos (ROSSINI; GOULART, 2006).

A histoplasmose na forma oportunística ocorre, principalmente, em áreas endêmicas, associada a doença de Hodgkin, linfossarcoma, leucemia, lupus eritematoso sistêmico, AIDS, transplantados, usuários de corticóides e pacientes em uso de quimioterápicos. Os sintomas são de febre, tosse produtiva ou não, dispneia, infiltrado intersticial difuso, linfadenomegalias hilares e hepatoesplenomegalia, secundários a infecção exógena, reinfeção ou reativação de foco endógeno. Na ausência de tratamento, a doença é rapidamente fatal (ROSSINI; GOULART, 2006).

As lesões cutâneas ocorrem em mais de 17% dos pacientes com histoplasmose disseminada, apresentando-se como pápulas, pústulas, placas, úlceras, lesões semelhantes a molusco e verruga e, raramente, eritema nodoso (Figura 10) (VASUDEVAN *et al.*, 2010).

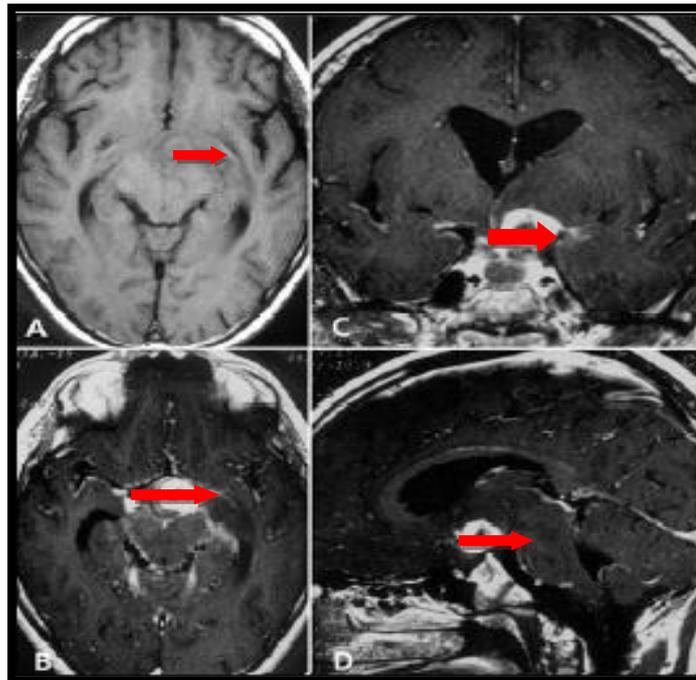
Figura 10 – Nódulos, placas e lesões semelhantes a molusco na face em indivíduo do sexo masculino com AIDS



Fonte: Vasudevan *et al.*(2010).

O envolvimento do sistema nervoso central (SNC) ocorre em 40% dos casos de histoplasmose disseminada, na forma de meningite, lesão localizada no cérebro ou coluna espinhal, acidente vascular cerebral causado por envolvimento vascular ou êmbolo cerebral e encefalite difusa. Os sintomas incluem febre, caquexia, desorientação, convulsão ou anormalidades neurológicas focais. O líquido cefalorraquidiano apresenta pleocitose linfocítica, elevação das proteínas e diminuição da glicose em pacientes com meningite, e a tomografia computadorizada ou ressonância magnética demonstra lesões únicas ou múltiplas no cérebro ou medula espinhal (WHEAT *et al.*, 2000a) (Figura 11).

Figura 11 - Ressonância magnética em cortes axiais pré (A) e pós-contraste (B), e em cortes coronais (C) e sagitais (D) pós-contraste. Na topografia do tálamo, hipotálamo e quiasma óptico à esquerda evidencia-se lesão expansiva irregularmente arredondada, isointensa ao parênquima encefálico, com impregnação anelar pelo gadolínio.



Fonte: Gasparetto *et al.* (2005).

As culturas para fungo podem ser negativas, bem como os testes sorológicos, sendo indicado diagnóstico presuntivo de meningite por *H. capsulatum*, em pacientes com histoplasmose disseminada e infecção no sistema nervoso central não explicada por outra causa, pois a histoplasmose é considerada um dos diagnósticos diferenciais na doença subaguda ou crônica do SNC (AIDE, 2009).

Apesar de o trato gastrointestinal estar comumente envolvido na histoplasmose disseminada, apenas 3-12% dos pacientes apresentam sintomas inespecíficos como diarreias e

dor abdominal, tornando difícil o diagnóstico em áreas não endêmicas (SUH; ANEKTHANANON; MARIUZ, 2001).

O envolvimento ocular ocorre em, aproximadamente, 1-10% dos indivíduos em áreas endêmicas, sendo geralmente assintomático, mas pode resultar em cegueira, se ocorrer comprometimento da mácula (AMARO; MUCCIOLI; ABREU, 2007).

A evolução laboratorial da histoplasmose disseminada, de forma geral, revela pancitopenia causada pelo envolvimento da medula óssea e anormalidades nos exames de função hepática, indicando que a doença atingiu o fígado. A radiografia do tórax pode estar normal, mas geralmente demonstra opacidades nodulares pequenas e difusas, descritas como reticulonodulares. O infiltrado intersticial difuso é comum, entretanto, bronquiectasia e adenopatia são raras. O comprometimento pulmonar pode evoluir para a síndrome da angústia respiratória em poucos dias após o início do quadro de disseminação da infecção (WHEAT, 1996; BARADKAR *et al.*, 2011).

O diagnóstico diferencial deve ser realizado com aspergilose, blastomicose, tumor carcinóide de pulmão, pneumonia por *Chlamydia*, coccidioidomicose, câncer de pulmão, linfoma mediastinal, infecção por *Mycoplasma*, infecção pneumocócica, pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*, pneumonia aspirativa, pneumonia bacteriana, fúngica e viral, sarcoidose e tuberculose (WHEAT; KAUFFMAN, 2003).

Na ausência de tratamento, o paciente evolui para óbito em 2-24 meses, e aproximadamente 5-10% dos pacientes, tratados ou não, desenvolvem insuficiência adrenal (WHEAT; KAUFFMAN, 2003).

1.7 A histoplasmose e a síndrome da imunodeficiência adquirida

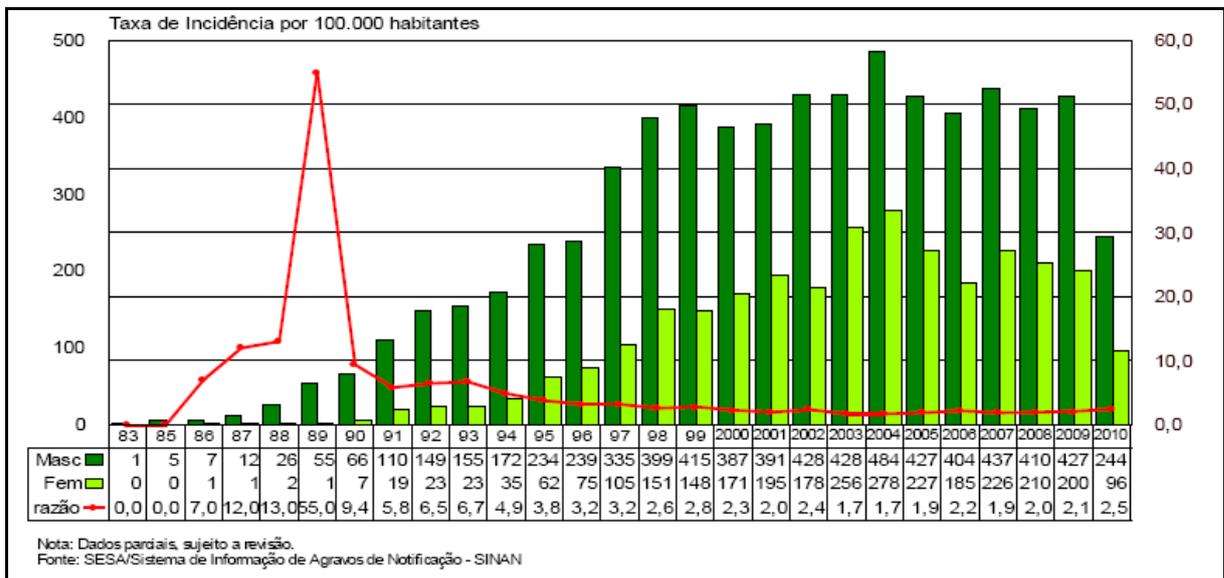
Em 2010, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que existam cerca de 33,3 milhões de pessoas infectadas pelo vírus HIV em todo o mundo, sendo que um terço desses indivíduos reside em países com limitados recursos para diagnóstico e tratamento da AIDS, e 50% dos casos ocorrem em mulheres. Na avaliação desse organismo internacional, em 2009, 370.000 crianças contraíram o vírus durante o período perinatal e de aleitamento, porque suas mães não tiveram acesso ao tratamento adequado (UNAIDS, 2010). Um terço dos portadores de HIV da América Latina (cerca de 620 mil infectados) vive no Brasil, sendo a epidemia a maior causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo, com estimativa de óbito pela OMS de 28 milhões de pessoas até o ano de 2009, tendo as doenças oportunistas

como as responsáveis por uma grande proporção dessas mortes (HUANG; CROTHERS, 2009; UNAIDS, 2010).

Os pulmões são os principais alvos de patologias associadas ao vírus do HIV e as pneumonias por agentes oportunistas, incluindo bactérias, micobactérias, fungos, vírus e parasitas, são as maiores causas de morbidade e mortalidade em pacientes com AIDS (HUANG; CROTHERS, 2009).

No Estado do Ceará, desde o ano do primeiro caso, em 1983, até abril de 2010, foram notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) 9.249 casos de AIDS. A maior parte dos casos notificados, 6.511 (70%), ocorreu no sexo masculino e o sexo feminino concentrou 2.738 (30%) do total de eventos. No início da epidemia, em 1986, a razão masculino/feminino era de 11 homens para cada mulher, e a partir de 2005 esta razão passou a ser de 1,9 homem para cada mulher (Figuras 12) (SINAN-CE, 2010).

Figura 12 – Taxa de incidência de AIDS, por ano de diagnóstico e sexo, no Estado do Ceará do ano de 1983 a 2010.



Fonte: SINAN CEARÁ (2010).

Atualmente, a epidemia de AIDS no Estado do Ceará segue as tendências nacionais, de feminização (crescimento dos casos entre mulheres) e interiorização (número cada vez maior de pequenos municípios com casos notificados). Os casos de AIDS foram notificados em 175 (95%) dos 184 municípios cearenses. Dentre estes, Fortaleza concentrou 62,3% do total. Em 2009, as maiores taxas de incidência foram notificadas nas faixas etárias de 30 a 39 e 40 a 49 anos, respectivamente (Figura 13) (SINAN-CE, 2010).

Figura 13 – Número e incidência de casos de AIDS por faixa etária, no Estado do Ceará, em 2009.

TABELA 1 – Número e incidência de casos de Aids por faixa etária, no Ceará, em 2009*		
Faixa Etária	Nº de Casos	Incidência por 100.000hab
1 – 4	5	0,79
5 – 9	4	0,48
10 – 14	1	0,12
15 – 19	9	1,06
20 – 29	93	5,68
30 – 39	134	11,1
40 – 49	117	11,98
50 +	37	2,55
Total	400	4,7

Fonte: Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN
*Dados sujeitos à revisão

Fonte: SINAN CEARÁ (2010).

O primeiro caso de histoplasmose associada com a síndrome da imunodeficiência adquirida foi relatado em 1983 (MORA; SANTOS; SILVA-VERGARA, 2007) e, em 1985, a histoplasmose foi considerada como infecção marcadora de AIDS pelo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) em Atlanta, Geórgia, Estados Unidos. Ocorre em aproximadamente 5% dos indivíduos com AIDS em áreas endêmicas, sendo considerada, após a criptococose, a mais comum das micoses endêmicas nesses pacientes, geralmente relacionada com uma reativação de foco endógeno (CRUZ *et al.*, 2006).

Apresenta-se clinicamente de forma aguda ou subaguda, e, comumente, evolui para doença grave e disseminada, se contagem de CD4 é menor ou igual a 150 células/mm³ e na ausência da terapia antirretroviral (MORA; SANTOS; SILVA-VERGARA 2007). Nesse caso, cepas de *H. capsulatum* que não eram consideradas virulentas são capazes de causar doença grave e fatal (GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, 2006). Em pacientes com CD4 > 300células/ mm³, os sintomas e sinais de histoplasmose são frequentemente limitados ao trato respiratório (MOFENSON *et al.*, 2009).

Os achados clínicos geralmente observados são febre, calafrios, anorexia, adinamia, perda de peso, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatia, dispneia e lesões cutâneas polimórficas (SAROSI; DAVIES, 1996). Há relatos de que, na América do Sul, mais de 80% dos pacientes possuem lesões cutâneas, com erupção maculopapular, foliculite, lesões papulonecróticas com aspecto acneiforme e úlceras perianais. As lesões cutâneas localizam-se

principalmente na face, região cervical, tórax e menos frequentemente nos membros (CORTI *et al.*, 2000) (Figura 14A e 14B). Podem ser observadas ulcerações orais dolorosas com odinofagia (FERREIRA *et al.*, 2002).

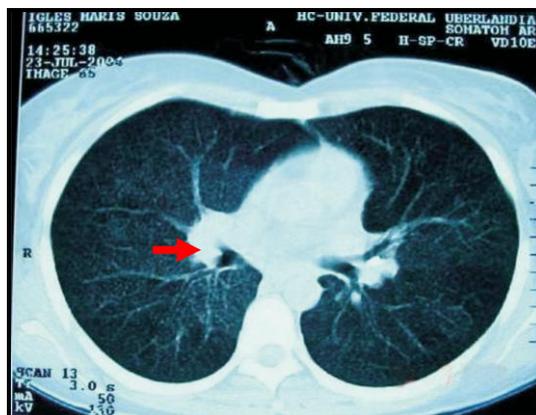
Figura 14 – A. Histoplasmose cutânea ulcerada em flanco D; B. Histoplasmose cutânea disseminada em paciente com AIDS



Fonte: Ferreira e Borges (2009).

O achado radiológico mais frequente é o infiltrado intersticial, difuso, nodular e bilateral, que pode ser encontrado na infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis jirovecii*, *Cytomegalovirus*, *Cryptococcus neoformans*, e linfomas (COUPPIE *et al.*, 2004) (Figura 15).

Figura 15 - Histoplasmose miliar dos pulmões em paciente com AIDS.



Fonte: Ferreira e Borges (2009).

A histoplasmose gastrointestinal é descrita em pacientes HIV positivos, com sintomas de febre, dor abdominal, diarreia e sangramento intestinal. As lesões mais observadas no trato gastrointestinal são úlceras, pseudopólipos ou placas, e espessamento focal da parede intestinal, semelhantes à doença inflamatória intestinal ou neoplasia (KAUFFMAN, 2007).

Os exames laboratoriais demonstram trombocitopenia ou pancitopenia associada a níveis séricos elevados de lactatodesidrogenase (LDH). Pode ser confundida com tuberculose, paracoccidiodomicose, leishmaniose visceral e doença do complexo do *Mycobacterium avium* (MORA; SANTOS; SILVA-VERGARA, 2007).

Os fatores demográficos e laboratoriais associados a um curso severo da doença são: idade maior do que 60 anos, raça negra, sintomas de diarreia, acometimento neurológico, insuficiência respiratória, evolução para sepse, ausência de terapia antirretroviral anterior, níveis de hemoglobina menores do que 9,5 g/dl, tempo de tromboplastina parcial de 145 segundos, valores de aspartato aminotransferase 12,5 vezes o normal, concentração de bilirrubina sérica de 11,5 mg/dl, creatinina sérica de 12,1 mg/dl e níveis de albumina de 3,5 g/dl (WHEAT *et al.*, 2000a; DAHER *et al.*, 2006; PONTES *et al.*, 2010).

1. 8 O diagnóstico laboratorial da histoplasmose

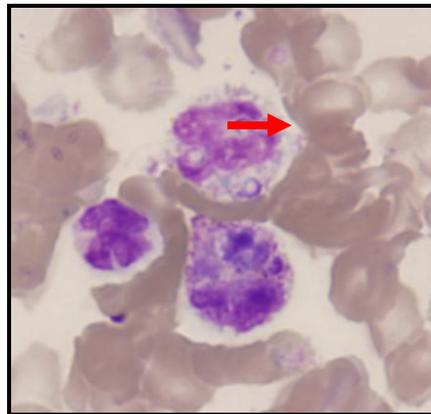
O diagnóstico da histoplasmose não pode ser realizado com base apenas nos achados clínicos, pois estes podem estar presentes em outras, e as manifestações pulmonares da doença mais agressiva demonstrada por infiltrados pulmonares e linfadenopatia hilar podem ser confundidas com infecções por outros fungos dimórficos ou com a tuberculose (GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPE-OLIVEIRA, 2006). Desta forma, o diagnóstico deve ser realizado com suporte na interação dos aspectos clínicos, epidemiológicos, laboratoriais e radiológicos (LEIMANN *et al.*, 2005).

O diagnóstico definitivo da histoplasmose requer o isolamento do *H. capsulatum* em meios de cultura específicos, ou a visualização da forma leveduriforme em exame direto de espécimes clínicos, utilizando técnicas de coloração específica para fungos (YEO; WONG, 2002). É importante destacar o fato de que, após coletado, o material deve ser acondicionado em recipiente estéril sem formol, e, como o *H. capsulatum* é uma levedura pequena intracelular, é importante que a sua pesquisa e diagnóstico sejam realizados por pessoal devidamente treinado. A amostra fixada em lâmina de vidro deve ser corada com a técnica de Giemsa e ao microscópio deve-se verificar a presença dentro de macrófagos e monócitos de

estruturas ovóides de cerca de 3 a 5 μm de tamanho, circundado por um halo claro, semelhante a uma cápsula, que corresponde à retração do citoplasma de cor azul, com núcleo vermelho (ROSSINI; GOULART, 2006).

A pesquisa direta do *H. capsulatum* em tecidos e sangue é rápida, mas apresenta menor sensibilidade do que a cultura ou detecção de antígeno. O exame direto do creme leucocitário pode mostrar organismos intracelulares em leucócitos em mais da metade dos pacientes com doença disseminada e a medula óssea apresenta-se positiva em 75% desses casos (Figura 16) (GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPE-OLIVEIRA, 2006).

Figura 16 – Esfregaço de sangue periférico de paciente com histoplasmose disseminada, mostrando elementos leveduriformes de *H. capsulatum* dentro de monócitos (GIEMSA).



Fonte: UFC/CEMM (2010).

A cultura é o padrão ouro para o diagnóstico da histoplasmose, e o isolamento do fungo pode ser efetuado em ágar-Sabouraud dextrose, com ou sem adição de cloranfenicol e ciclo-heximida (Mycosel®), BHI (ágar-infusão cérebro-coração) ou BHI ágar-sangue, incubado a 25°C por sete a dez dias a partir do creme leucocitário e por até quatro semanas em cultivos de amostras de outros sítios (MCKINSEY; MCKINSEY; BRUNE, 2008). As colônias obtidas são inicialmente velutasas, mas se tornam filamentosas, algodonosas e castanhas com a idade, e, à microscopia, observam-se hifas hialinas septadas com microconídios lisos e macroconídios tuberculados ou mamilonados, conhecidos como estalagmosporos, em vários estádios de desenvolvimento. Essas estruturas podem ser confundidas com as estruturas de fungos saprófitas dos gêneros *Chrysosporium* e *Sepedonium*, necessitando da confirmação do diagnóstico por meio da conversão da forma filamentosa para forma leveduriforme, entretanto, o *H. capsulatum* não converte facilmente,

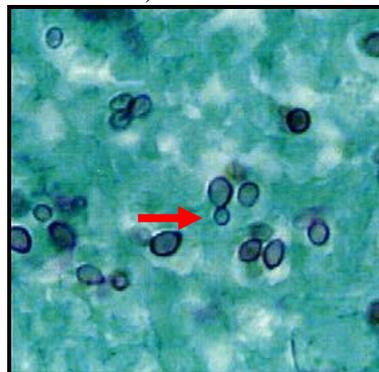
dependendo de suprimento especial de nutrientes, temperatura e das características fisiológicas da cepa (WANKE; LAZÉRA, 2004).

Em meios ricos como o ágar-sangue ou ágar-BHI com cisteína, incubados a 37°C, o *H. capsulatum* cresce na forma parasitária leveduriforme, com colônias úmidas e lisas, de coloração branca a marrom (WANKE; LAZÉRA, 2004; GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPE-OLIVEIRA, 2006).

O diagnóstico micológico da histoplasmose tem certas limitações, pois a cultura pode ser negativa em muitos pacientes com formas moderadas de histoplasmose e apresenta 20% de falso negativo na doença disseminada e 50% da forma pulmonar crônica. Está limitada a 2-4 semanas de incubação, e, em casos de doença grave, a demora na instituição da terapêutica pode ser fatal. Em alguns casos, são necessários procedimentos invasivos para obtenção de amostra, e em casos de diagnóstico duvidoso por dificuldade na identificação do fungo, é necessária a reversão para a fase leveduriforme, a fim de confirmar o diagnóstico (WHEAT; KAUFFMAN, 2003).

O exame microbiológico do aspirado da medula óssea, líquido proveniente do lavado broncoalveolar, material de escarro, urina ou amostra do tecido pulmonar e de pele são frequentemente analisados para o diagnóstico de histoplasmose, podendo ser corados pelo PAS (periódico ácido de Schiff) ou prata metenamina Grocott, que permite um rápido diagnóstico, mas com sensibilidade de menos que 50% (WHEAT; KAUFFMAN, 2003) (Figura 17).

Figura 17 – Aspecto histopatológico de amostra da medula óssea, mostrando o *H. capsulatum* na forma leveduriforme (prata-metenamina).

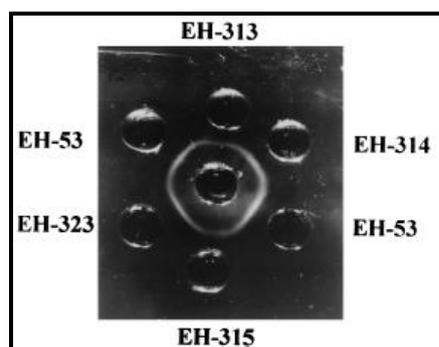


Fonte: Kauffman (2009).

Nas lesões pulmonares crônicas, ocorre formação de granuloma com ou sem células gigantes de Langerhans, com o centro necrótico ou calcificado e as margens fibrosadas (ROSSINI; GOULART, 2006). Deve ser distinguido de outros parasitas intracelulares, como a *Leishmania donovani* e o *Toxoplasma gondii*. Enquanto isso, a *L. donovani* possui cinetoplasto, o que não é observado no *H. capsulatum*. O *T. gondii*, não é corado pelo Giemsa (DONOGHUE *et al.*, 2009). Assim como, com as formas pequenas de *Blastomyces dermatitidis*, células leveduriformes do *Penicillium marneffeii* e *Cryptococcus neoformans* (ANSTEAS; PATTERSON, 2009).

A fim de aumentar a taxa de diagnóstico, a velocidade e a segurança na manipulação do fungo, os métodos sorológicos foram desenvolvidos, baseando-se na detecção de antígenos e anticorpos. As reações de imunodifusão e fixação do complemento são as mais comumente utilizadas na histoplasmose, e, apesar de rápidas e relativamente sensíveis, possuem algumas limitações, pois os anticorpos são detectados duas a seis semanas após a infecção e apresentam resultados falso negativos em imunocomprometidos. A positividade varia, ainda, conforme a apresentação clínica, com 18% de positividade em pacientes assintomáticos, 75-86% em sintomáticos e 100% em pacientes com sintomas severos. Os resultados falso positivos podem estar associados à reação cruzada com outros fungos, especialmente na blastomicose, coccidioidomicose, paracoccidioidomicose e aspergilose, mas também podem ocorrer na candidíase e na criptococose (WHEAT *et al.*, 2006; AIDE, 2009). Como os títulos de anticorpos permanecem elevados por mais de cinco anos após o tratamento, torna-se difícil a diferenciação entre infecção ativa, inativa e recidiva (GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, 2006) (Figura 18).

Figura 18 – Reação de imunodifusão radial dupla demonstrando no orifício do centro, soro humano positivo para histoplasmose; EH-53, cepa humana de referência; EH-313, cepa de *H. capsulatum* isolado de guano de morcego; EH-314, cepa de *H. capsulatum* isolada de fezes de galinha; EH-315, cepa de *H. capsulatum* de um morcego infectado; EH-323, cepa de *H. capsulatum* isolada de um paciente com AIDS e histoplasmose.



Fonte: Reyes-Montes *et al.* (1999).

O teste de aglutinação do látex é mais sensível do que o teste de fixação do complemento e, ao utilizar a histoplasmina como antígeno, detecta anticorpo em 97% das amostras de soro de pacientes com histoplasmose aguda, 96% na forma pulmonar crônica e 64% na doença disseminada, enquanto que, por meio do teste de fixação do complemento, o anticorpo é detectado em 38% dos casos na histoplasmose aguda, 73% na pulmonar crônica e 45% na disseminada (WHEAT *et al.*, 2006).

Os anticorpos contra *H. capsulatum* também podem ser detectados por ensaios imunoenzimáticos, tais como *Western Blot* e ELISA. O *Western blot* pode ser utilizado para diagnóstico da histoplasmose e para avaliar a distribuição epidemiológica da doença. Por essa técnica, identificou-se que os antígenos de 91, 83, 70 e 38 kDa do *H. capsulatum* reagem com o soro de pacientes com histoplasmose. A vantagem do *Western Blot* é a identificação precoce da infecção, em alguns casos, antes que a soroconversão possa ser detectada por imunodifusão ou reação de fixação do complemento, mas apresenta elevada percentagem de “falsopositividade” (LEIMANN *et al.*, 2005).

A detecção de antígeno é um método rápido para diagnóstico em pacientes com doença disseminada, em pacientes imunocomprometidos quando a detecção de anticorpos não é viável, assim como na doença aguda, permitindo diagnóstico precoce e tratamento, podendo ser realizado por meio de radioimunoensaio ou ELISA. Durante a infecção, os antígenos são liberados das células fúngicas e detectados em fluidos corpóreos, como soro, líquido pleural, líquido do lavado broncoalveolar, líquido cerebrospinal e urina. Esse método é útil para acompanhar o tratamento, pois os níveis antigênicos diminuem com o tratamento efetivo e aumentam em casos de recidivas (WHEAT *et al.*, 2006). Os antígenos são detectados na urina de 92% dos pacientes com histoplasmose disseminada e 75-80% dos com histoplasmose aguda, com sensibilidade maior na urina (92%) do que em outros fluidos. Na histoplasmose, estudos demonstraram sensibilidade para detecção de antígeno na urina maior nos pacientes com AIDS (95%), e menos em outras desordens imunossupressoras (82%) ou sem imunossupressão (80%). A antigenúria pode ser detectada menos frequentemente em pacientes com histoplasmose pulmonar subaguda (34%), nos quais exposição recente não pode ser identificada, e também na histoplasmose pulmonar crônica (14%) (KUROWSKI; OSTAPCHUK, 2002).

Além do soro e da urina, esses testes podem ser realizados em amostras de outros fluidos, como o líquido cefalorraquidiano na suspeita de meningite, e líquido do lavado broncoalveolar na histoplasmose pulmonar. Na doença crônica, a detecção de antígeno pode ser negativa, em decorrência da baixa antigenemia, sendo observada positividade nos testes

sorológicos com anticorpo anti-*H. capsulatum*, na maioria dos casos (WHEAT; KAUFFMAN, 2003). As concentrações antigênicas diminuem e, eventualmente, se tornam não detectáveis em muitos pacientes após um ano de tratamento, mas a persistência de altas concentrações sugere falha no tratamento (WHEAT; KAUFFMAN, 2003). Em pacientes com resposta clínica ao tratamento, nos quais os níveis antigênicos haviam reduzido previamente, um aumento nestes sugere recidiva, devendo correlacionar-se com aspectos clínicos, laboratoriais e radiográficos, e repetição da cultura, bem como avaliar aderência do paciente ao tratamento (WHEAT; KAUFFMAN, 2003).

Os testes antigênicos podem ser realizados a cada três a quatro meses, durante e após o tratamento, a fim de detectar recidivas, sendo que reações cruzadas podem ocorrer na paracoccidiodomicose, blastomicose, histoplasmose africana e infecções por *Penicillium marneffeii* (WHEAT; KAUFFMAN, 2003).

Dentre os testes antigênicos pode-se mencionar a técnica de radioimunoensaio (RIA) que utiliza soro policlonal de coelho para detecção de antígeno de *H. capsulatum* em amostra de urina e soro. Como os pacientes com histoplasmose disseminada apresentam altos níveis de antigenúria, essa técnica tanto é importante para o diagnóstico como para o acompanhamento durante o tratamento e evolução da histoplasmose, pois a diminuição dos títulos antigênicos está relacionada à melhora nas condições clínicas dos pacientes (WHEAT *et al.*, 2006). Os resultados “falsopositivos” podem ser observados em raros casos, e são possivelmente relacionados ao fator reumatóide ou à Ig G humana anticoelho. As condições associadas à “falsopositividade” são colagenoses, cirrose, discrasias sanguíneas e doenças malignas, as quais devem ser suspeitadas se os sintomas clínicos e laboratoriais não forem compatíveis com histoplasmose, devendo-se, nesses casos, repetir os testes ou realizar outras provas para histoplasmose (WHEAT *et al.*, 2006).

Os testes cutâneos são raramente empregados como diagnóstico em virtude da positividade elevada em áreas endêmicas e resultados “falsonegativos” associados com doença pulmonar crônica e disseminada, sendo particularmente úteis em inquéritos epidemiológicos em áreas não endêmicas ou durante epidemias (WHEAT *et al.*, 2006). O antígeno histoplasmina é um filtrado de culturas de *H. capsulatum* var. *capsulatum*, e uma reação positiva tem valor diagnóstico quando, antes da manifestação sintomática da infecção, for constatada reação negativa. Também tem valor diagnóstico se a reação for positiva em crianças menores de dois anos de idade. A reação negativa pode significar ausência de infecção, infecção muito recente ou fase terminal da doença. Pode apresentar “falsopositivo” pela reação cruzada com outros fungos (*Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides* spp. e

Paracoccidioides brasiliensis) e “falsonegativo” em pacientes imunossuprimidos (ROSSINI; GOULART, 2006).

Recentemente, técnicas moleculares estão sendo desenvolvidas, buscando-se um diagnóstico precoce e específico (GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPE-OLIVEIRA, 2006). A técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) baseia-se na amplificação da sequência genética do *H. capsulatum*, utilizando sequência de *primers* baseada na região 18S do RNAr do fungo, mas pode apresentar “falsopositivo” na blastomicose e paracoccidioidomicose, sendo necessária confirmação por sequenciamento. Pode ser útil para o diagnóstico de histoplasmose em áreas não endêmicas, juntamente com os testes sorológicos (WHEAT, 2007b; MCKINSEY; MCKINSEY; BRUNE, 2008).

1.9 O tratamento da histoplasmose

O tratamento da histoplasmose depende da severidade dos sintomas clínicos e das condições gerais do indivíduo, incluindo seu estado imunológico (WHEAT *et al.*, 2007a).

1.9.1 O tratamento da histoplasmose pulmonar aguda

A forma pulmonar aguda, geralmente, cursa com quadro autolimitado, entretanto a presença de febre persistente por mais de três semanas e/ou manifestações clínicas outras por mais de 30 dias podem indicar progressão para doença disseminada, devendo-se iniciar a terapêutica com itraconazol 600mg/dia por três dias em adultos, seguido de 400 mg/dia por seis a doze semanas (WHEAT, 1995).

Em pacientes com doença progressiva e nos casos de insuficiência respiratória, é necessária a prescrição de anfotericina B 50mg/dia, até melhora clínica, após a qual se faz a substituição por itraconazol durante 12 semanas (WHEAT *et al.*, 2007a).

1.9.2 O tratamento da histoplasmose pulmonar crônica

Por tratar-se de doença progressiva e fatal, todos os pacientes com essa condição devem ser tratados com itraconazol 600mg/dia três dias, seguidos de 400mg/dia 12 a 14 meses. A anfotericina B deve ser utilizada nos casos de exacerbação da insuficiência respiratória (WHEAT *et al.*, 2007a).

Na mediastinite granulomatosa, os sintomas são frequentemente moderados, com resolução após alguns meses, mas podem ser graves, e a terapia com antifúngicos pode ser benéfica em alguns casos, podendo ou não ser associada com corticosteróides. Nos casos de obstrução grave, pode haver ressecção da massa que está comprimindo o órgão. O tratamento deve iniciar-se com anfotericina B na dose de 0,7-1,0 mg/kg/dia, seguido por itraconazol 200-400mg/dia por seis a doze meses (WHEAT *et al.*, 2000b).

Pacientes com pericardite respondem a agentes anti-inflamatórios não esteróides sem o uso de antifúngicos, necessitando de drenagem cirúrgica ou percutânea do líquido pericárdico, em caso de tamponamento pericárdico (WHEAT *et al.*, 2000b).

Os sintomas reumatológicos geralmente regredem com o uso de anti-inflamatórios não esteróides, não sendo recomendado o uso de antifúngicos (WHEAT *et al.*, 2000b).

1.9.3 O tratamento da histoplasmose disseminada

Na doença disseminada, prescreve-se a anfotericina B (desoxicolato ou lipossomal), e, após um a duas semanas após remissão, inicia-se itraconazol 600mg/dia três dias, seguido de 400mg/dia por 12 meses (WHEAT *et al.*, 2007a).

A anfotericina B lipossomal (3mg/kg/dia) é mais efetiva do que a anfotericina B desoxicolato (0,7mg/kg/dia), induzindo resposta mais rápida, diminuição da toxicidade e mortalidade, podendo, em decorrência do custo financeiro, ser substituída pela anfotericina B complexo lipídico (5mg/kg/dia) (MCKINSEY; MCKINSEY; BRUNE, 2008).

Os pacientes com histoplasmose no sistema nervoso central não respondem tão bem ao tratamento como nas outras formas de histoplasmose, sendo o óbito observado em 20 a 40% dos casos ou recorrência após suspensão a medicação. É recomendado o uso da anfotericina B desoxicolato (0,7-1 mg/kg/dia até a dose total de 35 mg/kg), pois as formulações lipossomais não parecem ser mais efetivas, mas podendo ser utilizadas na dose de 5mg/kg/dia durante quatro a seis semanas (WHEAT *et al.*, 2007a).

Após alcançar a dose total de anfotericina B, inicia-se o fluconazol na dose de 800 mg/dia por nove a doze meses, a fim de reduzir os riscos de recorrência. Quando na possibilidade de realizar a dosagem sérica do fluconazol, esta deve ser mantida em 80-150 µg/ml. O itraconazol não deve ser utilizado nesse caso, pois não atravessa a barreira hematoencefálica (WHEAT *et al.*, 2007a).

Em pacientes com AIDS, deve-se manter itraconazol por tempo indeterminado (KUROWSKI; OSTAPCHUK, 2002). O tratamento de manutenção pode ser suspenso após a

reconstituição da imunidade pela terapia antirretroviral, com contagem de CD4 > 150 células/mm³ e reiniciado se CD4 < 100 células/mm³ (BENNETT, 2006). A instituição da TARV (terapia antirretroviral) em pacientes com infecção anterior por *H. capsulatum* pode resultar em síndrome da reconstituição imune (NOSANCHUK; GRACSER, 2008).

Na gravidez está contraindicado o uso de antifúngicos azólicos, em razão do potencial de teratogenia, devendo neste caso fazer uso de anfotericina B. Não se conhece a segurança das preparações lipídicas na gestação (WHEAT *et al.*, 2000b).

1.10 A profilaxia da histoplasmose

A profilaxia primária deve ser estimulada com a limpeza constante de locais onde ocorre o acúmulo de excretas de aves e uso de máscaras por indivíduos com risco de exposição a locais suspeitos ou reconhecidamente infectados (WANKE; LAZÉRA, 2004).

Os indivíduos infectados pelo vírus HIV e contagem de CD4 < 150 células/mm³, assim como outros indivíduos com imunossupressão, devem evitar possíveis locais contaminados e atividades que possam estar associadas com um maior risco de aquisição da histoplasmose. Os trabalhadores de demolição de prédios que oferecem risco de disseminação do *H. capsulatum* devem utilizar máscaras especiais e o solo no local deve ser constantemente molhado para diminuir a formação de poeira (MOFENSON *et al.*, 2009).

A profilaxia com itraconazol, na dose de 200mg/dia, é recomendada em pacientes infectados pelo HIV e contagem de CD4 < 150 células/mm³, que residem em áreas com alta endemicidade da histoplasmose (10 casos/100 pacientes/ano) ou que exerçam atividade de risco de aquisição da doença, devendo ser suspensa se contagem de CD4 > 150 células/mm³ por seis meses em pacientes em uso de TARV, sendo reiniciada se contagem de CD4 < 150 células/mm³. Está indicada, também, em pacientes imunocomprometidos HIV negativos (HUANG; CROTHERS, 2009; MOFENSON *et al.*, 2009).

Ainda não existe vacina eficaz, mas a vacina produzida com base na glicoproteína da parede da levedura demonstrou atividade protetora em camundongos, existindo a perspectiva de ser benéfica em indivíduos imunocompetentes que apresentam atividade de risco em áreas endêmicas, mas ainda está em avaliação. Existe a perspectiva de que vacinas possam ser produzidas ativando a proteção de anticorpos mediante o reconhecimento de proteínas específicas, como a proteína do choque térmico (CAREY *et al.*, 2002; CUTLER; DEEPE; KLEIN, 2007; WÜTHRICH *et al.*, 2011).

1.11 Os agentes antifúngicos utilizados no tratamento da histoplasmose

1.11.1 Anfotericina B

A anfotericina B é um agente antifúngico poliênico, produzido com base no actinomiceto *Streptomyces nodosus*, que se liga ao ergosterol na membrana da célula fúngica, produzindo poros que resultam no aumento da permeabilidade da membrana, com extravasamento de moléculas e eletrólitos do meio intra para extracelular. Está indicada no tratamento das infecções fúngicas sistêmicas, sendo administrada na maioria dos casos por via endovenosa, mas podendo ser administrada por via intratecal (na meningite fúngica) ou intra-articular. A absorção gastrointestinal de todas as formulações de anfotericina B é insignificante (WANKE; LAZÉRA, 2004). Essa droga se distribui amplamente por todo o organismo, inclusive atravessa a barreira placentária, mas com baixa penetração no líquido cefalorraquidiano, humor vítreo e líquido sinovial. É excretada por via renal, sendo nefrotóxica por suas propriedades vasoconstritoras renais e por sua ação lesiva direta sobre o epitélio renal (WANKE; LAZÉRA, 2004).

Apresenta ação antifúngica contra os fungos *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides* spp., *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* e var. *gattii* e *Sporothrix schenckii*, causadores de micoses sistêmicas (WANKE; LAZÉRA, 2004). Tem boa atividade contra espécies de *Candida* e *Aspergillus fumigatus*, mas já com algumas cepas de *Candida não albicans* resistentes. Os zigomicetos (*Mucor* sp. e *Rhizopus* sp.), assim como o *Fusarium* spp. apresentam sensibilidade variável, enquanto que alguns fungos, como *Trichosporon* spp., *Pseudallescheria boydii*, *Cladosporium* spp. e *Phialophora* spp., são resistentes (MARTINEZ, 2006).

Os efeitos adversos observados com o uso da anfotericina B podem ocorrer de forma imediata durante a infusão, com manifestação de febre, calafrios, taquicardia, hipertensão arterial, náuseas, vômitos e taquipneia, assim como tardios, como a nefrotoxicidade e a anemia, necessitando da correção de doses e dos intervalos da administração e mesmo da suspensão da terapia (MARTINEZ, 2006). Em virtude da ocorrência de acidose tubular e perda renal de K^+ e Mg^{2+} durante a terapia, deve-se monitorar esses eletrólitos e, se necessário, fazer suplementação de K^+ (BENNETT, 2006).

A anfotericina B é insolúvel em água, mas foi formulada para infusão intravenosa mediante a formação de um complexo do fármaco com o sal biliar, desoxicolato (BENNETT,

2006). Na década de 1990, quarenta anos após a introdução da anfotericina B desoxicolato, três formulações à base de lipídios foram desenvolvidas com o objetivo de reduzir a nefrotoxicidade sem comprometer a eficácia da medicação: anfotericina lipossomal (AL), anfotericina B em complexo lipídico (ABCL) e anfotericina B em dispersão coloidal (ABDC) (OSTROSKY-ZEICHNER *et al.*, 2003).

A anfotericina lipossomal (AL) apresenta o antifúngico incorporado em lipossomos, microesferas lipídicas com 55 a 75 nm, preparadas com lecitina de soja, colesterol e diestearoilfosfatidilglicerol, apresentando baixa toxicidade, a menor dentre todas as formulações, tanto imediata como crônica, possibilitando infusão rápida e uso seguro de doses de até 5 mg/kg/dia (MARTINEZ, 2006).

A anfotericina B em complexo lipídico (ABCL) é um agregado lipídico estabilizado da anfotericina B, formando uma estrutura semelhante a um anel. Após administração endovenosa, a anfotericina B em complexo lipídico é rapidamente metabolizada, e altas concentrações são sequestradas pelo tecido reticuloendotelial no fígado, baço e pulmão. A ABCL foi aprovada como tratamento de segunda escolha de infecções fúngicas sistêmicas em pacientes refratários ou intolerantes a anfotericina B convencional, com o comprometimento da função renal ou contraindicações outras ao uso da anfotericina B. A dose recomendada é de 5 mg/kg/dia, em infusão endovenosa, inclusive em pacientes com doença renal ou hepática. A ABCL também causa nefrotoxicidade, principalmente quando utilizada com outras drogas nefrotóxicas por um período longo, mas é menos tóxica do que a convencional (CHANDRASEKAR, 2008).

Na formulação da anfotericina B em dispersão coloidal (ABDC), o antifúngico está contido, juntamente com sulfato de colesterol, em microdiscos, acarretando menos nefrotoxicidade, mas com reações imediatas que podem ser reduzidas com a infusão lenta da substância (MARTINEZ, 2006).

1.11.2 Derivados azólicos

Os azólicos são antifúngicos que possuem anel pentagonal na estrutura molecular, classificados em imidazólicos quando contêm três átomos de carbono e dois de nitrogênio (clotrimazol, miconazol, cetoconazol, econazol, butoconazol, oxiconazol, sertocozazol e sulconazol), ou triazólicos quando apresentam dois de carbono e três de nitrogênio (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e ravuconazol). Atuam inibindo enzimas do citocromo P450 dos fungos, o que acarreta bloqueio na demetilação do lanosterol e síntese

de ergosterol, e altera a permeabilidade da membrana e a viabilidade fúngica. Agem, também, modificando a síntese de lipídios e inativando enzimas do processo oxidativo dos fungos (MARTINEZ, 2006).

Os triazóis sistêmicos são metabolizados mais lentamente e exercem menos efeito sobre a síntese de esteróis humanos do que os imidazólicos (BENNETT, 2006). Para o tratamento da histoplasmose, são utilizados o itraconazol, fluconazol e voriconazol (WHEAT *et al.*, 2000b) e os azólicos posaconazol, ravuconazol e isavuconazol apresentam atividade *in vitro* contra *H. capsulatum* (SABATELLI *et al.*, 2006; GONZÁLEZ, 2009).

O itraconazol exibe atividade fungistática e está disponível em forma de cápsulas, sendo em geral bem absorvido, principalmente após refeições completas. Os picos de concentração plasmática são atingidos duas a cinco horas após administração oral. Essa droga passa por metabolismo hepático extenso e origina diversos metabólitos, sendo que o principal deles é o hidroxí-itraconazol, cuja concentração plasmática é aproximadamente o dobro do fármaco inalterado. A meia-vida terminal do itraconazol é cerca de 17 horas após dose única e aumenta para 34 a 42 horas com doses repetidas. O itraconazol é excretado como metabólito inativo na urina e nas fezes. A maior parte do itraconazol disponível no plasma está ligada à albumina (99,6%), mas também há afinidade considerável por lipídios. Não é carcinogênico, mas, como é teratogênico em ratos, está contraindicado durante a gravidez ou para mulheres que pretendem engravidar (BENNETT, 2006).

Apresenta interação medicamentosa com muitos fármacos, tendo sua absorção reduzida com uso de antiácidos, e tanto a fenitoína como a rifampicina podem reduzir os níveis plasmáticos do itraconazol. Pode causar edema na coadministração com bloqueadores dos canais de cálcio (anlodipina, nifedipina), eleva as concentrações plasmáticas do tacrolimus, ciclosporina, digoxina e midazolam, e pode acarretar rabdomiólise ao ser administrado em conjunto com medicamentos para tratar dislipidemia (lovastatina e sinvastatina) (BENNETT, 2006).

Constitui o medicamento de escolha para pacientes com infecções não meníngeas causadas por *B. dermatitidis*, *H. capsulatum*, *P. brasiliensis* e *Coccidioides* spp. (BENNETT, 2006). Está indicado na histoplasmose moderadamente sintomática e na forma pulmonar aguda, constituindo-se em opção à anfotericina B no tratamento da histoplasmose pulmonar crônica e disseminada (WHEAT *et al.*, 2007a).

O fluconazol é um composto bitriazólico com mecanismo de ação semelhante ao itraconazol. Apresenta amplo espectro de ação contra espécies de *Cryptococcus*, *Histoplasma* e *Paracoccidioides*, e *Candida albicans*, mas com cepas de *Candida krusei* e *Candida*

glabrata menos sensíveis. Não tem boa ação contra fungos do gênero *Aspergillus* e fungos causadores da mucormicose. Pode ser administrado por via oral ou parenteral, apresentando tempo médio no sangue de 30 horas. A administração com alimentos não prejudica a sua absorção, e é objeto de metabolização hepática parcial, com eliminação na forma ativa por via renal. Apresenta boa penetração no sistema nervoso central e os efeitos colaterais observados em alguns pacientes são náuseas, dor abdominal, vômitos, diarreia, caquexia e, raramente, hepatotoxicidade, dermatite esfoliativa, anafilaxia, plaquetopenia e leucopenia (SANTOS JR *et al.*, 2005).

O voriconazol, após o itraconazol, é expresso como o segundo agente antifúngico triazólico com amplo espectro de atividade. Sua estrutura é semelhante à do fluconazol, mas com atividade aumentada *in vitro* e baixa hidrossolubilidade (BENNETT, 2006). As apresentações encontradas são para administração via oral e endovenosa, sendo que a absorção oral não é diminuída quando o voriconazol é administrado com antiácidos, como a cimetidina, ranitidina ou omeprazol, com metabolização via hepática e excreção renal (VEHRESCHILD *et al.*, 2008). É geralmente bem tolerado, mas seu uso pode provocar efeitos adversos, como febre, exantema, anormalidades hepáticas, náuseas, vômitos, dor abdominal, caquexia e distúrbios visuais. É teratogênico em animais, estando contraindicado durante a gravidez (BENNETT, 2006). Foi aprovado em 2002 pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de aspergilose invasiva e infecções por *Scedosporium apiospermum* e *Fusarium* spp., refratárias a outros antifúngicos, e possui ação fungistática *in vitro* contra as espécies de *Candida*, inclusive as resistentes ao fluconazol, e atividade fungicida contra *Cryptococcus* spp., dermatófitos, como o *Trichosporon* spp., *Blastomyces* spp., *Histoplasma capsulatum* e *Coccidioides* spp. (FREIFELD *et al.*, 2009).

1.11.3 Equinocandinas

As equinocandinas são lipopeptídeos que interferem na biossíntese da β -1,3-D-glucana, componente da parede da célula fúngica, sendo ativas contra leveduras e fungos filamentosos (IDEMYOR, 2003). A caspofungina foi o primeiro representante desse grupo aprovado pelo FDA em 2002, seguida pela micafungina em 2005 e anidulafungina em 2006. Os efeitos adversos são menos frequentes do que com a anfotericina B e a interação com outros medicamentos é menor do que com as drogas azólicas (MARTINEZ, 2006). Apresenta amplo espectro de ação contra *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. e menos ativa contra fungos do gênero *Zygomycetes*, *Cryptococcus neoformans* ou *Fusarium* spp. (PERLIN, 2007).

1.12 Sulfametoxazol-trimetoprim: antimicrobiano com potencial para uso na terapêutica antifúngica

As sulfonamidas foram os primeiros agentes quimioterápicos eficazes a serem utilizados por via sistêmica na prevenção e cura das infecções bacterianas no homem, perdendo sua importância após o advento da penicilina, tendo sido ampliado seu espectro de atividade com a combinação sinérgica da sulfametoxazol com trimetoprim, conhecida como cotrimoxazol, na década de 1970 (PETRI JR, 2006).

As sulfonamidas são bacteriostáticas com ampla atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, entretanto, a resistência bacteriana a essa classe de terapêutico se tornou crescente. São análogos estruturais e antagonistas competitivos do ácido para-aminobenzóico (PABA), impedindo que as bactérias utilizem o PABA para a síntese de ácido fólico. As células dos mamíferos e de algumas bactérias insensíveis às sulfonamidas não são afetadas por utilizarem o folato pré-formado no seu metabolismo (PETRI JR, 2006).

O espectro antibacteriano do trimetoprim é semelhante ao do sulfametoxazol, mas de 20 a 100 vezes mais potente do que este. Trata-se de uma diaminopirimidina que, juntamente com o sulfametoxazol, age em duas etapas da via enzimática para a síntese dos folatos. Enquanto as sulfonamidas inibem a incorporação do PABA no ácido fólico, o trimetoprim é um poderoso inibidor competitivo seletivo da diidrofoloreductase microbiana, o que impede a redução do diidrofolato a tetraidrofolato (PETRI JR, 2006).

Após a administração de 800 mg de sulfametoxazol com 160 mg de trimetoprim (relação convencional 5:1) duas vezes ao dia, as concentrações máximas dos fármacos no plasma são aproximadamente de 40 e 2 µl/ml, o equivalente a relação ótima (PETRI JR, 2006).

O trimetoprim distribui-se amplamente nos tecidos, penetra facilmente o líquido cefalorraquidiano, o escarro e a bile. Enquanto que, as sulfonamidas atravessam rapidamente a placenta e alcançam a circulação fetal em concentrações suficientes para causarem efeito tanto terapêutico quanto tóxico no feto. Ambos sofrem excreção renal (PETRI JR, 2006).

A combinação cotrimoxazol é utilizada no tratamento de infecções do trato urinário, respiratório e gastrointestinal. A terapia em altas doses (15 mg/kg de trimetoprim ao dia mais 100 mg/kg de sulfametoxazol ao dia, em três a quatro doses fracionadas) é eficaz na infecção grave por *P. jirovecii* em pacientes com AIDS e doses mais baixas em pneumonia menos grave por esse agente. A profilaxia com 800 mg de sulfametoxazol e 160 mg de

trimetoprim uma vez ao dia ou três vezes na semana é eficaz na prevenção da pneumonia causada por esse microrganismo em pacientes com AIDS. As reações adversas nesses casos mais frequentes são exantema, febre, leucopenia e hepatite (MOFENSON *et al.*, 2009).

1. 13 Os testes de sensibilidade antifúngica *in vitro*

Os testes de sensibilidade antifúngica surgiram da necessidade de orientação quanto à terapêutica antifúngica mais eficaz contra as espécies fúngicas causadoras de infecções sistêmicas, em razão do aumento de sérias infecções fúngicas e do concomitante aparecimento de resistência aos agentes antifúngicos. Esses testes são derivados dos métodos utilizados na avaliação da atividade de antibacterianos *in vitro*, cujo princípio básico é expor um determinado inóculo definido do microrganismo em estudo a concentrações da droga testada, de modo que as condições que suportem o crescimento do microrganismo não interfiram com a atuação da droga. A leitura final dos testes permite identificar a menor concentração da droga que inibe o crescimento do microrganismo, ou concentração inibitória mínima (CIM) (COLOMBO; ALVES, 2004).

No interesse de padronizar os testes de sensibilidade, em 1982, a entidade responsável pela normalização de técnicas de laboratório clínico nos Estados Unidos, o *National Commitee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), designou um subcomitê para padronizar os testes de sensibilidade de fungos a drogas antifúngicas, sendo priorizada, inicialmente, a normalização dos trabalhos envolvendo as leveduras, pela sua menor complexidade e maior frequência de infecção entre os fungos (COLOMBO; ALVES, 2004). Após passar pelos estádios de documento proposto (P) em 1992 e tentativa (T) em 1995, a metodologia do NCCLS para leveduras foi aprovada (A) em 1997, como Norma M27-*Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast*, tornando o primeiro teste de sensibilidade antifúngica padronizado, facilitando a reprodutibilidade entre laboratórios e, sendo, inicialmente, sugerido para teste com as espécies de *Candida* e *Cryptococcus* (NCCLS, 1997), com segunda edição publicada em 2002 (documento M27-A2) (HOSPENTHAL; MURRAY; RINALDI, 2004).

A norma M-27 especifica o tamanho e a preparação do inóculo, meio de teste, tempo e temperatura de incubação e tempo final para leitura, sendo inicialmente definido para macrodiluição e, posteriormente, também para microdiluição em virtude da facilidade no manuseio e congelamento das placas, bem como por ser mais econômico (REX *et al.*, 2001). Determina como meio de cultivo padrão o RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*)-1640

(com L-glutamina, sem bicarbonato e pH $7,0 \pm 0,1$). O RPMI 1640 é um meio quimicamente definido, livre de macromoléculas e suporta o crescimento adequado de várias espécies fúngicas, sendo tamponado para pH 7,0 com ácido 2-[N-morfolino]-propanossulfônico (MOPS; Sigma) 0,165M (COLOMBO; ALVES, 2004).

A amostra de levedura é avaliada em suspensão de células, denominada inóculo, é preparada inicialmente em solução salina, na concentração de $1-5 \times 10^6$ células/mL com auxílio de espectrofotômetro sob filtro de 530 nm e, depois, diluído em RPMI. O inóculo diluído é adicionado a concentrações distintas do antifúngico testado, de modo a definir a CIM deste. É realizada incubação à temperatura de 35°C por 24 horas para *Candida* spp. e 72 horas para *C. neoformans* (MELHEM; SZESZS, 2010). Cepas-controle de origem *American Type Culture Collection* (ATCC) são utilizadas por possuírem CIM padronizados, a fim de validar os testes (MELHEM; SZESZS, 2010).

A leitura dos testes é visual, para comparar a turbidez de cada orifício contendo uma concentração da droga e o inóculo fúngico com a turbidez do controle de crescimento, em que não foi colocada a droga, atribuindo-se um escore para leitura do ensaio, como segue: zero (sem crescimento visível); 1 (25% de crescimento em relação ao controle); 3 (75% de crescimento em relação ao controle); e 4 (sem redução de crescimento) (COLOMBO; ALVES, 2004; MELHEM; SZESZS, 2010).

A padronização do critério de leitura dos testes definiu como CIM para a anfotericina B a menor concentração da droga capaz de inibir qualquer crescimento visualmente perceptível do fungo nos tubos ou poços testados. Em relação aos azólicos, considerados fungistáticos, em decorrência de o início da sua atuação ser retardado pela necessidade da entrada da droga na célula fúngica e a necessária inibição do metabolismo celular, a CIM foi definida como a menor concentração da droga capaz de inibir 80% do crescimento obtido com o controle positivo (NCCLS, 1992). Esse critério de leitura para os azólicos diminui o erro decorrente do fenômeno de crescimento residual (*trailing*) apresentado por algumas espécies diante de drogas fungistáticas. O termo *trailing* é usado para descrever o reduzido, mas persistente crescimento que alguns fungos apresentam *in vitro*, após entrarem em contato com essas drogas antifúngicas azólicas. Com o resultado da CIM, faz-se a interpretação desse valor, conforme os pontos de corte (*breakpoints*) estabelecidos (MELHEM; SZESZS, 2010).

Com base nessa norma, o Subcomitê para Testes de Sensibilidade a Agentes Antifúngicos do NCCLS iniciou o preparo da padronização de teste de sensibilidade antifúngica para os fungos filamentosos, concluindo com a norma M-38A (método de

referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica de fungos filamentosos), determinando as condições do teste, incluindo a preparação e o tamanho do inóculo, o período e a temperatura de incubação, a formulação do meio, assim como os critérios para a determinação da CIM. Estudos adicionais demonstraram algum grau de correlação entre os resultados dos testes *in vitro* e a resposta ao tratamento em modelos animais (REX *et al.*, 2001). O método foi destinado à realização de testes dos fungos filamentosos mais comuns que causam infecções invasivas, o que abrange as espécies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Pseudallescheria boydii* e a forma miceliana de *Sporothrix schenckii*. Não está essa metodologia indicada para a avaliação da fase leveduriforme dos fungos dimórficos: *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides* spp., *H. capsulatum* var *capsulatum*, *Penicillium marneffeii* e *S. schenckii*. Os antifúngicos recomendados são: fluconazol, cetoconazol, itraconazol, voriconazol, ravuconazol, posaconazol, fluocitosina e anfotericina B (NCCLS, 2002).

O documento M-38A determina como meio de cultivo padrão o RPMI -1640, pela sua adequação aos testes de sensibilidade de leveduras aos agentes antifúngicos, assim como faz referência ao preparo da solução-padrão das drogas e aos testes de diluição apresentados na Norma M27 (NCCLS, 2002). Essa técnica propõe cultivos de sete dias a 35°C do fungo a ser testado com solução de inóculo apresentando turvação ajustada em espectrofotômetro ($\lambda=530\text{nm}$) às transmitâncias requeridas, de acordo com a espécie em estudo (MELHEM; SZESZS, 2010).

Em 2008 foi publicado o documento M38-A2, com alterações que incluem a recomendação dos testes, incluindo mais agentes de micoses cutâneas e invasivas (fungos dos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton* e *Scedosporium prolificans*, fungos demáceos e zigomicetos). E foram adicionados como antifúngicos a serem usados nesse método a terbinafina, griseofulvina, ciclopirox e as equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina) (NCCLS, 2008; MELHEM; SZESZS, 2010). No mesmo ano foi publicado o documento M27-A3 para testes de sensibilidade em leveduras como *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans*, não sendo recomendado para a fase leveduriforme do *B. dermatitidis* e *H. capsulatum* (NCCLS, 2008).

A adesão à metodologia proposta pelo NCCLS possibilitou uma reprodutibilidade intralaboratorial e interlaboratorial dos testes de sensibilidade antifúngica em torno de 90% (REX *et al.*, 2001).

Atualmente, existem duas metodologias internacionais para a determinação da sensibilidade de leveduras e fungos filamentosos a medicamentos antifúngicos. A primeira,

como visto, é a do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, anteriormente denominada *Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards*, NCCLS), e a segunda recomendada para avaliação da atividade antifúngica de substâncias puras pela técnica da microdiluição em caldo, pela organização europeia *Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (AFST-EUCAST) (HOSPENTHAL; MURRAY; RINALDI, 2004).

A metodologia da EUCAST é baseada nos procedimentos do protocolo M27-A2 do CLSI, mas com algumas modificações, a fim de se obter exatidão na determinação dos valores de CIM. Nela ocorre modificação no meio em que é diluído o inóculo, permanecendo o meio RPMI 1640, mas com adição de 2% de glicose; difere também quanto ao tamanho do inóculo, leitura por meio de espectrofotômetro e ponto de leitura com 50% de inibição, sendo que essa metodologia se mostrou mais vantajosa, pelo fato de reduzir o tempo de incubação necessário (24 h) para se obter um crescimento suficiente para a determinação dos valores de CIM (HOSPENTHAL; MURRAY; RINALDI, 2004).

Existem ainda outros métodos para determinar a sensibilidade antifúngica que estão em experimentação, como o Etest, microdiluição colorimétrica, disco de diluição em ágar, citometria de fluxo e quantificação da síntese de ergosterol (ARIKAN, 2007).

Acerca da interpretação dos testes de sensibilidade antifúngica *in vitro*, entretanto, há de considerar que existe certo grau de imprecisão na determinação da CIM. Além disso, os fatores inerentes ao hospedeiro geralmente são mais importantes do que os resultados dos testes de sensibilidade, sendo que a demonstração de que um microrganismo é sensível *in vitro* não significa exatamente sucesso no tratamento. Por outro lado, a resistência *in vitro* geralmente indica falha terapêutica (PFALLER; SHEERAN; REX, 2004).

A regra 60-90 observa que infecções por microrganismos que demonstram sensibilidade *in vitro* respondem apropriadamente à terapêutica com o medicamento testado em, aproximadamente, 90% dos casos, enquanto, microrganismos que demonstram resistência *in vitro* respondem em, aproximadamente, 60% dos casos (REX; PFALLER, 2002).

Assim, em virtude dessa dificuldade em correlacionar os resultados dos testes *in vitro* com a resposta *in vivo*, em caso de ser observada boa resposta *in vivo* a determinado medicamento a que o microrganismo tenha demonstrado resistência *in vitro*, devem ser observados outros fatores, como a severidade da infecção, a imunidade do indivíduo, os níveis terapêuticos adequados do medicamento no sítio-alvo e a velocidade da resposta clínica (REX; PFALLER, 2002).

Lass-Florl, Perkhofer e Mayr (2010) exprimem a ideia de que os testes de sensibilidade antifúngica devem ser indicados em pacientes com doença invasiva, após tratamento de longo prazo com azólicos, isolamentos repetidos do fungo em amostras de material clínico e em pacientes com infecção por fungos raros e doença invasiva.

2 PERGUNTAS DE PARTIDA

1 Os casos de histoplasmose por *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* em indivíduos HIV positivos no Estado do Ceará apresentam características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais diferentes das observadas em outras regiões?

2 Existe correlação, no Estado do Ceará, entre o número de internamentos por histoplasmose em indivíduos HIV positivos e o índice pluviométrico local e a velocidade dos ventos?

3 Qual o perfil de sensibilidade *in vitro* de cepas de *Histoplasma capsulatum* ante os principais agentes antifúngicos de uso terapêutico e a combinação sulfametoxazol-trimetoprim?

3 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

1 Os casos de histoplasmose por *Histoplasma capsulatum* em indivíduos HIV positivos no Estado do Ceará apresentam características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais diferentes das observadas em outras regiões.

2 Os índices pluviométricos locais e a velocidade dos ventos interferem no número de internamentos por histoplasmose em indivíduos HIV positivos no Estado do Ceará.

3 O *H. capsulatum* é sensível, *in vitro*, aos principais agentes antifúngicos de uso terapêutico e à combinação sulfametoxazol-trimetoprim.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Realizar estudo epidemiológico, clínico, laboratorial e ambiental de casos de histoplasmose por *Histoplasma capsulatum* var *capsulatum* em pacientes HIV positivos internados no Hospital São José de Doenças Infecciosas, no Estado do Ceará, Brasil.

4.2 Objetivos específicos

1 Analisar os dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais de casos de histoplasmose por *Histoplasma capsulatum* var *capsulatum* em pacientes HIV positivos internados no Hospital São José de Doenças Infecciosas, no Estado do Ceará, Brasil.

2 Correlacionar a frequência dos internamentos por histoplasmose com os índices pluviométricos locais e a velocidade dos ventos no período ora citado.

3 Determinar o potencial antifúngico, *in vitro*, das drogas antifúngicas ante as cepas de *H. capsulatum*.

4. Avaliar o efeito inibitório, *in vitro*, da combinação sulfametoxazol-trimetoprim ante as cepas de *Histoplasma capsulatum*.

5 METODOLOGIA

5.1 O desenho e o local de realização do estudo

Foi realizado um estudo retrospectivo dos casos de síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e histoplasmose durante o período de dois anos (2006 e 2007) e prospectivo dos anos de 2008, 2009 e 2010. Tratou-se de um estudo transversal, descritivo e analítico, de casos novos internados no Hospital São José de Doenças Infecciosas (HSJ) (Figura 19).

Figura 19 - Foto da entrada principal do Hospital São José de Doenças Infecciosas do Estado do Ceará



Fonte: UFC/CEMM (2010).

O Hospital São José de Doenças Infecciosas foi criado pela Lei n.º 9.387, de 31 de julho de 1970, tendo começado a funcionar já em 31 de março do mesmo ano. É um órgão com personalidade jurídica de Direito Público, pertencente ao Estado, vinculado à Secretaria da Saúde do Estado do Ceará. Seu corpo funcional é composto por cerca de 700 servidores. Possui uma área construída de 4.700m² e uma capacidade de internamento de 115 leitos, contando com sete leitos de UTI, referência em atendimento de pacientes HIV positivos nesse Estado.

Identificados os casos suspeitos ou confirmados de histoplasmose, os espécimes (aspirado de medula óssea e creme leucocitário) destes pacientes foram colhidos e semeados em meio de cultura, em duplicata, permanecendo uma amostra no referido hospital, e outra encaminhada para o Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), da Universidade Federal do Ceará.

O grupo de pesquisadores que compõem o CEMM, que tem como fundador, o Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, constituem os pioneiros no estudo da Micologia Médica do

Estado do Ceará, desenvolvendo trabalhos científicos na área de Micologia Médica Humana e Veterinária.

As amostras colhidas dos pacientes foram analisadas nos respectivos setores, sendo o CEMM escolhido por ser considerado Setor de Referência no diagnóstico de fungos patogênicos no Estado do Ceará.

5.2 Os aspectos éticos

Foi obtido parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São José sob nº 029/2007, segundo os requisitos da resolução CNS 196/96 e suas complementares que regulamentam pesquisa em seres humanos.

5.3 A população do estudo

5.3.1 Os grupos de estudo

Grupo 1 ou positivos- Pacientes soropositivos para HIV, atendidos no HSJ, durante os anos de 2006 a 2010, que apresentaram quadro clínico, exames laboratoriais e radiológicos compatíveis com histoplasmose e exame micológico (exame direto e/ou cultura) positivos para *H. capsulatum*;

Grupo 2 ou negativos - Pacientes soropositivos para HIV, atendidos no HSJ, durante os anos de 2006 a 2010, que apresentaram quadro clínico, exames laboratoriais e radiológicos compatíveis com histoplasmose e exame micológico (exame direto e/ou cultura) negativos para *H. capsulatum*.

5.3.2 Os critérios de inclusão

Foram incluídos na pesquisa todos os casos de pacientes com infecção pelo HIV, segundo os critérios de definição de caso de AIDS em adultos e crianças, do Ministério da Saúde (2004), Brasil, de todas as idades e ambos os sexos, internados no HSJ, que tiveram o primeiro diagnóstico de histoplasmose baseado nos aspectos clínicos, micológicos, laboratoriais e/ou radiológicos. Foram considerados como critérios clínicos a presença de mais de um destes sintomas: febre, manifestações de doença respiratória (tosse e dispneia), gastrintestinal (diarreia), hepatoesplenomegalia, adenomegalias ou manifestações cutâneas

(erupção papular generalizada, úlceras na orofaringe ou pele, placas infiltrativas ou descamativa, nódulos ou outra manifestação atípica). Foram critérios laboratoriais a positividade para a infecção pelo vírus HIV, níveis séricos de lactato desidrogenase (LDH) elevados, ou leucopenia ou plaquetopenia. Os padrões radiológicos incluem alterações radiológicas sugestivas de pneumopatia. O diagnóstico de histoplasmose foi confirmado mediante a identificação do *H. capsulatum* em pesquisa direta e/ou cultura a partir de amostras de diferentes tecidos.

5.3.3 Os critérios de exclusão

Foram excluídos da pesquisa todos os casos de pacientes com infecção pelo HIV, segundo os critérios de definição de caso de AIDS em adultos e crianças, do Ministério da Saúde (2004), Brasil, de todas as idades e ambos os sexos, internados no HSJ, que tiveram o diagnóstico de histoplasmose baseado nos aspectos clínicos, laboratoriais e/ou radiológicos, que foram a óbito, tiveram alta ou foram transferidos sem que o laboratório do HSJ tenha coletado amostras clínicas e/ou que não possuam prontuário arquivado no referido hospital.

5.3.4 A coleta dos dados clínicos

Foram pesquisados os arquivos do laboratório do HSJ e registros do laboratório central (LACEN) para identificação de pacientes nos quais foram realizadas pesquisa direta e/ou cultura de material biológico para fungo, assim como os registros de alta e óbito do SAME (Serviço de Arquivos Médicos e Estatística), e que constassem histoplasmose como diagnóstico definitivo à alta e óbito do paciente.

Foram colhidos dados nos prontuários referentes à admissão do paciente no primeiro internamento e no internamento com desfecho para óbito, nos casos assim observados, referentes à demografia (sexo, idade e procedência), aspectos clínicos (data do diagnóstico da histoplasmose, tempo de permanência no hospital, uso de medicamentos da terapia antirretroviral – TARV, sintomas e sinais, internamento na unidade de terapia intensiva-UTI do HSJ, histórico de patologias não infecciosas e infecciosas associadas, tratamento e evolução do paciente), diagnóstico micológico (pesquisa direta e cultura para fungos), e outros procedimentos laboratoriais, como hemograma completo, exames de avaliação da função renal (ureia e creatinina) e hepática (TGP/AST, TGO/ALT), dosagem da lactatodesidrogenase (LDH), contagem de células CD4 (sendo considerado para este os

exames realizados 3 meses antes e 3 meses após o internamento) e radiografia torácica. Foram considerados óbito por histoplasmose os casos em que a histoplasmose constava em um dos itens de causas da declaração de óbito. Foi considerada recidiva, os casos em que ocorreu novo internamento por histoplasmose e AIDS, com diagnóstico micológico positivo para histoplasmose.

5.4 As amostras clínicas

As amostras de creme leucocitário e aspirado de medula óssea dos pacientes enquadrados no estudo foram colhidas no HSJ, sendo estas baseadas nas normalizações do referido hospital. As amostras foram adquiridas de acordo com a rotina de acompanhamento dos pacientes HIV +, e os métodos de colheita seguiram todos os critérios de biossegurança adotados pelo hospital.

5.4.1 A metodologia de transporte desde o HSJ até o CEMM

As amostras foram organizadas em estantes plásticas e colocadas em caixa térmica. Na parte externa da tampa, foi colada uma etiqueta com o nome da instituição destinatária (CEMM), endereço, nome do responsável, nome da instituição remetente (HSJ), endereço, telefone e horário de envio, imediatamente transportadas ao CEMM.

5.5 As cepas de *H. capsulatum* estudadas

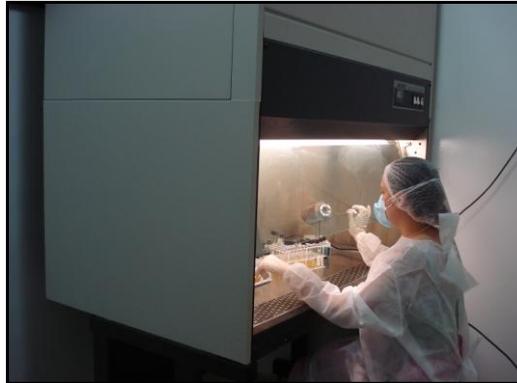
5.5.1 A caracterização macro e micromorfológica das cepas

Neste estudo, foram incluídas 92 cepas clínicas de *H. capsulatum* isoladas em diferentes regiões geoclimáticas, sendo 76 cepas oriundas de pacientes enquadrados neste estudo e 16 cepas procedentes de estados do Sudeste do Brasil, cedidas pelo Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo (Apêndice I).

As amostras biológicas oriundas da medula óssea e creme leucocitário dos pacientes procedentes do HSJ foram encaminhadas para exame direto e cultivo fúngico no Laboratório de Micologia do HSJ, sob normas de biossegurança nível 2 e, a partir da identificação do fungo *H. capsulatum*, elas foram manipuladas no CEMM em cabine de

segurança biológica classe II-B2, em laboratório de biossegurança nível 3 (Figura 20) (CORDEIRO *et al.*, 2006b).

Figura 20 - Cabine de segurança biológica classe II-B2, em laboratório de biossegurança nível 3.



Fonte: UFC/CEMM, 2010.

Os exames diretos foram corados por May-Grunwald-Giemsa, sendo os espécimes simultaneamente inoculados em ágar-Sabouraud com 2% de dextrose (Sanofi, França), ágar-Sabouraud com cloranfenicol, ágar-Mycosel® e YNB (nitrogênio levedura base) (Himedia). Os tubos foram incubados a uma temperatura de 25-28 °C, permanecendo até 30 dias sob observação, para averiguar crescimento de colônia fúngica. Após o período ora referido, caso não se identificasse crescimento visível das colônias, os exames eram considerados negativos. Os exames diretos foram observados em microscopia óptica, com objetiva de 40x, sendo considerados positivos na presença de estruturas leveduriformes intracelulares. No material processado para cultivo, após visualização das macrocolônias, sugestivas de *H. capsulatum*, estas foram visualizadas em montagem de lâmina-lamínula, coradas com lactofenol-azul-algodão à procura de estalagmosporos. Quando não ocorria a visualização desses conídios, as macrocolônias eram novamente repicadas para ágar-Lactrimel para estimular a produção de estalagmosporos (LACAZ *et al.*, 2002; WANKE; LAZÉRA, 2004). Após identificação das cepas de *H. capsulatum*, os isolados foram repicados em ágar-Sabouraud com 2% de dextrose, ágar-batata e ágar-BHI e encaminhados para os testes de sensibilidade antifúngica e estocagem (Apêndice II).

5.5.2 Estocagem e processamento das cepas de *H. capsulatum*

As cepas de *H. capsulatum* foram estocadas na micoteca do CEMM da Universidade Federal do Ceará, Brasil, registrada no WFCC (*World Federation of Culture*

Collections), sob o número 880. Os estoques foram realizados em ágar-batata a -20°C e em solução salina estéril à temperatura de 4°C e 28 °C (BRILHANTE *et al.*, 2004). No momento de serem utilizadas, as cepas foram repicadas em duplicata nos meios ágar-batata dextrose (Difco, Detroit, EUA) e ágar-infusão de cérebro-coração – BHI (Himedia, Índia), e mantidas por 7-20 dias à temperatura ambiente (28°C). Para a análise macromorfológica, foram registradas as características de relevo, textura e pigmentação das colônias. A análise micromorfológica em microscópio óptico foi realizada depois da retirada de fragmento da colônia formada, e montagem entre lâmina e lamínula, corada com lactofenol azul-algodão. As culturas positivas para *H. capsulatum* foram confirmadas pela presença de macroconídios tuberculados e hifas hialinas finas.

5.6 O teste de sensibilidade a antifúngicos *in vitro*

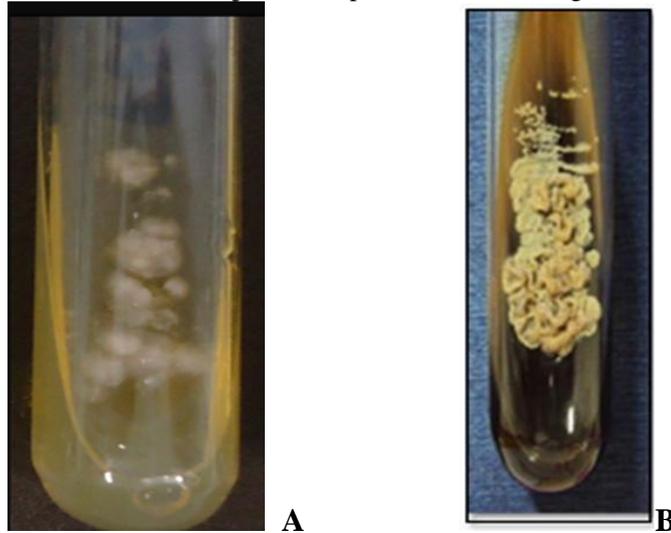
A sensibilidade antifúngica das cepas de *H. capsulatum* foi avaliada pelo método de microdiluição de acordo com o protocolo descrito no documento M27-A2, padronizado pelo CLSI (NCCLS, 2002), modificado por Brilhante *et al.* (2010). Os testes foram preparados em meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA.) tamponado com MOPS (Sigma Chemical Co., USA). As cepas foram testadas *in vitro* ante os antifúngicos anfotericina B, fluconazol, Itraconazol, voriconazol e caspofungina, e ante a combinação sulfametoxazol/trimetoprim. Os resultados foram analisados de acordo com os critérios propostos pelo CLSI para determinação de sensibilidade a drogas antifúngicas.

5.6.1 Preparação do inóculo para teste de sensibilidade antifúngica

O inóculo foi preparado conforme descrito por Brilhante *et al.* (2010). As cepas de *H. capsulatum* foram cultivadas em ágar-BHI e incubadas por sete dias à temperatura ambiente (28 °C) (Figura 21A). Para obter as cepas na fase leveduriforme, fragmentos da colônia em fase filamentosa foram incubados em ágar-BHI com 10% de sangue de carneiro a 35°C e mantidos por repiques semanais (FRESSATTI *et al.*, 1992; BRILHANTE *et al.*, 2010) (Figura 21B). Para preparação do inóculo, 1 ml de solução salina estéril foi adicionada a cada cultura e com auxílio de alça microbiológica foram realizadas raspagens da superfície do micélio. As suspensões foram transferidas para tubos de ensaio estéreis contendo 4 mL de solução salina 0,9%, submetidas a agitação em vórtex por cinco segundos, e deixadas em repouso a 28°C por 5 minutos. O sobrenadante foi lido em espectrofotômetro a 530 nm e a sua transmitância ajustada para 90-95%. Quando necessário, a suspensão era ajustada com

solução salina até se alcançar uma turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de Mcfarland. Em seguida, as suspensões foram diluídas na proporção de 1:10 com RPMI 1640 tamponado com MOPS 0,156M a pH 7,0, para obtenção de inóculo de aproximadamente $0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^4$ ufc.mL⁻¹(BRILHANTE *et al.*, 2010).

Figura 21 – A- Cultura de *H. capsulatum* na fase filamentosa obtida em BHI a 28°C. B- Cultura de *H. capsulatum* na fase leveduriforme obtida em ágar-BHI suplementado com sangue de carneiro a 10% e à 35°C.



Fonte: UFC/CEMM, 2010.

5.6.2 Drogas antimicrobianas

As suspensões de anfotericina B (AMB) (Sigma Chemical Corporation, USA), fluconazol (FLU) (Merck Sharp & Dohme, Brazil), itraconazol (ITR) (Janssen Research Foundation, Belgium), voriconazol (VRZ) (Pfizer Pharmaceuticals, USA) e caspofungina (CAS) (Merck Sharp & Dohme, Brazil) foram preparadas conforme descrito por Brillhante *et al.* (2010). Para o teste de sensibilidade a antifúngicos, soluções-estoque de anfotericina B e itraconazol foram preparadas em dimetilsulfóxido a 100% (DMSO) (Merck, Darmstadt, Germany); fluconazol, voriconazol e caspofungina foram diluídos em água destilada estéril, em cabine de segurança biológica, conforme descrito por Cordeiro *et al.* (2006). Todas as soluções foram estocadas a -20°C até a realização do ensaio, quando foram diluídas seriadamente em escala 1:2 em RPMI 1640, com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, e tamponado com pH 7.0 com 0,165 M MOPS. As concentrações finais variaram como se segue no quadro 2.

QUADRO - 2 - Drogas antifúngicas e concentrações testadas

Antifúngicos	Concentração inicial ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração final ($\mu\text{g/mL}$)
Anfotericina B	0,002	1,0
Fluconazol	0,98	500
Itraconazol	0,0001	0,06
Voriconazol	0,002	1,0
Caspofungina	0,016	64

Para o teste com a sulfametoxazol/trimetoprim (SMX/TMP), foi utilizada a solução comercial injetável da combinação de agentes (ROCHE, Brasil), a qual foi estocada à temperatura de 15-30°C, conforme orientação do fabricante. O intervalo final de concentração testado da combinação de SMX/TMP para cada cepa foi de 0.039/0.0078 – 20/4 mg mL⁻¹.

5.6.3 Teste de sensibilidade *in vitro*

O teste de sensibilidade pelo método de microdiluição foi realizado conforme protocolo descrito no documento M27-A2, padronizado pelo CLSI, descrito por Brilhante *et al.* (2010). Inicialmente, as cepas foram testadas isoladamente para determinar a concentração inibitória mínima.

Após a limpeza do fluxo laminar, com álcool a 70%, e manutenção de luz ultravioleta por 15 minutos, em cabine de segurança biológica classe II-B2, em laboratório de biossegurança nível 3, foram utilizadas placas estéreis de 96 micropoços com fundo arredondado em forma de U, onde foram distribuídos, com o auxílio de um pipetador automático, 100 μl do meio RPMI 1640 em cada micropoço.

Em seguida, foram adicionados 100 μl do antifúngico na primeira coluna, diluído de forma seriada até a décima coluna e, por fim, 100 μl da suspensão do fungo foram distribuídos em cada poço. Controles positivos de crescimento e esterilidade foram incluídos para cada isolado testado.

Os resultados foram lidos visualmente e a CIM foi determinada após intervalo de sete dias de incubação das microplacas à temperatura ambiente (28°C) para fase filamentosa e cinco dias a 35°C para fase leveduriforme.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como se segue:

- azólicos e caspofungina — menor concentração da droga capaz de inibir 80% do crescimento visível do fungo, quando comparado ao controle da droga (CLSI, 2002; CORDEIRO *et al.*, 2006);

- AMB e SMX-TMP — menor concentração da droga na qual não há crescimento fúngico (CLSI, 2002; YEKUTIEL *et al.*, 2004; CORDEIRO *et al.*, 2006).

A concentração fungicida mínima (CFM) para cada antifúngico foi determinada após semeadura de 100 µL do material referente ao último poço que mostrava crescimento do fungo, e aos poços em que não se observava crescimento visível, em ágar-batata dextrose, seguida de incubação a 35°C por 15 dias. Para o *H. capsulatum*, a CFM foi definida como a menor concentração da droga em que não se observa crescimento fúngico (LI *et al.*, 2000).

5.7 Controles de qualidade

As cepas de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258 recomendadas pelo documento M27-A2 do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (CLSI, 2002) foram utilizadas como controle nos testes de sensibilidade a antifúngicos, sendo as CIM das drogas para essas cepas obtidas de acordo com o protocolo. Nos testes de sensibilidade com sulfametoxazol/trimetoprim (SMX/TMP), foi utilizado controle positivo com anfotericina B em 84 cepas de *H. capsulatum* na forma filamentosa e 8 cepas na forma leveduriforme. O controle de qualidade da SMX/TMP foi realizado com *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. As placas foram colocadas em estufa na temperatura de 35°C e lidas após cinco, seis e sete dias de incubação (CLSI, 2002).

5.8 Análise ambiental

Foi realizada análise dos índices pluviométricos e da velocidade dos ventos coletados das Plataformas de Coleta de Dados pertencentes à FUNCEME (Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos) em Fortaleza, de janeiro de 2006 a dezembro de 2010, e correlacionada com o número de internamentos por histoplasmoze no HSJ no mesmo período.

5.9 Análise estatística

Os dados clínicos foram analisados mediante os testes de T-Student e do qui-quadrado, para variáveis normalmente distribuídas e, quando necessárias, outras análises paramétricas, e teste Mann-Whitney, para variáveis não normalmente distribuídas.

O teste de Mann-Whitney foi utilizado para análise das combinações sinérgicas e os resultados foram expressos como média, e um p-valor <0.05 foi considerado significativo.

Para análise da diferença de CIM e CFM da sulfametoxazol/trimetoprim, entre as cepas do NE e SE, foi utilizado o teste t-Student para dados independentes, sendo considerado o p-valor 5% para conclusões definitivas e entre 5% e 10% para indícios conclusivos.

6 RESULTADOS

6.1 Características gerais da população estudada

No período de janeiro de 2006 a dezembro de 2010, foram avaliados 254 casos novos de indivíduos com diagnóstico de histoplasmose e AIDS internados no HSJ, sendo 39 casos (15,35%) em 2006, 66 (25,98%) em 2007, 54 (21,26%) em 2008, 57 (22,44%) em 2009 e 38 (14,96%) em 2010 (Tabela 1). O número total corresponde a 3,0% dos internamentos no HSJ por qualquer patologia e a 6,32% dos internamentos por AIDS no hospital. O número de casos entre os anos de 2006 e 2010 não possui diferença significativa ($p=0,0719$). Dos 254 casos, 208 (81,9%) apresentaram positividade ao exame micológico (exame direto e/ou cultura) (grupo dos positivos) e 46 (18,1%) tiveram exame micológico negativo (grupo dos negativos).

TABELA 1 - Número de internamentos no HSJ por casos novos de histoplasmose e AIDS, entre janeiro de 2006 e dezembro de 2010.

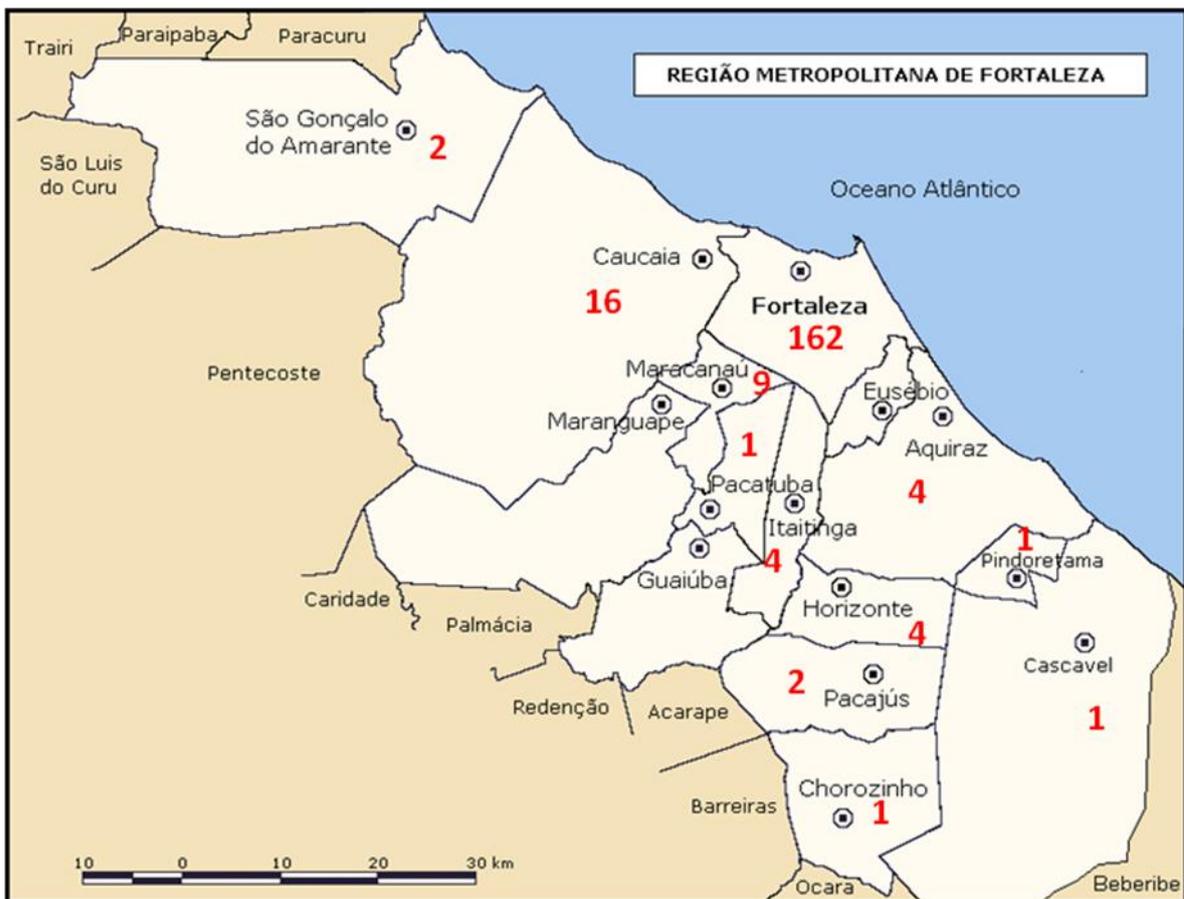
Ano	Positivos (N)	Negativos (N)	Total (N)	%
2006	32	7	39	15,35
2007	56	10	66	25,98
2008	41	13	54	21,26
2009	47	10	57	22,45
2010	32	6	38	14,96
Total	208	46	254	100

Do total, 83,1% (211/254) dos indivíduos eram do sexo masculino e 16,9% (43/254) do sexo feminino, com relação 4,9: 1 e idade média de 35,8 e 35,1 anos, respectivamente, sendo a idade mínima de 7 anos e máxima de 70. Em relação à distribuição geográfica, 80,7% (205/254) residiam na Região Metropolitana de Fortaleza (RMF) (Figura 22) e 19,3% (49/254) nas demais cidades do Estado do Ceará (Tabela 2). Entende-se como RMF, de acordo com a Lei Complementar nº 18, de 29/12/1999, os seguintes municípios: Aquiraz, Caucaia, Euzébio, Fortaleza, Guaiúba, Horizonte, Itaitinga, Pacatuba, Pacajus, Chorozinho, Maranguape, Maracanaú e São Gonçalo do Amarante (Figura 23).

TABELA 2 - Principais características epidemiológicas dos casos novos internados no HSJ por histoplasmose e AIDS entre, janeiro de 2006 e dezembro de 2010.

DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	Positivos N (%)	Negativos N (%)	Nº Total (%)
Média de idade			
Homem 35,8 anos	170 (81,7%)	41 (89,1%)	211 (83,1)
Mulher 35,1 anos	38 (18,3%)	5 (10,9%)	43 (16,9)
Razão entre os sexos			
	4,9:1	4,9:1	4,9:1
Origem geográfica			
Região Metropolitana de Fortaleza	167 (80,3%)	38 (82,6%)	205 (80,7%)
Demais cidades do Estado do Ceará	41 (19,7%)	8 (17,4%)	49 (19,3%)

Figura 22 – Mapa da Região Metropolitana de Fortaleza (RMF), com destaque para os municípios com casos de histoplasmose em indivíduos HIV positivos (N=254)



Fonte: Adaptado de IPLANCE (2010).

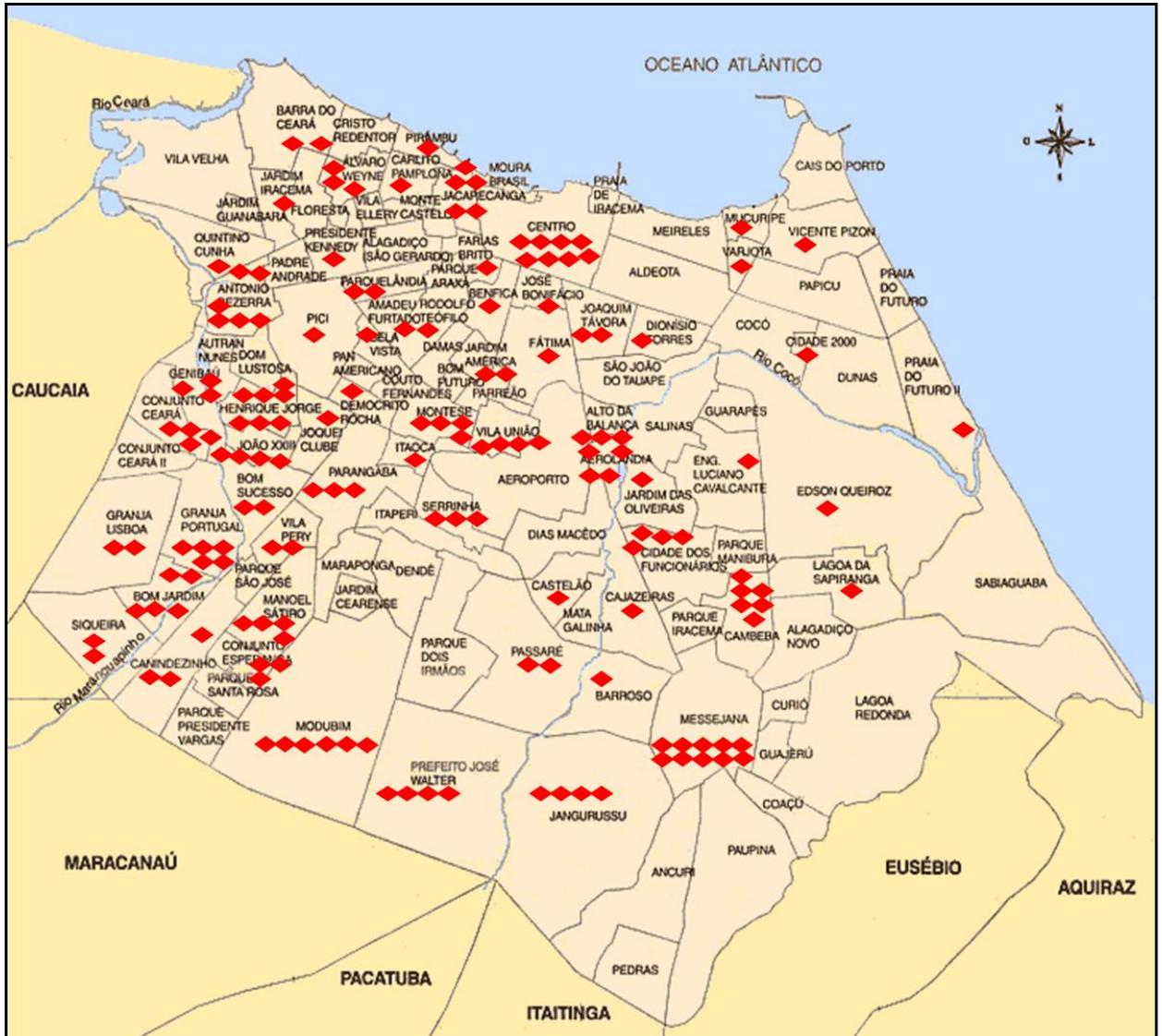
Figura 23 – Mapa do Estado do Ceará com destaque para os municípios com casos de histoplasmoze em indivíduos HIV positivos (N=254)



Fonte: Adaptado de IPLANCE (2010).

Os casos oriundos do Município de Fortaleza estão distribuídos entre os bairros da capital do Estado do Ceará de acordo com a figura 24.

Figura 24 – Mapa da cidade de Fortaleza com destaque para a distribuição dos casos novos de histoplasmose em pacientes HIV positivos internados no HSJ (N=254)



Fonte: Adaptado de IPLANCE (2010).

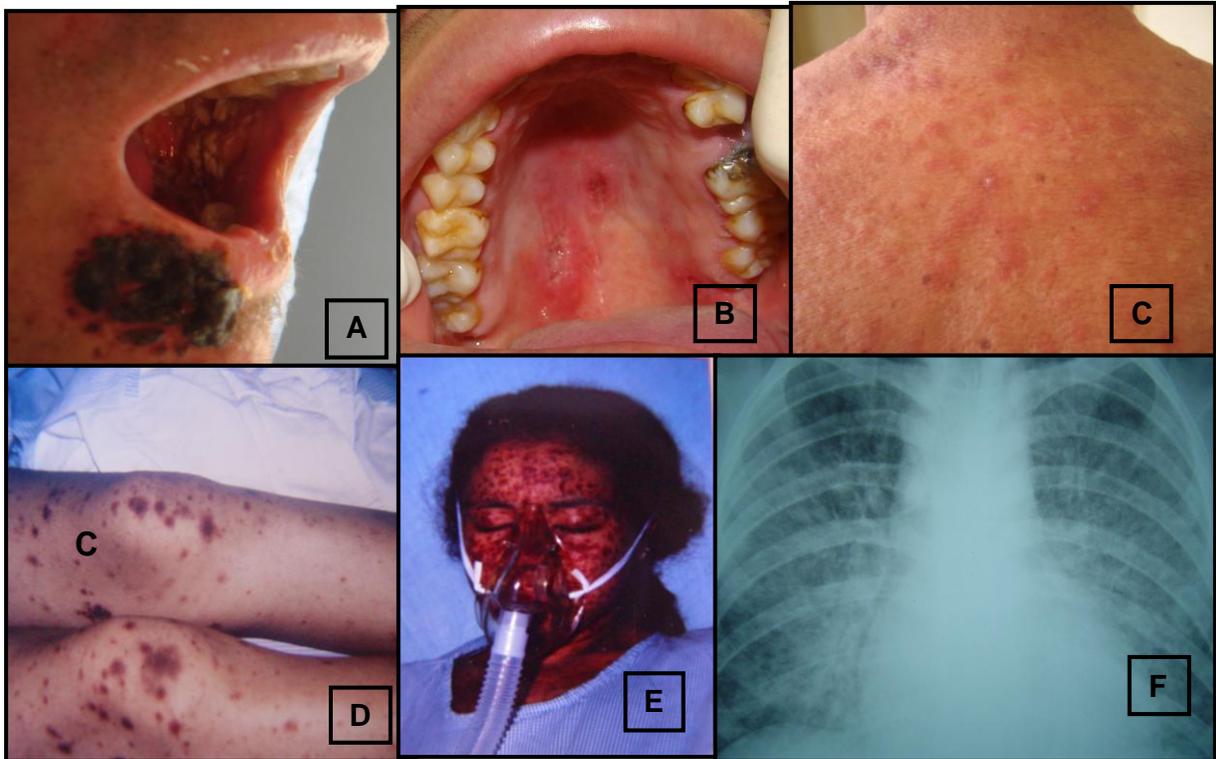
6.2 Características clínicas da população estudada

Em 39,37% (100/254) dos casos, a histoplasmose foi o primeiro evento definidor de AIDS, e em 60,63% (154/254) já havia diagnóstico anterior de AIDS. E, destes, 66,2% (102/254) não estavam realizando tratamento com terapia antirretroviral (TARV). Não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos dos positivos e dos negativos. Os aspectos clínicos dos pacientes estão relacionados na tabela 3 (Figura 25).

TABELA 3. Manifestações clínicas da histoplasmose em pacientes com AIDS no Ceará, entre janeiro de 2006 e dezembro de 2010.

Aspectos Clínicos e Radiológicos N (%)		Negativos (N=46)	Positivos (N=208)
Sintomas gerais (N=254)	Febre	42 (91,3%)	195 (93,8%)
	Perda de peso	39 (84,8%)	181 (87,0%)
	Anorexia	28 (60,9%)	150 (72,1%)
	Adinamia	31 (67,4%)	117 (56,3%)
	Cafaleia	9 (19,6%)	39 (18,8%)
	Linfadenopatia	6 (13,0%)	32 (15,4%)
Sintomas pulmonares (N=254)	Tosse	28 (60,9%)	158 (76,0%)
	Dispneia	23 (50,0%)	104 (50,0%)
	Dor pleurítica	5 (10,9%)	16 (7,7%)
Sintomas digestivos (N=254)	Diarreia	27 (58,7%)	111 (53,4%)
	Vômitos	15 (32,6%)	49 (23,6%)
Hepatomegalia (N=254)		20 (43,5%)	126 (60,6%)
Esplenomegalia (N=254)		18 (39,1%)	102 (49,0%)
Lesões cutâneas (N=40)	Eritema	2 (5%)	15 (37,5%)
	Pápula	2 (5%)	12 (30,0%)
	Eritema + pápula	--	9 (22,5%)
Infecções oportunistas associadas (N=254)	Candidíase	14 (30,4%)	70 (33,7%)
	Tuberculose	6 (13,0%)	37 (17,8%)
	Herpes	1 (2,2%)	9 (4,3%)
	Calazar	1 (2,2%)	5 (2,4%)
	Hepatite	--	2 (1,0%)
	Neurotoxoplasmose	3 (6,5%)	10 (4,8%)
	Citomegalovirose	--	1 (0,5%)
	Complexo <i>M. avium</i>	1 (2,2%)	--
Exame radiológico (N=219)	Infiltrado intersticial	19 (55,9%)	123 (66,5)
	Derrame pleural	--	23 (12,4%)
	Infiltrado reticulonodular	--	4 (2,2%)
	Infiltrado misto	--	4 (2,2%)
	Infiltrado alveolar	1 (2,9%)	1 (0,5%)
	Doença fibrocavitária	1 (2,9%)	1 (0,5%)

Figura 25 - Aspectos clínicos da histoplasmose – A – Lesão purpúrica perioral e candidíase oral; B – Lesões ulceradas em palato; C - Lesões eritemato-papulosas em dorso; D - Lesões purpúricas em membros inferiores; E – Lesões purpúricas disseminadas; F – Radiografia de tórax demonstrando infiltrado intersticial difuso.



Fonte: Fotos gentilmente cedidas pela Prof. Dra. Terezinha do Menino Jesus Silva Leitão

6.3 Características laboratoriais da população estudada

6.3.1 Exames hematológicos e radiológicos

A contagem de CD4 foi realizada em 143 pacientes, sendo que, destes, 120 pertenciam ao grupo dos positivos, e as tabelas 4 e 5 demonstram que 80,4% (115/143) do total apresentavam contagem de CD4 menor ou igual a 100 células/ml, enquanto entre o grupo dos positivos esse evento ocorreu em 85,8% (103/120) dos casos. Foram observados no total de 254 casos: níveis de hemoglobina abaixo de 8 g/dl, em 44,1 % (112/254) dos casos, contagem de leucócitos menor do que 3500 células/mm³ em 56,3%% (143/254) e contagem de plaquetas menor do que 100000 células/mm³ em 53,1% (135/254) dos indivíduos. Foram observados níveis elevados de lactatodesidrogenase (LDH) em 99,2% (249/251) dos pacientes avaliados com média de 3544 ± 3402 U/l (164-14868 U/l). Houve comprometimento da função hepática demonstrada por meio dos níveis elevados de aspartato-

aminotransferase (AST/TGO) em 200 (79,7%) dos 251 pacientes avaliados, com média de resultado cinco vezes mais elevada do que os valores normais e percentual de 65,9% (165/249) dos pacientes com elevados níveis de alanina-aminotransferase (ALT/TGP). Observou-se comprometimento da função renal em 25,2% (63/250) dos casos com níveis de creatinina sérica maior do que 1,4 U/l. Não existe diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos, quanto aos aspectos laboratoriais.

TABELA 4 - Resultados dos exames laboratoriais em pacientes com histoplasmosse e AIDS no Ceará, entre Janeiro de 2006 e dezembro de 2010 - grupo dos positivos.

Resultados hematológicos	N	Média	n (%)	Varição
Contagem de células CD4 (/mm ³)	120	53 ± 55,1		2-303
1-50			75 (62,5%)	
51-100			28 (23,3%)	
101-200			14 (11,7%)	
>200			3 (2,5%)	
Hemoglobina (g/dl)	208	8,56 ± 2,03		3,7-15,2
≤8.0			90 (43,3%)	
8.0-11.5			105 (50,4%)	
>11.5			13 (6,3%)	
Leucócitos (cells/mm ³)	208	4297 ± 3822		500-32000
<3500			111 (53,4%)	
≥3500			97 (46,6%)	
Contagem de plaquetas (/mm ³)	208	117228 ± 100041		117-642000
<100 000			108 (51,9%)	
100 000-150 000			44 (21,2%)	
≥150 000			56 (26,9%)	
Aspartato aminotransferase-AST (IU/l) (TGO)	205	174 ± 167		8-856
≤34			40 (19,5%)	
≥35			165 (80,5%)	
Alanina aminotransferase-ALT (IU/l) (TGP)	203	64,9 ± 63,0		4-493
≤44			67 (33,0%)	
≥45			136 (67,0%)	
Lactato desidrogenase-LDH (IU/l)	205	3852 ± 3576		164-14868
Aumento < 2x			19 (9,3%)	
Aumento ≥ 2x			186 (90,7%)	
Creatinina (mg/dl)	205	1,5 ± 2,03		0.3-12,8
≤0.7			60 (29,3%)	
0.8 -1.3			94 (45,8%)	
≥1.4			51 (24,9%)	

Legenda: Valores normais: aspartato aminotransferase (TGO) ≤ 34 UI/l, alanina aminotransferase (TGP) ≤ 44 UI/l, lactato desidrogenase ≤ 225 UI/l, creatinina ≤ 1,3 U/l.

TABELA 5 - Resultados dos exames laboratoriais em pacientes com histoplasmoses e AIDS no Ceará, entre Janeiro de 2006 e dezembro de 2010 - grupo dos negativos.

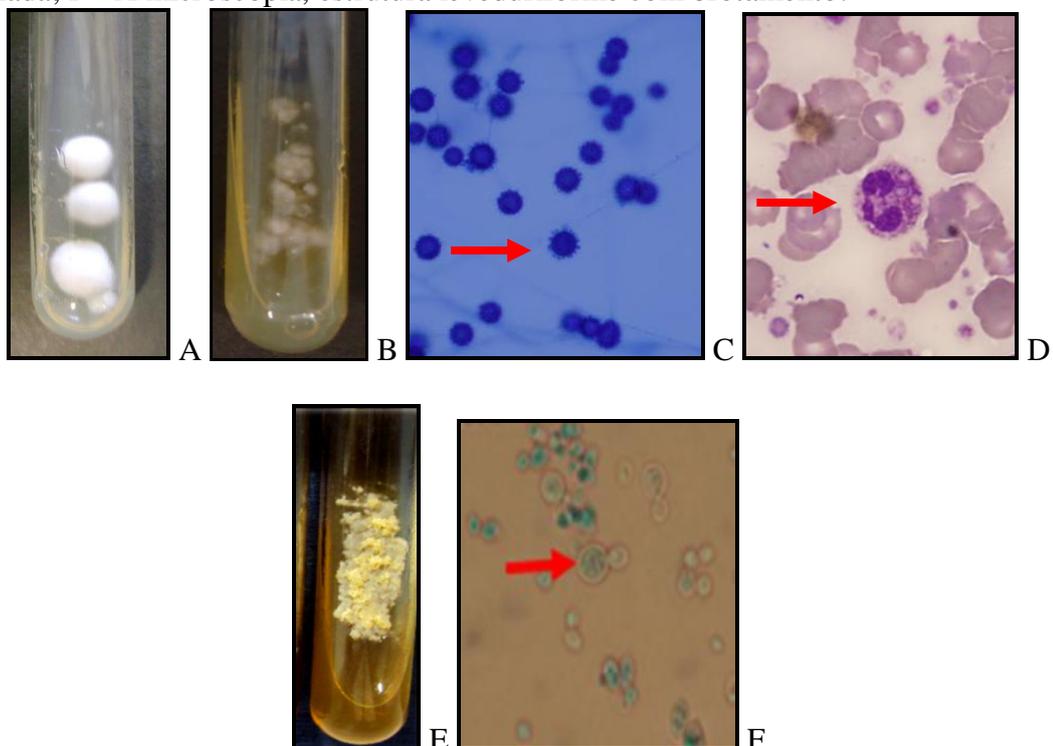
Resultados hematológicos	N	Média	n (%)	Varição
Contagem de células CD4 (/mm ³)	23	103 ± 94,2		2-305
1-50			11 (47,9%)	
51-100			1 (4,3%)	
101-200			6 (26,1%)	
>200			5 (21,7%)	
Hemoglobina (g/dl)	46	8,25 ± 1,95		3,8-12,1
≤8.0			22 (47,8%)	
8.0-11.5			22 (47,8%)	
>11.5			2 (4,4%)	
Leucócitos (cells/mm ³)	46	3369 ± 3322		400-19000
<3500			32 (69,6%)	
≥3500			14 (30,4%)	
Contagem de plaquetas (/mm ³)	46	119180 ± 156368		3700-1000000
<100 000			27 (58,7%)	
100 000-150 000			9 (19,6%)	
≥150 000			10 (21,7%)	
Aspartato aminotransferase-AST (IU/l) (TGO)	46	166 ± 155		13-716
≤34			11 (23,9%)	
≥35			35 (76,1%)	
Alanina aminotransferase-ALT (IU/l) (TGP)	46	65,4 ± 61,9		8-324
≤44			18 (39,1%)	
≥45			28 (60,9%)	
Lactato desidrogenase-LDH (IU/l)	46	2175 ± 1994		272-9191
<452			5 (10,9%)	
≥452			41 (89,1%)	
Creatinina (mg/dl)	45	3,6 ± 14,9		0.3-101
≤0.7			5 (11,1%)	
0.8 -1.3			28 (62,2%)	
≥1.4			12 (26,7%)	

Legenda: Valores normais: aspartato aminotransferase (TGO) ≤ 34 UI/l, alanina aminotransferase (TGP) ≤ 44 UI/l, lactato desidrogenase ≤ 225 UI/l, creatinina ≤ 1,3 U/l.

6.3.2 Diagnóstico micológico

H. capsulatum foi encontrado em 81,9% (208/254) exames. Destes 92,3% (192/208) através do cultivo de amostras e 51,4% (107/208) por meio da pesquisa direta, com 43,8% (91/208) de positividade em ambas as técnicas de identificação, 7,7% (16/208) dos casos positivos apenas na pesquisa direta e 48,6% (101/208) apenas na cultura. É importante destacar o fato de que 18,1% (46/254) dos pacientes tiveram o diagnóstico de histoplasmose baseado apenas nos aspectos clínicos, epidemiológicos e exames laboratoriais (exceto exame micológico) (Figura 26). As cepas repicadas em meio YNB não demonstraram crescimento visível após 30 dias de incubação.

Figura 26 - *H. capsulatum*: A e B - aspecto macromorfológico em ágar-batata dextrose e ágar-BHI, demonstrando colônia algodoadosa branca; C - aspecto micromorfológico em lactofenol azul de algodão, mostrando os macroconídios tuberculados (estalagmosporos); D - Exame direto de amostra de lavado broncoalveolar demonstrando forma parasitária dentro de macrófago polimorfonucleado; E - forma leveduriforme a 37°C em ágar-BHI suplementado com sangue de carneiro a 10% demonstrando colônias de aspecto úmido e coloração branco-amarelada; F - À microscopia, estrutura leveduriforme com brotamento.



Fonte: UFC/CEMM (2010).

6.4 Características do tratamento e evolução

O tratamento de escolha em 88,2% (224/254) dos casos foi anfotericina B, com média de 8,2 dias (contados da data do internamento) para iniciar a instituição da terapêutica. Não foi verificada diferença significativa no tempo entre a internação e o início do tratamento entre os grupos de óbito e não óbito ($p=0,0812$). Há, porém, uma relação significativa entre os pacientes tratados e óbitos ($p=0,0040$), de tal modo que o percentual de pacientes que foram a óbito é maior entre os pacientes que não foram tratados. Dentre a população de 254 casos estudada, dois pacientes foram submetidos a tratamento com itraconazol. Óbito ocorreu em 41,7% dos casos (106/254). Recidiva sucedeu em 13,0% dos casos (33/254), havendo evidência de relação entre a realização do tratamento e a recidiva ($p=0,0322$), sendo a recidiva maior entre os tratados. Não foi verificada relação entre recidiva e óbito ($p=1,0000$).

Em 11% (28/254) dos casos, não foi instituído tratamento com antifúngicos e, desses, 67,9% (19/28) foram a óbito. Entre os pacientes tratados com anfotericina B, 38,5% (87/226) foram a óbito. Dentre os que foram a óbito, o tempo de hospitalização dos pacientes tratados é superior ao tempo de hospitalização dos que não foram tratados ($p=0,0005$).

Na comparação entre os pacientes dos grupos dos positivos e negativos, não há diferença significativa no percentual de óbitos ($p=0,7430$), valendo ressaltar, porém, que todos os pacientes negativos tiveram tratamento, sendo 44 com anfotericina B e dois com itraconazol, com óbito observado em 39,1% (18/46) dos pacientes, e, nestes 18 pacientes, o tempo de hospitalização média no hospital foi de 19 dias antes do óbito.

Dentre os fatores de risco para o óbito, à admissão hospitalar, foram observados no grupo dos positivos: níveis séricos elevados de AST/TGO, observação ao exame radiológico de infiltrado intersticial, queixa de anorexia, infiltrado difuso, dispneia, níveis séricos elevados de creatinina e presença de derrame pleural (Tabela 6).

TABELA 6 – Fatores associados ao óbito em pacientes com histoplasmose e AIDS no Ceará, entre janeiro de 2006 e dezembro de 2010.

FATORES ASSOCIADOS AO ÓBITO	ÓBITOS	
	N	%
Níveis séricos de AST/TGO > 34 IU/l	65	90,3
Infiltrado intersticial	52	80,0
Anorexia	55	76,4
Infiltrado difuso	43	66,2
Dispneia	45	62,5
Níveis séricos de creatinina > 1,4 mg/dl	25	36,2
Derrame pleural	12	18,5
Sem tratamento com antifúngico	11	15,3
Infiltrado misto	4	6,2

6.5 Aspectos ambientais

Segundo análise da FUNCEME (<http://www.funceme.br/areas/tempo-e-clima>), a quadra chuvosa de 2006 (fevereiro a maio) foi considerada normal. As chuvas foram bem distribuídas no tempo, ou seja, não houve registro de veranicos prolongados (períodos de estiagem), e no espaço, com chuvas regulares em quase todos os municípios do Ceará.

No ano de 2007, ocorreu uma predominância do evento La Nina. Estas características térmicas foram responsáveis pela descida e localização da Zona de Convergência Intertropical (ZCIT) sobre o norte da Região Nordeste, causando chuvas intensas em toda a Região e no Estado do Ceará.

A quadra chuvosa de 2008 (fevereiro a maio) foi classificada na categoria acima da média, com valor 11,6% superior à média histórica. As chuvas foram relativamente bem distribuídas no tempo e no espaço. Segundos dados da FUNCEME, foi registrado um total significativo de chuva na segunda quinzena de março e na primeira de abril de 2008, acarretando enchentes em alguns municípios.

A quadra chuvosa de 2009 (fevereiro a maio) foi classificada na categoria acima da média, com valor de precipitação 59% acima da média histórica no Estado do Ceará. Desde 1985, não havia uma quadra chuvosa com esses valores.

Em relação à velocidade dos ventos, o Estado do Ceará recebe influência dos ventos alísios, sendo que o período de ventos mínimos coincide perfeitamente com o período

chuvoso do Estado (1º semestre); e tempo de ventos máximos, com o período mais seco do Estado (2º semestre).

A distribuição da frequência de casos novos internados no HSJ com diagnóstico de histoplasmoze disseminada e AIDS ao longo dos anos não possui diferença estatisticamente significativa, bem como não foi observada sazonalidade dentro dos meses de cada ano, tanto em relação à pluviometria, como à velocidade dos ventos (Figuras 27 e 28).

Figura 27 – Correlação entre índices pluviométricos e número de casos novos internados por histoplasmoze e AIDS no HSJ de janeiro de 2006 a dezembro de 2010.

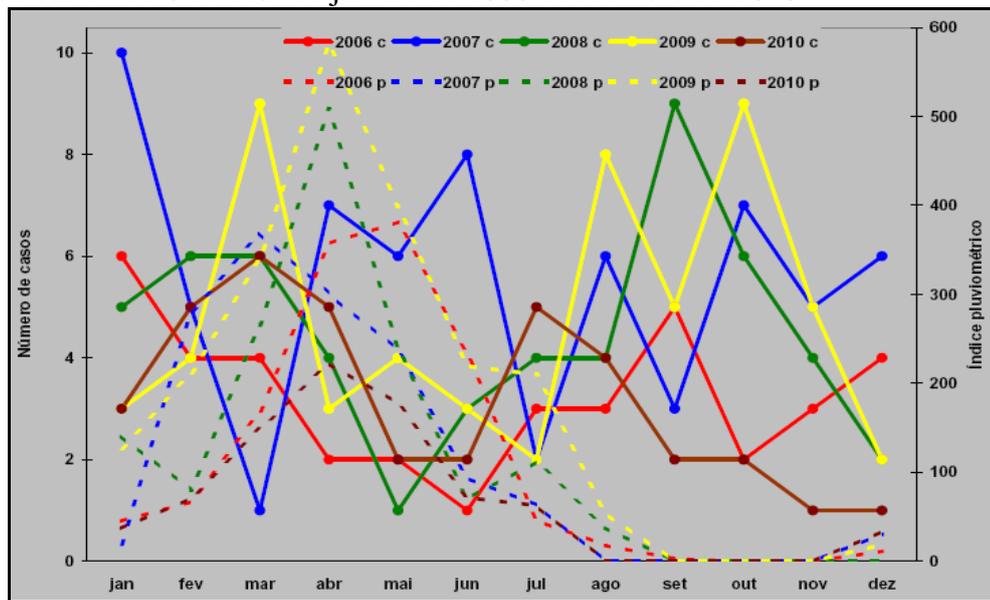
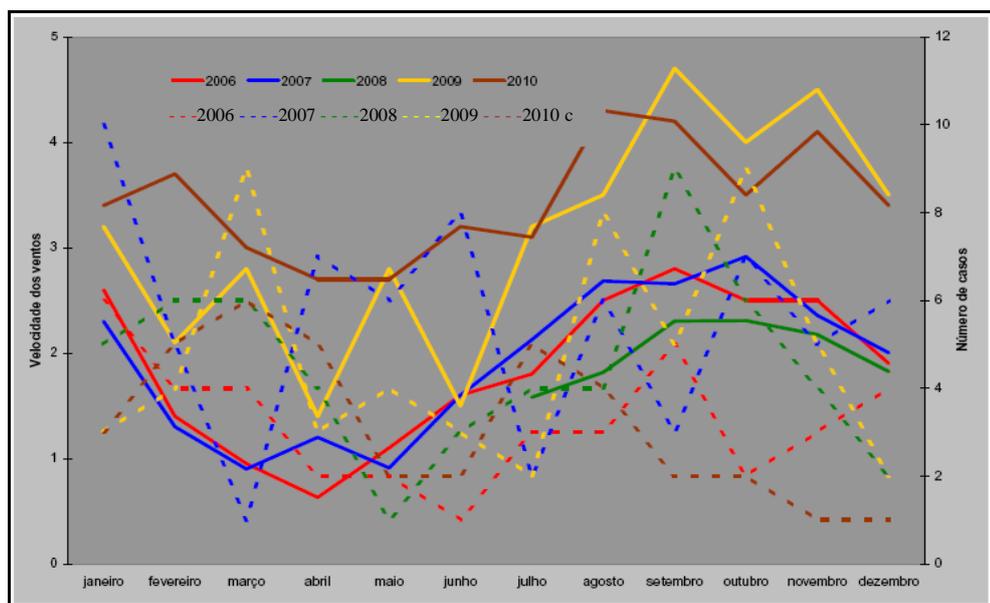


Figura 28 – Correlação entre a velocidade dos ventos e número de casos novos internados por histoplasmoze e AIDS no HSJ de janeiro de 2006 a dezembro de 2010.



6.6 Teste de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de cepas de *Histoplasma capsulatum* ante os antifúngicos

As cepas de *H. capsulatum*, oriundas das regiões Nordeste (NE) e/ou Sudeste (SE), testadas, apresentaram variação na resposta aos antifúngicos avaliados, conforme demonstrado na tabela 7. Todas as cepas de *H. capsulatum* foram inibidas pelos antifúngicos testados.

TABELA 7 - Variação da CIM dos antifúngicos ante cepas de *H. capsulatum* oriundas do Nordeste (NE) ou Sudeste (SE) do Brasil.

Antifúngicos	NORDESTE CIM (µg/mL)				SUDESTE CIM (µg/mL)			
	Forma Filamentosa n=68		Forma Leveduriforme n=8		Forma Filamentosa n=16		Forma Leveduriforme n=2	
	Variação	Média	Variação	Média	Variação	Média	Variação	Média
AnfotericinaB	0,0078-0,5	0,12	0,06-0,5	0,16	0,03-0,25	0,09	0,0156-0,0625	0,03
Fluconazol	3,9-125	36,36	3,9-7,8	5,52	1,95-250	31,07	31,25	31,25
Itraconazol	0,001-0,0312	0,0073	0,0039-0,03	0,016	0,0005-0,03	0,0036	0,0156-0,03	0,022
Voriconazol	0,0078-0,5	0,097	0,002-0,03	0,010	0,0078-0,5	0,048	0,002-0,0039	0,0028
Caspofungina	0,016-32	3,65	1-4	2,0	0,125-16	1,76	0,5-1	0,071

A análise estatística demonstra que, na forma filamentosa, a CIM das drogas ITR ($p=0,0072$) e VRZ ($p=0,0490$) é maior no NE do que no SE, não havendo diferença significativa nessa comparação entre as demais drogas. Na forma leveduriforme, a CIM da droga VRZ ($p=0,0263$) é maior no NE do que no SE, e do FLU ($p=0,0001$) é maior no SE do que no NE, não havendo diferença significativa nessa comparação entre as demais drogas.

No NE, a CIM das drogas CAS ($p=0,0000$), FLU ($p=0,0000$) e VRZ ($p=0,0000$) é maior na forma filamentosa do que na leveduriforme, não havendo diferença significativa nessa comparação entre as demais drogas.

E no SE a CIM da droga ITR ($p=0,0059$) é maior na forma leveduriforme do que na filamentosa, não havendo diferença significativa nessa comparação entre as demais drogas.

Quanto à Concentração Fungicida Mínima (CFM), todas as cepas de *H. capsulatum* foram mortas pelos antifúngicos testados, conforme demonstrado na tabela 8. A CFM das drogas CAS ($p=0,0124$), ITR ($p=0,0006$) e VRZ ($0,0066$) é maior no NE do que no SE, não havendo diferença significativa nessa comparação entre as demais drogas.

TABELA 8 - Variação da CFM dos antifúngicos ante cepas de *H. capsulatum*, na forma filamentosa, oriundas do Nordeste (NE) ou Sudeste (SE) do Brasil.

Antifúngicos	NORDESTE CFM (µg/mL)		SUDESTE CFM (µg/mL)	
	Variação	Média	Variação	Média
Anfotericina B	0,008-1	0,17	0,063-0,5	0,16
Fluconazol	7,1-500	98,74	3,9-500	74,32
Itraconazol	0,00195-0,0625	0,02	0,00195-0,0625	0,01
Voriconazol	0,02-1	0,26	0,03-1	0,12
Caspofungina	0,016-32	10,32	0,125-16	5,19

6.7 Teste de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de cepas de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* ante a combinação sulfametoxazol/trimetoprim (SMX/TMP)

Todas as cepas de *H. capsulatum* foram inibidas pelo SMX/TMP, com CIM variando de 0,039 – 0,0078 a 0,625 – 0,125 mg/ml para forma filamentosa e de 0,0025/0,0005 – 0,02/0,004 mg/ml para a forma leveduriforme.

As cepas oriundas do Nordeste brasileiro apresentam CIM superior, com média de 0,1544 mg/mL para sulfametoxazol e 0,0309 mg/mL para trimetoprim, na forma filamentosa, e média de 0,0141 mg/mL para sulfametoxazol e 0,0028 mg/mL para trimetoprim, na forma leveduriforme, comparadas com cepas do Sudeste, com média de 0,1152 mg/mL para sulfametoxazol e 0,0230 mg/mL para trimetoprim na forma filamentosa e de 0,0079 mg/mL para sulfametoxazol e 0,0016 mg/mL para trimetoprim na forma leveduriforme. A disposição da CIM pode ser observada na tabela 9.

TABELA 9 - CIM de SMX/TMP ante cepas de *H. capsulatum* oriundas do Nordeste (NE) e Sudeste (SE) do Brasil.

SMX/TMP CIM (mg/mL)	NE		SE	
	Forma Filamentosa N (%)	Forma Leveduriforme N (%)	Forma Filamentosa N (%)	Forma Leveduriforme N (%)
0,0025/0,0005	-	1 (12,5)	-	-
0,005/0,001	-	-	-	2 (66,67)
0,01/0,002	-	1 (12,5)	-	-
0,02/0,004	-	6 (75)	-	1 (33,33)
0,039/0,0078	2 (2,9)	-	2 (12,5)	-
0,078/0,0156	14 (20,6)	-	6 (37,5)	-
0,156/0,0312	37 (54,4)	-	5 (31,3)	-
0,312/0,0625	13 (19,1)	-	3 (18,8)	-
0,625/0,125	2 (2,9)	-	0 (0,0)	-
Média(mg/ml)	0,1544/0,0309	0,0141/0,0028	0,1152/0,0230	0,0079/0,0016
Total	68 (100)	8 (100)	16 (100)	3 (100)

Quanto à Concentração Fungicida Mínima (CFM), todas as cepas de *H. capsulatum* foram mortas pela SMX/TMP, com CFM variando de 0,039 – 0,0078 a 1,25 – 0,25 mg/ml.

As cepas oriundas do Nordeste brasileiro apresentam CFM superior, com média de 0,328 mg/mL para sulfametoxazol e 0,0656 mg/mL para trimetoprim, comparadas com cepas do Sudeste, com média de 0,254 mg/mL mg/mL para sulfametoxazol e 0,0508 mg/mL para trimetoprim. A disposição da CFM pode ser observada na tabela 10.

TABELA 10 - CFM de SMX-TMP ante cepas de *H. capsulatum* oriundas do Nordeste (NE) e Sudeste (SE) do Brasil.

SMX-TMP CFM (mg/mL)	NE		SE	
	n	%	n	%
0,039/0,0078	1	1,5	0	0
0,078/0,0156	9	13,2	4	25,0
0,156/0,0312	10	14,7	6	37,5
0,312/0,0625	36	52,9	3	18,8
0,625/0,125	10	14,7	3	18,8
1,25/0,25	2	2,9	0	0,0
Total	68	100	16	100

As CIM para as cepas do controle de qualidade foram: *Candida parapsilosis*, CIM = 1 µg/mL ante a anfotericina B, *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, CIM = 24/1,22 mg/mL ante a SMX/TMP, *H. capsulatum*, CIM = 0,12 µg/mL ante a anfotericina B.

7 DISCUSSÃO

O *Histoplasma capsulatum* pode ser considerado um dos patógenos oportunistas mais importantes da atualidade, com distribuição global. Está relacionado, principalmente, aos casos de AIDS, e em pacientes com contagens de linfócitos CD4 menores que 150 células/mm³ e na ausência de TARV, manifesta-se na forma disseminada grave, muitas vezes fatal.

A histoplasmose é a primeira infecção oportunística em 22-85% dos pacientes HIV positivos em áreas endêmicas (MCKINSEY *et al.*, 1997). No Brasil, como a histoplasmose não é considerada doença de notificação compulsória (apesar de estar na relação dos agravos inusitados), não se conhece a real incidência dessa infecção. Inquéritos epidemiológicos utilizando testes intradérmicos com histoplasmina demonstraram, entretanto, a distribuição da infecção pelo *H. capsulatum*, em todas as regiões do País: região Sul (6,3-16,0%), região Nordeste (2,6-29,8%), região Sudeste (3,0-93,2%), região Centro-Oeste (4,4-63,1%) e região Norte (12,8-43,4%) (ZANCOPE-OLIVEIRA; MUNIZ; WANKE, 2005). O Estado do Ceará constitui zona endêmica de histoplasmose, como demonstrado em inquérito sorológico com histoplasmina realizado em 1992, na cidade de Aracati, tendo-se obtido 87,34% de positividade em 316 participantes, assim como em inquérito sorológico com histoplasmina realizado em 1990 na cidade de Pereiro, Estado do Ceará, em indivíduos de ambos os sexos com faixa etária de cinco a 50 anos, que obteve positividade em 61,5% dos casos, frequência esta superior aos demais estados brasileiros, inclusive da região Nordeste (ALENCAR; AUGUSTO BORGES; DIÓGENES, 1992).

Nas últimas décadas, em razão do aumento no número de casos de AIDS, a histoplasmose também vem acompanhando essa relação, o que pode ser observado neste estudo, comparando-se o número de casos de 2006, 2007, 2008, 2009 e 2010 (ao todo, 254 casos, com média de 50,8 casos ao ano), com um aumento em relação a estudo anterior, onde foram observados 164 casos ao longo de nove anos (média de 18,2 casos ao ano) (DAHER *et al.*, 2006), superior também ao observado em relatos de microepidemias no Sudeste e Sul do Brasil. Na cidade de Porto Alegre, Severo *et al.* (2001) registraram 156 casos em 21 anos (1978 a 1999), e Unis, Oliveira e Severo (2004) registraram 111 casos em 25 anos (1977 a 2002), enquanto Leimann *et al.* (2005) registaram, no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, 74 casos em 17 anos (1987 a 2003) e Mora, Santos e Silva-Vergara (2007) observaram 57 casos em 14 anos (1992 a 2005), e no mesmo ano,

Chang *et al.* (2007) relataram 30 casos em oito anos (1998 a 2005) na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. O número de casos deste estudo supera o de relatos em outros países como o descrito por Huber *et al.* (2008) na Guiana Francesa, com um total de 200 casos em 25 anos; e no Panamá, com relato de 182 casos em sete anos (1997 a 2003) (GUTIERREZ *et al.*, 2005).

Dos 254 casos observados, 208 apresentaram confirmação por pesquisa direta e/ou cultura, enquanto 46 tiveram o diagnóstico de histoplasmose baseado nos aspectos clínicos, hematológicos e radiológicos, sendo esses achados importantes, pois, apesar da existência de excelentes métodos laboratoriais, em muitos casos, o diagnóstico não é realizado, simplesmente porque a histoplasmose não é incluída no diagnóstico diferencial. Os médicos devem estar atentos aos sintomas clínicos e correlacionar com os dados epidemiológicos, como a prática de atividades ocupacionais que exponham os pacientes a sítios contaminados com fezes de aves e morcegos. Além disso, os exames laboratoriais apresentam limitações técnicas (WHEAT; KAUFFMAN, 2003). A cultura para fungos, no caso da histoplasmose, é mais útil no diagnóstico da forma pulmonar crônica ou disseminada, sendo nesta forma positiva em 80-90% dos casos, enquanto o exame histopatológico em 40-60% e os exames sorológicos em 50-70% dos casos (LEIMANN *et al.*, 2005). Martinez e Figueiredo (2003) referem que a abordagem clínica do paciente com infecção aguda deve ser minuciosa e ampla, visando a possibilitar o início de um tratamento empírico, que tenha grande chance de ser eficaz. O ideal é que na evolução dos sintomas respiratórios e suspeita de pneumonia em indivíduos com HIV fosse estabelecido um diagnóstico definitivo. Para a realização deste, porém, procedimentos invasivos, como a broncoscopia, ou técnicas laboratoriais mais sofisticadas, são necessários, mas nem sempre acessíveis. Desta forma, a correlação clínico-epidemiológica, com exames laboratoriais e radiológicos de uso rotineiro, pode indicar o diagnóstico e a melhor opção terapêutica.

Esse aumento no número de casos de histoplasmose em indivíduos HIV positivos pode ser proporcional ao crescimento no número de infectados pelo vírus HIV, desde que, de 1980 a junho de 2010, foram notificados 592.914 casos de AIDS no Brasil. O maior número está concentrado na região Sudeste, com 344.150 (58,0%) casos, seguido da Sul, com 115.598 registros (19,5%), Nordeste 74.364 (12,5%), Centro-Oeste 34.057 (5,7%) e Norte 24.745 (4,2%). No País, nas regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste, a incidência de AIDS tende à estabilização, mas, no Norte e Nordeste, a tendência é de crescimento. Segundo critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS), o Brasil tem uma epidemia concentrada, com taxa de prevalência da infecção pelo HIV de 0,6% na população de 15 a 49 anos (BRASIL, 2010). E

no Estado do Ceará houve um aumento na taxa de incidência (por 100.000 habitantes), 9,6 em 2006, 11,7 em 2007, 12,4 em 2008 e 14,2 em 2009 (BRASIL, 2010). A mudança na política de atenção à AIDS, com o acesso à TARV a partir de 1996, implicou a queda da mortalidade e, conseqüentemente, o aumento da sobrevivência das pessoas vivendo com HIV/AIDS no Brasil, e, desta forma, no aumento proporcional nas doenças emergentes e reemergentes relacionadas a essa epidemia, como a histoplasmose.

A forma disseminada da histoplasmose acomete extremos de idade, mas, em pacientes imunodeprimidos, ocorre de forma predominante em adultos jovens (UNIS; OLIVEIRA; SEVERO, 2004), como neste estudo, em que a idade média dos indivíduos do sexo masculino foi de 35,8 anos e do sexo feminino foi de 35,1 anos; um pouco menor que o observado por Huber *et al.* (2008) na Guiana Francesa, em que a média de idade para mulheres foi de 37,5 e para homens foi de 41,4 anos, mas semelhante ao observado por Mckinsey *et al.* (1997) na cidade de Kansas nos Estados Unidos, e por Daher *et al.* (2007), também no Estado do Ceará, Brasil.

Observou-se neste estudo uma relação entre sexo masculino e feminino de 4,9 para 1, igual ao observado por Daher *et al.* (2007), que foi de 4 para 1, na mesma cidade do Estado do Ceará. Huber *et al.* (2008) obteve na Guiana Francesa uma proporção de dois casos no sexo masculino para cada caso no sexo feminino. Essa proporção entre os sexos relatada neste estudo é diferente da observada na infecção pelo vírus HIV. Segundo dados do Ministério da Saúde (2010), sobre a AIDS, em 1986, a razão era de 15 homens com a doença para cada caso em mulheres, e, a partir de 2003, a razão se estabilizou, sendo que, atualmente, para cada 15 homens com AIDS, existem dez mulheres infectadas. O *H. capsulatum* infecta os indivíduos independentemente do sexo, mas as manifestações clínicas são mais proeminentes no sexo masculino (WANKE; LAZERA, 2004; AIDÉ, 2009), e, além disso, os homens, por fatores laborais (criação de aves, limpeza de ambientes e construção civil) e esportivos (exploração de cavernas), estão mais expostos à forma filamentosa do *H. capsulatum* (CURY *et al.*, 2001).

Assim como em estudo realizado no Rio Grande do Sul (UNIS; OLIVEIRA; SEVERO, 2004), foram observadas alta incidência de casos na região urbana e ausência de história epidemiológica de comportamento de risco para aquisição da doença. Durante uma epidemia de histoplasmose que ocorreu na cidade de Indianápolis, Estados Unidos, entre junho de 1988 e junho de 1995, a infecção pelo *H. capsulatum* foi verificada em aproximadamente um terço dos pacientes com AIDS, manifestando-se como doença

disseminada em 95% dos casos, sem, contudo, serem identificados os fatores que contribuíram para o advento dessa epidemia (WHEAT *et al.*, 2000a).

Ademais, em pacientes residindo em áreas endêmicas, não é possível se correlacionar a doença como uma nova infecção, ou reativação de infecção anterior. Assim também, indivíduos que desenvolveram condição de imunossupressão anos após saírem de áreas endêmicas podem sofrer reativação do foco de infecção e, desta forma, desenvolver histoplasmose disseminada (KAUFFMAN, 2007).

Os 162 casos procedentes de Fortaleza foram distribuídos de forma dispersa em 65 bairros, sendo que o bairro de Messejana apresenta 6,7% dos casos representando a maior concentração (10/162), seguido pelo bairro do Centro com oito casos (4,9%). Bezerra (2009) obteve em Fortaleza, por meio de inquérito epidemiológico com histoplasmina, positividade em 12,42% dos casos (20/161), sendo que os bairros de Messejana e Centro obtiveram 15% de positividade cada um, demonstrando uma correlação entre os dois estudos.

A forma como os pacientes deste estudo adquiriram a histoplasmose ainda permanece em questão, pois os relatos obtidos dos prontuários no estudo retrospectivo e os tomados no estudo prospectivo não foram suficientes para esclarecer esse questionamento. Até o presente momento, o *H. capsulatum* ainda não foi isolado do solo no Estado do Ceará, sendo que o isolamento do fungo do solo exige trabalho minucioso e várias amostras de locais diferentes com temperatura de 22 a 29°C e umidade relativa de 67 a 87% ou mais (OLIVEIRA; UNIS; SEVERO, 2006). O *H. capsulatum* é um fungo ubíquo, ou seja, apresenta como habitat não apenas o solo das grutas e cavernas nem somente locais onde há criação de aves podendo, também, ser encontrado em áreas públicas, como parques e praças, assim como, em chácaras, sítios e fazendas, forros de casas, e outras construções habitadas por morcegos. Dados da literatura demonstram que os morcegos estão entre os poucos mamíferos silvestres que desempenham papel importante na manutenção do ciclo biológico de *H. capsulatum* na natureza. A importância desses animais dentro da cadeia ecoepidemiológica da histoplasmose está bem estudada. Emmons foi o primeiro a correlacionar a associação entre morcegos e fungos patogênicos, isolando *H. capsulatum* do solo contaminado pelo guano desses animais nos Estados Unidos. Fava Netto *et al.* (1967) relataram o isolamento de *H. capsulatum* em excretas de morcegos coletadas em uma casa situada no litoral norte de São Paulo. Na cidade de Brasília, o primeiro relato do isolamento de *H. capsulatum* do solo de cavernas habitadas por quirópteros foi feito por Schmidt, Machado e Galvão (1973), sendo descrito também o isolamento em vísceras e sangue de morcegos capturados no interior da caverna. No Estado do Ceará, Coelho (2010) identificou o

H. capsulatum em lesões cutâneas de três gatos, oriundos das cidades de Sobral, Baturité e Fortaleza, respectivamente, configurando-se nos primeiros casos de histoplasmose animal nesse Estado e, Cordeiro *et al.* (2011) obteve 1,78% de positividade para *H. capsulatum* através de teste de imunodifusão realizado em 224 cães, também no Estado do Ceará. De acordo Zancopé-Oliveira, Muniz e Wanke (2005), outras espécies de animais podem estar envolvidas na distribuição ambiental do *H. capsulatum*. Os autores realizaram a captura de 103 animais silvestres nativos no Município do Rio de Janeiro, isolando o fungo de vísceras de três animais (2,9%) aparentemente saudáveis, sendo dois marsupiais (*Metachirus opossum*) e um rato (*Rattus rattus*). Silva-Vergara *et al.* (2001) demonstraram o isolamento de *H. capsulatum* no Estado de Minas Gerais, na cultura de vísceras de *Didelphis albiventris*, uma espécie de marsupial encontrada no Brasil.

A histoplasmose disseminada foi observada como primeira manifestação da AIDS em 39,37% dos casos, enquanto que Mora, Santos e Silva-Vergara (2007) observaram 52%, em Minas Gerais, Brasil, e Hajjeh *et al.* (2001) 50% nos Estados Unidos. É importante observar que os pacientes imunocomprometidos são incapazes de desenvolver imunidade celular efetiva contra o *H. capsulatum*, assim como podem não apresentar sintomatologia da doença no período de disseminação aguda (KAUFFMAN, 2007). Apesar de haver aproximadamente 1,5 milhão de espécies fúngicas, apenas algumas centenas são capazes de causar patologias em seres humanos. A maioria das doenças fúngicas é causada por poucos representantes desse reino, como a *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Aspergillus* spp., *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides* spp., *Blastomyces dermatitidis* e *Paracoccidioides brasiliensis*. Esse fato ocorre pela eficácia das defesas humanas, que se torna evidente em quadros de infecção, reinfecção ou reativação de focos endógenos quando existe a deficiência ou supressão dessas defesas. A supressão do sistema imune permite que fungos, normalmente saprófitas, tenham oportunidade de causar doenças agressivas e rapidamente fatais (HOSPENTHAL; ROGERS, 1995). Fungos, como o *H. capsulatum*, apresentam mecanismos de virulência desenvolvidos no solo pela pressão da seleção que ocorre na competição com outros microrganismos, adaptação a extremos de umidade ou sobrevivência à atividade predatória de organismos amebóides e pequenos animais, como os nematóides, que são de enorme importância para a patogenicidade em humanos (CASADEVALL, 2007).

Atualmente, é importante lembrar que estão ocorrendo casos de histoplasmose grave em pacientes que fazem uso de antagonistas do fator de necrose tumoral (TNF α), como o etanercept (Enbrel®) e infliximab (Remicade®) (KAUFFMAN, 2007; OLSON *et al.*, 2011), sendo necessário que os médicos fiquem atentos para incluir a histoplasmose no

diagnóstico diferencial no contexto de manifestações clínicas semelhantes às relatadas neste estudo.

Dentre os pacientes com diagnóstico de AIDS antes do quadro de histoplasmose, 66,2% não faziam uso de medicamentos antirretrovirais, o que pode ter acarretado manifestações mais graves da histoplasmose e óbito, dados estes também observados em outros países da América do Sul, como a Guiana Francesa (HUBER *et al.*, 2008). Como relatado na literatura, a maioria dos casos de histoplasmose associados à AIDS ocorre em pacientes que não estão recebendo TARV, ou que possuem pouca adesão ao tratamento (MORA; SANTOS; SILVA-VERGARA, 2007). É importante ressaltar a necessidade da instituição do tratamento da doença de base, neste caso, a AIDS, pois o uso da TARV é associado com redução significativa na incidência de infecções oportunistas (WHEAT *et al.*, 2007a), e sua instituição durante o curso da histoplasmose causa estímulo à imunidade celular, peça-chave na defesa contra o *H. capsulatum*, tendo sido relatada uma resposta em 100% dos pacientes tratados concomitantemente com antifúngicos e TARV, em detrimento de uma resposta em 47% dos indivíduos que não faziam uso de TARV (WHEAT *et al.*, 2007a).

As manifestações clínicas na histoplasmose disseminada são variáveis, sendo observada neste estudo maior frequência de casos com sintomas de febre, perda de peso, anorexia, adinamia, tosse, dispneia, diarreia, hepatomegalia e esplenomegalia, semelhante ao observado em estudo anterior procedido por Daher *et al.* (2007). Febre, calafrios, caquexia, mialgia, anorexia, tosse e dor torácica são característicos da forma pulmonar aguda da histoplasmose e são observados em 85-100% dos casos. Na forma pulmonar crônica, que se desenvolve em pacientes com doença pulmonar de base, os achados clínicos e radiológicos são semelhantes ao observado na tuberculose, entretanto, sem tratamento, a doença se torna progressiva, causando perda da função pulmonar e óbito em mais da metade dos pacientes (HAGE *et al.*, 2008). Na histoplasmose disseminada, que acomete extremos de idade e em pacientes com estado de imunossupressão, a febre e a perda de peso são os sintomas mais comuns, associados a hepatomegalia e esplenomegalia. Outros frequentes sítios de disseminação incluem a mucosa orofaríngea e gastrointestinal, a pele e glândulas suprarrenais (WHEAT *et al.*, 2000a). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo que obteve diagnóstico confirmado por exame micológico e os com exame negativo, demonstrando que o diagnóstico clínico foi criterioso e bem direcionado.

Outras infecções acometeram os pacientes durante o internamento por histoplasmose, sendo observada, mais frequentemente, candidíase (52,5%), seguida por tuberculose (26,9%) e herpes (6,2%). A candidíase em esôfago, brônquios, traqueia ou

pulmões é considerada uma doença definidora de AIDS. Trata-se da afecção oral mais comum nos pacientes HIV positivos, sendo havida como preditiva de deterioração do sistema imunológico. Ocorre muitas vezes em pacientes no início da infecção pelo HIV, previamente assintomáticos e em 90% dos pacientes com AIDS. Nos casos de imunodeficiência grave, as lesões podem se espalhar por toda a extensão da cavidade bucal (BODHADE; GANVIR; HAZAREY, 2011). É relatada como uma das mais frequentes infecções oportunistas (CHANG *et al.*, 2007). Neste estudo, 26,9% dos pacientes obtiveram diagnóstico concomitante ou estavam em tratamento para tuberculose no momento do diagnóstico de histoplasmose. A tuberculose é uma das infecções concomitantes à histoplasmose mais frequente, podendo uma mascarar a outra (GUTIERREZ *et al.*, 2005). Em estudo realizado pelos autores Rocha e Severo (1994), de 1986 a 1992, no Rio Grande do Sul, em pacientes com histoplasmose disseminada e AIDS, um terço dos pacientes estava sendo tratado para tuberculose, sem confirmação diagnóstica, e, em razão da piora clínica e surgimento de lesões mucocutâneas, em vigência do uso de tuberculostáticos, foi feita a revisão diagnóstica, concluindo-se tratar de histoplasmose.

As alterações cutâneas foram observadas em menor número de casos (15,7%) em relação ao Sul e Sudeste do Brasil, demonstrando semelhança com os relatos dos Estados Unidos, Guiana Francesa e Panamá, que foram de 10%, 13,4% e 17,5%, respectivamente (KARIMI *et al.*, 2002; COUPPIE *et al.*, 2004; GUTIERREZ *et al.*, 2005), mas semelhante ao observado no Estado de Mato Grosso do Sul, região Centro-Oeste do Brasil (16,7%) (CHANG *et al.*, 2007), sugerindo que diferentes cepas de *H. capsulatum* sejam responsáveis por diferentes manifestações clínicas (UNIS; OLIVEIRA; SEVERO, 2004; DURKIN *et al.*, 2004). As lesões mais frequentes foram o *rash* eritematoso e pápulas, enquanto que, em estudos anteriores, se observou mais a presença de lesões pápulo-ulcerativas com crostas, seguida de lesões pustulares ou nodulares (GOLDANI *et al.*, 2009; KARIMI *et al.*, 2002).

Os sintomas gastrintestinais ocorreram com maior frequência neste estudo em relação ao dos EUA, sendo o trato gastrointestinal considerado um dos maiores sítios de disseminação da doença (KARIMI *et al.*, 2002), com comprometimento hepato-esplênico superior ao anteriormente observado (DAHER *et al.*, 2007).

O exame micológico foi positivo em 81,9% dos casos, semelhante ao observado por Karimi *et al.* (2002), mas superior ao de Unis, Oliveira e Severo (2004) e Leimann *et al.* (2005), com cultura positiva em 51,4% e 69,5% dos casos, respectivamente. Severo *et al.* (2001) relataram 137 casos de histoplasmose, ao longo de 21 anos, no Estado do Rio Grande do Sul, em que o diagnóstico foi baseado na cultura e histopatológico. Na forma pulmonar

aguda e crônica, o diagnóstico foi realizado pelo estudo histopatológico de biopsias do tecido pulmonar. Nas formas disseminadas, o diagnóstico foi baseado na histopatologia (em 75 de 81 pacientes) ou cultura (42 de 56 pacientes). O isolamento do *H. capsulatum* em cultivo constitui padrão ouro para o diagnóstico da histoplasmose, entretanto, a cultura apresenta algumas limitações, podendo ser negativa nas formas moderadas de histoplasmose, e apresentar resultado falso negativo em 20% dos casos de infecção disseminada. Pode demorar até quatro semanas para se emitir o laudo da cultura à espera do crescimento do *H. capsulatum*, sendo que, em alguns casos, procedimentos invasivos como a broncoscopia são necessários para se obter uma amostra de material satisfatória para a cultura (WHEAT; KAUFFMAN, 2003). Assim, os aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais também têm de ser observados, pois até o presente momento não se dispõe de nenhum método complementar em que se obtenha 100% de positividade, principalmente em pacientes imunossuprimidos (LEIMANN, 2005; WHEAT, 2007b).

Como proposta para tornar o diagnóstico da histoplasmose mais precoce, sugere-se a implantação dos testes sorológicos como rotina nos laboratórios de referência no diagnóstico dessa patologia. A detecção dos antígenos do *H. capsulatum* é um meio de diagnóstico rápido na histoplasmose disseminada, obtendo uma sensibilidade maior a partir de amostras da urina do que de outros fluidos corpóreos, e apresentando reação cruzada em raros casos. Além disso, os níveis antigênicos diminuem com o tratamento e aumentam nas recidivas, tornando-se um método de grande auxílio na monitorização do tratamento (KUROWSKI; OSTAPCHUK, 2002). Os testes sorológicos para identificação de antígenos são caros, e ainda não são acessíveis de forma rotineira no meio local.

As anormalidades laboratoriais observadas com maior frequência foram: níveis de hemoglobina abaixo de 8g/dl, leucopenia, trombocitopenia, elevação nos níveis de LDH, AST, ALT e creatinina sérica, semelhante a estudos anteriores (DAHER *et al.*, 2007). A anemia, leucopenia e trombocitopenia são achados comuns na histoplasmose disseminada, sendo que a trombocitopenia é relacionada a casos com risco para óbito, por indicar hemofagocitose, coagulação intravascular disseminada e supressão da medula óssea. Os elevados níveis de AST e ALT são indicativos de falha hepática, enquanto níveis elevados de creatinina apontam falha renal (DAHER *et al.*, 2007). Autores apontam uma associação entre o nível sérico aumentado de LDH e o óbito causado por histoplasmose (DAHER *et al.*, 2006). Esta enzima é encontrada em todas as células dos vertebrados, ocupando importante posição no metabolismo celular fora da via glicolítica. Funciona como enzima de ligação entre o metabolismo de proteínas e carboidratos e serve como indicadora de condições fisiológicas ou

estruturais alteradas, desempenhando papel importante em condições de estresse, tais como a inflamação, a hipóxia e/ou choque prolongados. Possíveis explicações para a elevação da LDH em quadros infecciosos, micóticos ou não, associados à AIDS, são relacionadas à disfunção orgânica múltipla, associada à disseminação do processo infeccioso e/ou à síndrome reativa hemofagocítica, que é consequente da ativação inapropriada de monócitos, presente nas infecções graves, principalmente em estádios avançados da AIDS. Baseado nessa já conhecida associação, é aventada a ideia que o nível da LDH pode ser útil no diagnóstico diferencial entre pneumocistose e histoplasmose, uma vez que o nível dessa enzima é geralmente maior do que 600U/L na histoplasmose, diferente do encontrado em outros pacientes com HIV e infiltrado pulmonar (BUTT *et al.*, 2002). Os padrões laboratoriais obtidos nos pacientes com exame micológico positivo foram semelhantes aos com exames negativos.

É importante observar que o tratamento com anfotericina B, por sua nefrotoxicidade, pode acarretar insuficiência renal aguda em 45-65% dos pacientes (DAHER *et al.*, 2007; WHEAT *et al.*, 2007a), mas os dados colhidos neste estudo referem-se ao momento da admissão do paciente, desta forma refletindo tanto as manifestações renais da histoplasmose como da AIDS, ou de medicamentos associados a esta síndrome, cujo uso tenha sido feito pelos pacientes. Várias formas de doença renal são descritas em pacientes infectados pelo HIV, mas a mais comum, ocorrendo em 75-80% dos casos, é a glomeruloesclerose focal segmentar em associação com síndrome nefrótica, ou também conhecida como nefropatia associada ao HIV, que cursa com proteinúria significativa até a insuficiência renal. A histoplasmose, por sua vez, acarreta glomerulonefrite por imunocomplexos (BURKE *et al.*, 1997).

Em 80,4% dos casos a contagem de linfócitos CD4 foi menor do que 100 células/mm³, corroborando estudos anteriores, demonstrando ser a imunossupressão celular o fator mais importante para as manifestações clínicas da histoplasmose (MORA; SANTOS; SILVA-VERGARA, 2007; HUBER *et al.*, 2008), de tal modo que a histoplasmose sintomática ocorre mais frequentemente em indivíduos com níveis baixos de linfócitos CD4 do que a histoplasmose assintomática (MCKINSEY *et al.*, 1997). Os níveis baixos de LT CD4+ constituem o marcador mais útil para indivíduos em risco de adquirir a histoplasmose, principalmente na forma disseminada (MCKINSEY *et al.*, 1997).

Os achados radiológicos não apresentaram especificidade com a histoplasmose, podendo ser observados também em outras afecções que acometem pacientes imunodeprimidos, como a pneumocistose e a tuberculose miliar. Em alguns casos, o exame

radiológico foi normal, o que não exclui a doença (UNIS; OLIVEIRA; SEVERO, 2004). O derrame pleural foi o segundo maior achado ao exame radiológico neste estudo (10,5%), entretanto, a doença pleural é incomum durante o curso da histoplasmose pulmonar, geralmente estando associada com pericardite, observando-se com maior frequência infiltrado intersticial difuso, como visto também neste estudo (KAUFFMAN, 2007).

A anfotericina B foi o tratamento de escolha em 88,2% dos casos estudados, e, de forma geral, pacientes com AIDS respondem melhor ao tratamento em casos com manifestações pouco graves da histoplasmose, sendo relatada resolução da doença em 85% dos pacientes tratados com itraconazol e 98% dos tratados com anfotericina B. Por outro lado, obtêm-se pouca resposta clínica à terapêutica nos casos com sintomas de hipotensão, insuficiência respiratória ou manifestações neurológicas (WHEAT *et al.*, 2000a).

Foi observada evolução para óbito em 41,7% dos casos e, apesar do tratamento com anfotericina B, 38,5% desses pacientes tratados foram a óbito, com maior frequência do que observado por outros autores (DAHER *et al.*, 2007; MORA; SANTOS; SILVA-VERGARA, 2007), mas semelhante ao registrado na região Centro-Oeste do Brasil (40,0%) (CHANG *et al.*, 2007). Prado *et al.* (2009) relataram que entre 1996 e 2006 a histoplasmose foi a principal causa de óbito em 10,1% de 3583 pacientes com AIDS e Wheat *et al.* (2000a) relataram 12% de óbito nos pacientes com histoplasmose disseminada e AIDS tratados com anfotericina B, frequências menores do que a observada neste estudo. Dentre os que não realizaram tratamento, 67,9% evoluíram para óbito, enquanto Mora, Santos e Silva-Vergara (2007) observaram 31,5% de óbito em não tratados. Desta forma, os pacientes não submetidos a nenhuma terapêutica antifúngica evoluíram para óbito em maior percentagem do que os tratados com antifúngico, demonstrando a necessidade de se instituir tratamento, pois a mortalidade decorrente da histoplasmose disseminada sem tratamento é de aproximadamente 80%, com estudos demonstrando a possibilidade de redução para 25% com a instituição de antifúngicos, estando estes, portanto, indicados em todos os pacientes com doença disseminada (WHEAT *et al.*, 2000a). A frequência de óbito no grupo com exame micológico negativo foi de 39,1%, semelhante ao observado no grupo dos pacientes tratados com anfotericina B com diagnóstico micológico comprovado da histoplasmose. Essa semelhança sugere, mais uma vez, que a instituição da terapêutica, mesmo na ausência de comprovação por exame micológico, é válida e necessária, para diminuir a mortalidade na histoplasmose disseminada. O *H. capsulatum* mostra colônias maduras com 15-21 dias de incubação (WANKE; LÁZERA, 2004) e, neste caso, a terapêutica baseada na correlação entre os achados clínicos e epidemiológicos torna-se uma estratégia para salvar vidas, sendo

geralmente iniciada a anfotericina B por se tratar de droga eficaz com resultados satisfatórios em alguns dias (WHEAT *et al.*, 2000a). A infecção pelo *H. capsulatum* é tão comum nas áreas endêmicas que a maioria das pessoas está infectada antes de chegar à idade adulta e não sabe (KAUFFMAN, 2006). A frequência no número de casos de histoplasmose em pacientes com AIDS vem aumentando progressivamente, o que na ausência de exames laboratoriais que forneçam diagnóstico precoce para instituição de terapêutica eficaz requer do médico elevado índice de suspeição perante a um quadro clínico sugestivo da doença (ZOLOPA *et al.*, 2009).

Foi observada, neste ensaio, a média de 8,2 dias após internamento para início do tratamento, demonstrando que a histoplasmose foi diagnosticada em estágio mais tardio de evolução, já como doença disseminada (KARIMI *et al.*, 2002), contribuindo para evolução desfavorável, mesmo com terapêutica antifúngica adequada (UNIS; OLIVEIRA; SEVERO, 2004) e reforçando a importância do diagnóstico precoce. Essa frequência na mortalidade dos pacientes com histoplasmose disseminada e AIDS é o triplo da observada em imunocompetentes (CAHN *et al.*, 2000) e nos Estados Unidos, cuja mortalidade é de 5-13% (KARIMI *et al.*, 2002). Estudos sugerem que a mortalidade é maior em infecções causadas por cepas latino-americanas em relação às cepas norte-americanas, sendo proporcional ao tamanho do inóculo fúngico e do grau de resposta inflamatória do hospedeiro (DURKIN *et al.*, 2004).

O óbito ocorreu em alguns casos (9,4%), que apresentavam comprometimento renal no momento da admissão do paciente, o que contraindicava a terapia agressiva com anfotericina B desoxicolato. Estudo comparando o uso da anfotericina B lipossomal com a anfotericina B desoxicolato demonstrou que a preparação lipídica é mais efetiva e menos nefrotóxica (WHEAT *et al.*, 2000a), entretanto, por apresentar maior custo, ainda não é disponível de forma rotineira nos hospitais da rede pública de saúde. Em pacientes com doença grave, é comum ocorrer comprometimento renal, como consequência da insuficiência de múltiplos órgãos, causada tanto pela severidade da histoplasmose, como pela nefrotoxicidade da anfotericina B, podendo ser revertida quando da melhora das condições clínicas do paciente (WHEAT *et al.*, 2004). Wheat *et al.* (2007a) propõem o uso de metilprednisolona (0,5 a 1,0 mg/kg via endovenosa diariamente) por uma a duas semanas no início do tratamento antifúngico, em pacientes que desenvolvem complicações respiratórias, como hipoxemia ou insuficiência respiratória, nos casos de histoplasmose moderadamente grave ou que já iniciou o quadro de forma grave.

Após a alta, os pacientes, deste estudo faziam como terapia de manutenção uso do itraconazol 600mg ao dia por três dias e, em seguida, 400 mg ao dia, durante tempo

indefinido, até a reconstituição dos níveis de linfócitos CD4. Em pacientes com AIDS como causa de imunossupressão, o tratamento da histoplasmose é dividido em uma fase inicial de 12 semanas para induzir remissão, seguido por uma fase de manutenção para prevenção de recidiva. Como medicamento de indução, indica-se a anfotericina B em pacientes hospitalizados, como nos casos observados neste estudo e, após melhora das condições clínicas, indica-se o itraconazol 200mg duas vezes ao dia, a fim de complementar as 12 semanas de tratamento. Estudos demonstraram que o itraconazol é mais efetivo do que o fluconazol na profilaxia da histoplasmose (MCKINSEY *et al.*, 1997). O tempo total de manutenção depende da severidade da infecção e da imunidade do hospedeiro, sendo recomendado de seis a 18 meses de tratamento. O período mínimo de tratamento deve ser de seis meses para indivíduos relativamente estáveis, e nos demais casos deverá ser de 12 meses (KAUFFMAN, 2007). O itraconazol também é recomendado como profilaxia em indivíduos com contagem de linfócitos CD4 menor do que 150 células/mm³, suportado por estudos comparando o uso do itraconazol 200 mg ao dia, no grupo acima citado, com o grupo placebo, onde foi obtida uma redução na incidência da histoplasmose no grupo tratado com itraconazol (WHEAT *et al.*, 2000a). É importante lembrar que o uso do efavirenz no esquema TARV pode diminuir os níveis séricos do itraconazol (FERREIRA; BORGES, 2009).

A recaída, neste estudo, ocorreu em 13% dos casos, sendo relatada por Mckinsey *et al.* (1997) recaída de 19,5%, mesmo em pacientes que estavam em uso de itraconazol como terapia de manutenção e por Saccent (2009) recaída em 35-80% dos casos que não fazem uso de terapia de manutenção. O procedimento considerado ideal, em termo de vigilância na profilaxia de recorrência, é a monitorização dos níveis antigênicos do *H. capsulatum* durante o tratamento e por 12 meses após o tratamento, pois níveis de antigenúria baixos indicam que não é necessário prolongar o tratamento em pacientes que completaram todo o esquema terapêutico e não exibem evidência de infecção ativa (WHEAT, 2007b).

A profilaxia antifúngica é outra estratégia para prevenir a histoplasmose em pacientes com AIDS (independentemente da contagem de linfócitos CD4+), apesar de ser ainda motivo de controvérsia, não devendo ser rotineiramente recomendada em virtude da toxicidade dos azólicos, interação medicamentosa e induzir resistência a cepas de *Candida* spp, bem como pela falha na adesão do paciente em razão do seu uso em longo prazo e de forma contínua (WHEAT *et al.*, 2000a), mas está indicada durante epidemias de histoplasmose (MCKINSEY *et al.*, 2008).

É importante o acompanhamento dos níveis de linfócitos CD4 em indivíduos infectados pelo vírus HIV, em intervalo de três a seis meses, pois níveis de linfócitos CD4

menores ou iguais a 200 células/ μ l indicam o diagnóstico de AIDS, havendo manifestação de doenças oportunistas e neoplasias, sendo esse nível indicado pelo CDC para iniciar a profilaxia contra infecções oportunistas e a terapia antirretroviral (TARV). Esta inibe a replicação do vírus HIV e aumenta a quantidade de linfócitos CD4, melhorando, conseqüentemente, a expectativa de vida dos pacientes (BARNETT *et al.*, 2008).

Neste ensaio, foram observados como fatores associados ao óbito: níveis séricos de AST/TGO elevados, presença ao exame radiológico do tórax de infiltrado intersticial, relato de anorexia, presença ao exame do raio-x de tórax de infiltrado difuso e queixa de dispneia e níveis séricos elevados de creatinina. Também foi observado que os pacientes que evoluíram para óbito permaneceram menor tempo internados. Em estudos nos EUA, foram relatados como fatores de risco para o óbito em pacientes com AIDS e histoplasmose disseminada a presença de insuficiência respiratória, trombocitopenia, aumento nos níveis de LDH (COUPPIE *et al.*, 2004), níveis séricos elevados de creatinina e baixos níveis séricos de albumina (WHEAT *et al.*, 2000a). Daher *et al.* (2006) demonstraram como fatores de risco no Brasil, para a população acima citada, a presença de níveis baixos de hemoglobina, aumentos dos níveis séricos de AST, insuficiência renal aguda e insuficiência respiratória. Os extremos de idade são reconhecidamente fatores de risco para disseminação e óbito (WHEAT *et al.*, 2000a). Em seu estudo, Daher *et al.* (2006) não observaram correlação entre óbito e baixo peso, divergindo do estudo atual e do realizado por Wheat *et al.* (2000a). Por outro lado, assim como este, Daher *et al.* (2006) correlacionaram o risco de óbito com insuficiência respiratória e renal. O reconhecimento desses achados em pacientes com histoplasmose disseminada e AIDS deve ser valorizado, visando à instituição de terapêutica agressiva e precoce.

Até o presente momento não havia nenhum estudo comparativo entre os índices pluviométricos e o número de casos observados ao longo dos períodos analisados. Neste estudo, pode-se ver que não existe uma sazonalidade no número de internamentos por histoplasmose em pacientes HIV positivos relacionado ao período chuvoso, bem como em relação à velocidade dos ventos, que se refere aos períodos em que se observa a presença de ventanias na cidade de Fortaleza. Não existe razão precisa para explicar a distribuição do padrão de endemicidade da histoplasmose nas Américas, mas sendo atribuída a locais que possuam clima moderado com umidade e características do solo, adequados ao desenvolvimento do *H. capsulatum*, que no ambiente se encontra na sua forma micelial, associado ao habitat de aves e morcegos (WHEAT *et al.*, 2007a). Já existem estudos relacionando as condições climáticas que influenciam a sazonalidade e epidemias de

coccidioidomicose nos Estados Unidos, demonstrando que os ventos são importantes fatores na dispersão dos conídios do *Coccidioides* spp (COMRIE, 2005).

Os conceitos ecológicos das doenças foram definidos por Gordon e Augustine em 1948, e definidos para o *H. capsulatum* em 1954, por Zeidberg e Ajello, enfatizando a influência do meio ambiente na ocorrência e distribuição das doenças entre os agregados humanos. Muito podemos aprender no laboratório, mas é difícil, ou quase impossível, reproduzir todas as variáveis químicas, físicas e biológicas que afetam a sobrevivência e reprodução dos organismos em seu habitat natural, entretanto o estudo do ambiente e das circunstâncias em que um determinado agente promove as doenças é importantíssimo para explicar a distribuição geográfica das enfermidades, indicar os prováveis reservatórios e potenciais áreas endêmicas das doenças.

Em vista do elevado número de óbitos por histoplasmose observados neste estudo, foi realizado teste de sensibilidade antimicrobiana *in vitro*, pelo método da microdiluição (CLSI, 2002), para avaliar a sensibilidade *in vitro* do *H. capsulatum* ante os antifúngicos anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol e caspofungina. Os agentes antifúngicos preferencialmente utilizados no tratamento da histoplasmose incluem a anfotericina B nas formas de desoxicolato, lipossomal e complexo lipídico, e itraconazol (WHEAT *et al.*, 2007a), mas novas opções terapêuticas são buscadas objetivando o melhor tratamento dos pacientes com histoplasmose.

Dentre os antifúngicos testados, a anfotericina B é a mais efetiva *in vivo* e continua sendo o antifúngico de eleição para tratamento das micoses sistêmicas, associadas ou não a infecção pelo HIV (WHEAT *et al.*, 2007a). Os resultados *in vitro* também confirmam sua elevada eficácia, em particular ante o *H. capsulatum* (OSTROSKY-ZEICHNER, 2003; MARQUES, 2009). Neste caso, para todas as cepas se obteve uma CIM de 0,0078-0,5µg/ml (média geométrica de 0,12µg/mL) para forma filamentosa e 0,06-0,5µg/ml (média geométrica de 0,16µg/mL) para forma leveduriforme, resultados menores do que os observado por Andreu *et al.* (2003), que obtiveram CIM de 0,125-1,0 µg/ml (média geométrica de 0,26 µg/ml) , e Li *et al.* (2000) com CIM₉₀ de 1µg/ml, ambos na fase filamentosa. Os autores Polak e Dixon (1987), que realizaram estudo com a fase leveduriforme, obtiveram CIM de 0,07-0,15 µg/ml, semelhante ao verificado neste estudo.

Estudos demonstram uma melhor eficácia terapêutica com índices menores de mortalidade no uso da formulação lipossomal ou em complexo lipídico, em relação à desoxicolato, que é a forma utilizada nos hospitais do Ceará, sendo esta, entretanto, de menor

custo e podendo ser utilizada em pacientes com risco de nefrotoxicidade baixo (WHEAT *et al.*, 2007a).

A anfotericina B é o tratamento de escolha na doença pulmonar grave ou formas disseminadas da histoplasmose, mas na doença grave é comum ocorrer insuficiência renal, agravada pela nefrotoxicidade da anfotericina B (WHEAT *et al.*, 2007a), que é o efeito colateral mais sério, com azotemia e hipocalcemia, requerendo a suplementação de potássio. O comprometimento renal é considerado um fator agravante para o prognóstico da AIDS em pacientes com histoplasmose, necessitando-se nesses casos de terapêutica eficaz contra o *H. capsulatum*, até remissão do quadro de histoplasmose, na impossibilidade do uso da anfotericina B (DAHER *et al.*, 2007). A diminuição da febre ocorre com uma semana de tratamento na maioria dos pacientes, podendo-se após três a 14 dias, suspender a anfotericina B e iniciar itraconazol. Anemia normocítica pode também ocorrer, com resolução após suspender a medicação (KUROWSKI; OSTAPCHUK, 2002).

Os resultados obtidos ante a caspofungina demonstraram grande variabilidade na resposta *in vitro* do *H. capsulatum*, com CIM na forma filamentosa de 0,016-32 μ g/ml (média geométrica de 3,65 μ g/ml) e na forma leveduriforme de 0,5-4 μ g/ml (média geométrica de 2 μ g/ml). Kohler *et al.* (2000) demonstraram que a caspofungina não é efetiva contra esse fungo *in vivo*, refletindo sua baixa atividade *in vitro*, observando-se uma variação na CIM, dependendo se o *H. capsulatum* se encontra na fase de filamento ou levedura. Os mesmos autores em experimento com o fungo na fase de levedura, obtiveram CIM de 8-32 μ g/ml, enquanto que Graybill *et al.* (1998), estudando o fungo em fase filamentosa, observaram CIM de 0,25 μ g/ml. Essa diferença na atividade da caspofungina perante as formas de crescimento do *H. capsulatum* também foi observada com a micafungina por Nakai *et al.* (2003), sendo essa diferença relacionada ao mecanismo de ação das equinocandinas, que agem inibindo a síntese de 1,3 β -D-glucano da parede celular fúngica, entretanto fungos com o *H. capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* e *Paracoccidioides brasiliensis*, na fase de levedura, contêm predominantemente α -glucano e somente pequena quantidade de β -glucano, enquanto este é abundante na fase filamentosa (CHANDRASEKAR; SABEL, 2006). A melanização do *H. capsulatum* também reduz a atividade da caspofungina contra as leveduras deste fungo (DERESINSKI; STEVENS, 2003; VAN DUIN *et al.*, 2002). Além desses mecanismos de resistência, foi observado que uma mutação em fungos, com substituição de aminoácidos, acarreta diminuição na sensibilidade à caspofungina. Apesar de não haver nenhum método aprovado que demonstre o ponto de corte para CIM no caso das equinocandinas, são

reconhecidos como organismos sensíveis os que apresentem $CIM \leq 2 \mu\text{g/ml}$ e resistentes $CIM \geq 4 \mu\text{g/ml}$ (SABLE; STROHMAIER; CHODAKEWITZ, 2008).

Em relação aos azólicos, o fluconazol apresentou na fase filamentosa CIM de 3,9-125 $\mu\text{g/ml}$ (média geométrica 36,36 $\mu\text{g/ml}$) e na fase leveduriforme CIM de 3,9-7,8 $\mu\text{g/ml}$ (média geométrica 5,52 $\mu\text{g/ml}$), mais elevados do que o relatado por Wheat *et al.* (2006) (0,25-4 $\mu\text{g/ml}$) com leveduras de *H. capsulatum*, bem como por Polak e Dixon (1987), onde a CIM frente ao fungo na fase leveduriforme apresentou variação de 0,25 a 5,0 $\mu\text{g/ml}$, com média geométrica de 3,3 $\mu\text{g/ml}$. Com média geométrica menor do que a observada por Andreu *et al.* (2003), porém, em que a variação do CIM foi de 16-64 $\mu\text{g/ml}$ e média geométrica de 55,7 $\mu\text{g/ml}$, utilizando o fungo na fase filamentosa. A elevada disponibilidade oral e os reduzidos efeitos adversos do fluconazol são fatores que contribuem para sua ampla utilização no tratamento de numerosas infecções fúngicas (DISMUKES, 2000; MARQUES, 2009). No caso da histoplasmose, o tratamento com doses elevadas de fluconazol induz remissão na maioria dos pacientes, entretanto, muitos apresentam episódios de recorrência (LEMONTE *et al.*, 2000). Wheat *et al.* (2001) reportaram a emergência da resistência ao fluconazol como causa de falha terapêutica em pacientes imunodeprimidos, sugerindo a necessidade de utilizar elevadas concentrações de fluconazol *in vitro* para obter a inibição do *H. capsulatum*, observando-se que ocorre maior possibilidade de falha terapêutica nos casos em que as cepas necessitam de concentrações superiores a 5 $\mu\text{g/ml}$ para inibição. Não foi observada resistência cruzada entre o fluconazol e o itraconazol (WHEAT *et al.*, 1997).

Em relação aos azólicos, o fluconazol é menos efetivo no tratamento da histoplasmose do que a anfotericina B ou itraconazol, estando mais associada com recidivas, entretanto penetra o líquido cerebrospinal. A indicação do uso do fluconazol ainda é objeto de debate, pois enquanto alguns autores contraindicam o seu uso na histoplasmose (ANDREU *et al.*, 2003), outros sugerem a sua indicação em pacientes que não toleram o itraconazol e na infecção do sistema nervoso central pelo *H. capsulatum* (KUROWSKI; OSTAPCHUK, 2002). Desta forma, se o fluconazol foi utilizado para tratamento da histoplasmose, o paciente deve ser monitorado clinicamente para se observar evidências de recidivas ou falhas terapêuticas (KUROWSKI; OSTAPCHUK, 2002).

Os valores de CIM, na fase filamentosa, observados neste estudo para o itraconazol, foram de 0,001-0,03 $\mu\text{g/ml}$ (média geométrica de 0,0073 $\mu\text{g/ml}$) e na fase leveduriforme de 0,0039-0,0312 $\mu\text{g/ml}$ (média geométrica de 0,016 $\mu\text{g/ml}$) menores do que os relatados por Li *et al.* (2000) com CIM₉₀ de 0,06 $\mu\text{g/ml}$, bem como por Andreu *et al.* (2003), de 0,125 $\mu\text{g/ml}$, na fase filamentosa, e semelhante a Polak e Dixon (1987), com média

geométrica de 0,019 µg/ml, com o fungo na fase leveduriforme. Estudos demonstram que o itraconazol apresenta eficácia terapêutica *in vivo*, quando a forma leveduriforme do *H. capsulatum* tem resultados *in vitro* com CIM menores que 0,01 µg/ml ante este azólico (WHEAT *et al.*, 2007a; MARQUES, 2009). O itraconazol é o mais efetivo entre os azólicos, por possuir ação em duas enzimas que participam da biossíntese do ergosterol (14- α -demetilase e 3-cetosterol redutase) (LOEFFLER; STEVENS, 2003; ANDREU *et al.*, 2003). É indicado em pacientes com histoplasmose leve ou moderadamente grave, bem como na terapia complementar após tratamento com anfotericina B. Por sua efetividade *in vitro* e os resultados obtidos no tratamento da histoplasmose, alguns autores consideram o medicamento de eleição em pacientes com AIDS e comprometimento renal, ou nas formas moderadas ou moderadamente graves da histoplasmose. O tratamento com itraconazol é efetivo nos casos leves e moderados de histoplasmose disseminada e na doença pulmonar aguda e crônica. Apesar de o itraconazol não ter ação tão rápida quanto à anfotericina B, ele tem a vantagem de ser mais bem tolerado para administração em longo prazo, com efeitos colaterais transitórios de caquexia, tontura e sintomas gastrointestinais. Não necessita ter ajuste em pacientes com nefropatia, por apresentar excreção biliar. Pode haver alteração nos testes de função hepática, mas os níveis geralmente retornam à normalidade após suspensão da terapia. O risco de hepatite é raro, mas monitorização cuidadosa e avaliação dos riscos e benefícios são recomendadas para prevenir suspensão desnecessária da droga (KUROWSKI; OSTAPCHUK, 2002). Deve-se, entretanto, ter cuidado no uso concomitante dos azólicos com efavirenz (inibidor da transcriptase reversa, não análogo de nucleosídeo), pois o efavirenz no esquema TARV pode diminuir consideravelmente os níveis séricos do itraconazol (KOO; HAMILL; ANDRADE, 2007).

O voriconazol é da classe dos triazólicos, com estudos demonstrando mais atividade *in vitro* perante fungos dimórficos, como *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum* que a anfotericina B (LOEFFLER; STEVENS, 2003; FREIFELD *et al.*, 2009). Neste estudo, foi observado para o voriconazol CIM de 0,0078-0,5 µg/ml (média geométrica de 0,097 µg/ml) na fase filamentosa e CIM de 0,002-0,03 µg/ml (média geométrica de 0,010 µg/ml) na fase leveduriforme, valores menores do que o observado por Li *et al.* (2000), 0,03-2 µg/ml em estudo com o fungo na fase filamentosa, mas semelhante ao encontrado por Wheat *et al.* (2006) (0,007-0,25 µg/ml) para a fase de levedura.

Esses achados corroboram estudos anteriores demonstrativos de que o voriconazol pode ser menos efetivo no tratamento da histoplasmose do que o itraconazol, já que a média da CIM para o voriconazol é maior do que para o itraconazol, apesar de ser bem menor do que

para o fluconazol (WHEAT *et al.*, 2006). Alguns autores sugerem que a exposição ao fluconazol está associada à redução na sensibilidade ao voriconazol (pois este apresenta semelhança estrutural àquele) em aproximadamente 40% das cepas (KAUFFMAN, 2007), sendo observado neste experimento que exatamente 40% das cepas testadas que apresentaram CIM mais elevados para fluconazol também exibiram para voriconazol. O CLSI (NCCLS), definiu como ponto de corte para o voriconazol: $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ como sensível, $2 \mu\text{g/ml}$ como sensível, dependendo da dose, e $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ como resistente (SABLE; STROHMAIER; CHODAKEWITZ, 2008). No Estado do Ceará ainda não se utiliza o voriconazol para tratamento da histoplasmose.

Tanto o voriconazol como o posaconazol obtiveram sucesso no tratamento de formas diferentes de histoplasmose, mas os dados, até o momento, são insuficientes para se realizar uma recomendação do uso destes, baseado em evidências, permanecendo a asserção que todos os demais azólicos são opções de segunda linha em relação ao itraconazol. É importante ressaltar que os azólicos são hepatotóxicos. Assim, os níveis das enzimas hepáticas devem ser mensurados no início do tratamento, e pelo menos com uma, duas e quatro semanas, e a cada três meses durante a terapia (WHEAT *et al.*, 2007a).

Não existe consenso entre os autores acerca da verdadeira importância do estudo da CFM em relação à CIM *in vitro*, e nem mesmo sobre o ponto de leitura da CFM (LI *et al.*, 2000). De modo geral, as cepas oriundas do Nordeste do Brasil, apresentaram CIM maiores do que as provenientes do Sudeste brasileiro, e ambas apresentaram CIM menores do que as observadas em cepas não brasileiras, relatadas na literatura, demonstrando variação quanto ao perfil geoclimático e populacional, requerendo mais estudos para elucidar a verdadeira importância de tais diferenças, mas podendo demonstrar que cepas diferentes podem causar variadas apresentações clínicas e perfis de sensibilidade antimicrobiana também diferenciadas.

Em busca de novas estratégias terapêuticas que acarretem menos reação adversa com o mesmo nível de eficácia aos antifúngicos já estabelecidos, foi realizado teste de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* pelo método da microdiluição (CLSI, 2002), a fim de avaliar o perfil de sensibilidade *in vitro* da combinação sulfametoxazol/trimetoprim (SMX/TMP) ante as cepas de *H. capsulatum* obtidas neste estudo.

O cotrimoxazol é a combinação das drogas sulfametoxazol e trimetoprim, que inibem a biossíntese dos folatos. As sulfonamidas competem com o ácido *p*-aminobenzóico (PABA), e, assim, interferem com a síntese microbiana de di-idrofolato, uma etapa essencial na síntese das purinas e DNA (CASTELLI; NGUYEN; MACREADIE, 2001;

CHRISTENSEN; MACKENZIE, 2008). O trimetoprim age sinergicamente, inibindo a conversão de diidrofolato a tetraidrofolato, que é a etapa seguinte desta via metabólica (GANGJEE; KURUP; NAMJOSHI, 2007).

Na literatura, os estudos com sulfametoxazol *versus* fungos são descritos, como, por exemplo, sendo esta droga efetiva contra *Cryptococcus neoformans in vitro* (HANAFY *et al.*, 2007). A combinação de SMX/TMP também foi efetiva contra *Aspergillus fumigatus in vitro* (AFELTRA *et al.*, 2002; YEKUTIEL *et al.*, 2004), bem como para *Paracoccidioides brasiliensis* (THOMAZ *et al.*, 2008) *in vivo*. Ademais, a associação SMX/TMP é usada no tratamento de pneumonia pelo *Pneumocystis jirovecy*, diminuindo a ocorrência desta infecção em pacientes imunocomprometidos (PATEL *et al.*, 2003; SEGER, 2008).

Estudos demonstram a eficácia do cotrimoxazol para profilaxia de pneumonia por *Pneumocystis jirovecy*, e toxoplasmose, em pacientes HIV positivos, reduzindo a morbidade e mortalidade, tanto em crianças como em adultos, atuando como um complemento à ação dos antirretrovirais (GRAHAM, 2007; MEYERS *et al.*, 2007; ZACHARIAH *et al.*, 2008). Há evidências de que pacientes, em uso de SMX/TMP profilático, apresentam menor incidência de infecções por bactérias comuns e diarreia do viajante (GALLANT; MOORE; CHAISSON, 1995; LIU *et al.*, 2009); sendo também eficaz na profilaxia do *Pneumocystis jirovecy* em indivíduos com comprometimento imunológico, mas HIV negativos (GREEN *et al.*, 2007).

Neste estudo, a atividade antifúngica do SMX/TMP ante cepas de *H. capsulatum* foi demonstrada com a inibição do crescimento de 74 cepas, com CIM de 0.078/0.0156 a 0.312/0.0625 mg/ml. As CIMs das cepas do Nordeste do Brasil apresentaram valores maiores do que os do Sudeste do Brasil ($p=0,0914$).

Estes dados podem estar correlacionados com diferenças geoclimáticas ou ainda com o perfil da população, visto que a região Nordeste do Brasil apresenta temperaturas elevadas, com média anual variando entre 20° e 28°, e vegetação diversificada, compreendendo desde algumas áreas isoladas com floresta tropical úmida, o cerrado, com árvores de baixo porte, vegetações litorâneas, que inclui os manguezais, com rico ecossistema e, com maior quantidade, a caatinga, caracterizada pela presença de xerófitos, que perdem as folhas nas estações secas. A região Sudeste, a mais populosa do Brasil, exhibe temperaturas bastante diversificadas em razão da presença de montanhas, sendo a vegetação predominante a Mata Atlântica, que se caracteriza pela grande biodiversidade de fauna e flora.

Afeltra *et al.* (2002) trabalharam com sulfonamidas ante espécies de *Aspergillus in vitro* e demonstraram a influência da composição do meio de cultura em testes de sensibilidade com SMX-TMP, observando que o RPMI, apesar de ser recomendado pelo

NCCLS (2002), contém quatro vezes mais PABA do que o *Yeast Nitrogen base* (YNB), de acordo com o fabricante. Consequentemente, as CIMs com estudos que utilizam RPMI são significativamente maiores do que os com YNB. Segundo Hanafy *et al.* (2007), em estudo utilizando sulfametoxazol ante cepas de *Cryptococcus* spp., os CIMs, variaram de 0,125-0,250 mg/ml, em meio com RPMI, enquanto que, em meio que não continha PABA, tais como YNB, ou compostos relacionados ao PABA, as CIMs diminuíram para 0,031-0,062 mg/ml.

Partindo do princípio, como há pouco expresse, de que as sulfonamidas competem com o ácido *p*-aminobenzóico (PABA), e assim interferem com a síntese microbiana de diidrofolato, que é uma etapa essencial na síntese das purinas e DNA (CASTELLI; NGUYEN; MACREADIE, 2001; CHRISTENSEN; MACKENZIE, 2008), era de se esperar que SMX-TMP não possuísse ação sendo testado em RPMI, porém as cepas de *H. capsulatum* foram inibidas. Provavelmente, se fosse utilizado o YNB as CIMs, seriam menores, entretanto, não foi observado crescimento do *H. capsulatum* no meio YNB, impossibilitando os experimentos em tal meio.

Na paracoccidiodomicose, a associação SMX/TMP apresenta bons resultados na doença localizada, doença disseminada moderada e como tratamento de suporte após anfotericina B e no envolvimento do sistema nervoso central. As sulfonamidas permanecem como a droga de escolha para paracoccidiodomicose em países em desenvolvimento com poucas condições socioeconômicas, sendo o tratamento realizado por períodos em torno de dois anos, visto que tratamentos curtos aumentam a incidência de recorrências (HAHN *et al.*, 2003). A associação SMX/TMP é utilizada no tratamento de infecções fúngicas causadas por *Pneumocystis jirovecii* em pacientes HIV positivos. No Brasil, entretanto, esta combinação nunca foi utilizada no tratamento de histoplasmose, associada ou não a antifúngicos.

A eficácia da SMX/TMP, *in vivo* ou *in vitro*, ante cepas de *H. capsulatum* var. *capsulatum*, até o presente momento, não havia sido relatada. Existem, porém, relatos de histoplasmose por *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*, na África, tratada com sucesso por SMX/TMP (EGERE *et al.*, 1978; AJAYI *et al.*, 1986). Em virtude da ausência de estudos anteriores, torna-se difícil analisar os parâmetros *in vitro* observados e suas possíveis correlações *in vivo*. Portanto, apesar da evidência deste trabalho, estudos em modelo animal são necessários para avaliar o significado *in vivo* desses resultados *in vitro*.

A correlação entre os resultados dos testes de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* das cepas de *H. capsulatum* avaliadas neste estudo, com a resposta *in vivo*, é objeto dos mesmos paradigmas de outros estudos. Os resultados não são totalmente fidedignos já que, a

mensuração da CIM não é realizada por métodos físicos ou químicos; os fatores inerentes ao hospedeiro são mais importantes do que a sensibilidade do fungo a determinado medicamento, na evolução da doença; a sensibilidade ou a resistência do fungo *in vitro* não indicam sucesso ou falha terapêutica, respectivamente (REX; PFALLER, 2002).

Desta forma, os resultados dos testes de sensibilidade do ensaio sob relato, são apenas parte de um processo para avaliar uma possível resposta terapêutica do paciente, indicando, de acordo com a regra 90-60, que as infecções ocasionadas por cepas sensíveis *in vitro* respondem ao tratamento *in vivo*, em 90% dos casos, e cepas resistentes *in vitro* respondem em, aproximadamente, 60% dos casos (REX; PFALLER, 2002).

O diagnóstico da histoplasmose nesta pesquisa foi realizado quando a doença se apresentava já sob a forma disseminada, o que também foi relatado em estudo anterior de Daher *et al.*, 2006. Em estudo retrospectivo dos prontuários dos pacientes, porém, observou-se relato de internamento anterior por pneumopatia, sendo postulado como causa provável desta, a infecção por *Pneumocystis jirovecii*, com base nos dados clínicos e radiológicos, sem, contudo, a confirmação laboratorial, mediante observação da morfologia do microrganismo em amostra de escarro, lavado broncoalveolar, aspirado traqueal e biopsia (SIDRIM; MOREIRA, 1999). O tratamento de escolha nos casos em que o diagnóstico provável era pneumocistose foi a combinação SMX/TMP, observando-se a melhora clínica dos pacientes, com a instituição da alta hospitalar. Após algumas semanas, o paciente era re-internado já com quadro clínico de doença disseminada. A possível explicação para esse fato é que, como demonstrado pelo estudo da sensibilidade *in vitro*, o *H. capsulatum* é sensível à combinação SMX/TMP, e, desta forma, o quadro clínico inicial do paciente era de histoplasmose na forma pulmonar aguda, tendo ele obtido melhora clínica com o uso da terapêutica instituída para “pneumocistose”, mas sem controle da infecção, e, em razão do estado de imunossupressão do paciente, este evoluiu para doença disseminada. Concomitante ao relato de Brilhante *et al.* (2010), foi descrito por Bush *et al.* (2010) o caso de um paciente com histoplasmose disseminada e AIDS tratado exclusivamente com SMX/TMP, obtendo melhora clínica do quadro.

Esses relatos reafirmam a necessidade de confirmação da etiologia das pneumopatias em pacientes imunodeprimidos, sugerindo-se o diagnóstico mediante a coleta de amostras de escarro e de lavado brônquico, em que a forma leveduriforme do *H. capsulatum* pode ser distinguida do *P. jirovecii* por sua localização intracelular, menor tamanho e formato oval (SCHNADIG; WOODS, 2009). E que o diagnóstico de histoplasmose deve ser suspeitado nos casos em que se observa correlação entre aspectos

clínicos (imunossupressão, perda de peso, diarreia e sintomas respiratórios) e laboratoriais (níveis de LDH elevados e contagem de linfócitos CD4 baixa).

As perspectivas para esse estudo sugerem que novas opções diagnósticas, como os testes para detecção de antígenos de *H. capsulatum*, devem ser instituídas no Estado do Ceará, a fim de possibilitar o diagnóstico precoce da histoplasmose, para instituição de terapêutica adequada. E, que as variações nos resultados referentes às regiões Nordeste e Sudeste, requerem mais estudos para elucidar a verdadeira importância das diferenças quanto ao perfil geoclimático e populacional. Quanto aos resultados do teste de sensibilidade *in vitro* da SMX/TMP ante as cepas do *H. capsulatum*, estudos em modelo animal são necessários para avaliar o significado *in vivo* desses resultados *in vitro*.

8 CONCLUSÕES

- 1 As características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais de casos de histoplasmose por *H. capsulatum* em indivíduos HIV positivos foram semelhantes a outros estudos.
- 2 Os índices pluviométricos locais e a velocidade dos ventos não interferem no número de internamentos por histoplasmose em indivíduos HIV positivos no Estado do Ceará.
- 3 O tratamento profilático para histoplasmose deve ser prescrito em todos os pacientes HIV positivos com a contagem de CD 4 menor do que 150 células/mm³, pois o Estado do Ceará é zona endêmica de histoplasmose.
- 4 As cepas de *H. capsulatum* demonstraram sensibilidade às drogas antifúngicas utilizadas na terapia da histoplasmose. Os fármacos itraconazol e anfotericina B mostraram os menores valores de CIM, seguidas de voriconazol e fluconazol.
- 5 As CIM dos antifúngicos anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol e caspofungina ante as cepas de *H. capsulatum* var. *capsulatum* oriundas do Nordeste do Brasil, apresentaram resultados mais elevados do que as obtidas ante as cepas provenientes do Sudeste brasileiro, e, ambas exibiram CIM menores do que as observadas em cepas não brasileiras, relatadas na literatura.
- 6 Todas as cepas de *H. capsulatum* testadas apresentaram sensibilidade *in vitro* à combinação sulfametoxazol/trimetoprim.

REFERÊNCIAS

- ACEITUNO, P. On the functioning of the Southern Oscillation in the South American sector. Part I; Surface climate. **Mon. Weather Rev.**, v. 116, p. 505-524, 1988.
- AFELTRA, J.; MEIS, J. F. G. M.; VITALE, R. G.; MOUTON, J. W.; VERWEIJ, P. E. *In Vitro* Activities of Pentamidine, Pyrimethamine, Trimethoprim, and Sulfonamides against *Aspergillus* Species. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, p. 2029-2031, 2002.
- AIDÉ, M. A. Histoplasmosis. **J. Bras. Pneumol.**, v. 35, n. 11, p. 1145-1151, 2009.
- AJAYI, B. G.; OSUNTOKUN, B.; OLURIN, O.; KALE, O. O.; JUNAID, T. A. Orbital histoplasmosis due to *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*: successful treatment with Septrin. **J. Trop. Med. Hyg.**, v. 89, n. 4, p. 179-187, 1986.
- AJELLO, L.; ZEIDBERG, L. D. Isolation of *Histoplasma capsulatum* and *Allescheria Boydii* from Soil. **Science**, v. 113, n. 2945, p. 662-663, 1951.
- ALENCAR, K.F.; AUGUSTO BORGES, C.S.; DIOGENES, M.J.N. Reações á histoplasmina e paracoccidioidina em Aracati (Estado do Ceará, Brasil). **Med. Cutan. Ibero-Latinoam.**, v. 20, n. 6, p. 275-278, 1992.
- ALMEIDA, F.; LACAZ, C. S. Cogumelo do gênero *Histoplasma* isolado de lesões de cromomicose. Associação de fungos nas lesões. **Folia Clin. Biol.**, v. 9, p. 65-69, 1939.
- ALVES, K. S. **Histoplasmoze disseminada e síndrome de imunodeficiência adquirida: estudo clínico-laboratorial de 28 casos.** 1996. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 1996.
- AMARO, M. H.; MUCCIOLI, C.; ABREU, M. T. Ocular histoplasmosis-like syndrome: a report from a nonendemic área. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 70, n. 4, p. 577-580, 2007.
- ANDREU, C. M.; LEÓN, A. M.; MEDINA, Y. E.; MACHÍN, G. M.; LANCHAS, M. R.; ZARAGOZÍ, M. T. In vitro sensitivity of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* to amphotericin B, ketoconazole, itroconazole and fluconazole. **Rev. Cubana Med. Trop.**, v. 55, n. 2, p. 76-82, 2003.
- ANYAMBA, A.; CHRETIEN, J.P.; SMALL, J.; TUCKER, C. J.; LINTHICUM, K.J. Developing global climate anomalies suggest potential disease risks for 2006 – 2007. **Int. J. Health Geogr.**, v. 5, p. 60, 2006.
- ANSTEAS, G. M.; PATTERSON, T. F. Endemic mycoses. In: ANAISSIE, E. J.; MCG INNIS, M. R.; PFALLER, M. A. **Clinical mycology** New York: Elsevier, 2009. p. 359-362.
- ARAUJO, F. G. First isolation of *Histoplasma capsulatum* from the soil in Minas Gerais. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 12, n. 3, p. 185-191, 1970.
- ARIKAN, S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. **Med. Mycol.**, v. 45, n. 7, p. 569-587, 2007.

ASHOK K.; YAMAGATA, T. The El Niño with a difference. **Nature**, v. 461, p. 481-483, 2009.

BARADKAR, V. P.; TENDOLKAR, U.; BAVEJA, S.; KAMATH, S. A rare case of *Histoplasma fungemia* in an AIDS patient. **Indian J. Med. Microbiol.**, v. 29, p. 188-191, 2011.

BARNETT, D.; WALKER, B.; LANDAY, A.; DENNY, T. N. CD4 immunophenotyping in HIV infection. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 6, Suppl. 11, p. 7-15, 2008.

BAUM, G. L.; SCHWARZ, J. Chronic pulmonary histoplasmosis. **Am. J. Med.**, v. 33, n. 6, p. 873-879, 1962.

BENNETT, J. E. Agentes Antimicrobianos: agentes antifúngicos. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. p. 1103-1118.

BEZERRA, F. S. **Histoplasmose infecção em pacientes HIV/AIDS residentes na cidade de Fortaleza, Ceará**. Dissertação (Mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

BODHADE, A. S.; GANVIR, S. M.; HAZAREY, V. K. Oral manifestations of HIV infection and their correlation with CD4 count. **J. Oral Sci.**, v. 53, n. 2, p. 203-211, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Critérios de definição de casos de AIDS em adultos e crianças**. Brasília, 2003.

_____. Portaria nº 5, de 21 de fevereiro de 2006. Brasília, 2006.

BRILHANTE, R. S.; CAVALCANTE, C. S.; SOARES-JUNIOR, F. A.; MONTEIRO, A. J.; BRITO, E. H.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Evaluation of *Microsporum canis* in different methods of storage. **Med. Mycol.**, v. 42, n. 6, p. 499-504, 2004.

BRILHANTE, R. S. N.; FECHINE, M. A. B.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F. G.; RIBEIRO, J. F.; MONTEIRO, A. J.; LIMA, R. A. C.; MESQUITA, J. R. L.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. C. In vitro effect of sulfamethoxazole-trimethoprim against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 54, n. 9, p. 3978-3979, 2010.

BURKE, D. G.; EMANCIPATOR, S. N.; SMITH, M. C.; SALATA, R. A. Histoplasmosis and kidney disease in patients with AIDS. **Clin. Infect. Dis.**, v. 25, p. 281-284, 1997.

BUSH, L. M.; PALRAJ, B.; CHAPARRO-ROJAS, F.; PEREZ, M. T. Disseminated Histoplasmosis Responsive to Trimethoprim-Sulfamethoxazole in an AIDS Patient. **Infect. Dis. Clin. Pract.**, v. 18, n. 4, p. 239-242, 2010.

BUTT, A. A.; MICHAELS, S.; GREER, D.; CLARK, R.; KISSINGER, P.; MARTIN, D. H. Serum LDH level as a clue to the diagnosis of histoplasmosis. **AIDS Read**, v. 12, n. 7, p. 317-321, 2002.

CAHN, P.; BELLOSO, W. H.; MURILLO, J.; PRADA-TRUJILLO, G. Emerging and re-emerging diseases in Latin America. **Infect. Dis. Clin. N. Am.**, v. 14, p. 185-209, 2000.

CAREY, F. M.; QUAH, S. P.; ORR, R.; MCBRIDE, M. Histoplasmosis as a presentation of Human Immunodeficiency Virus Infection. **Ulster Med. J.**, v. 71, n. 2, p. 147-149, 2002.

CARVALHO, A. Novos ensaios sobre os reatores positivos à histoplasmina na cidade do Rio de Janeiro. Estudo baseado em 3653 indivíduos. **Rev. Bra. Tuberc.**, v. 22, p. 693-772, 1954.

CASADEVALL, A. Determinants of virulence in the pathogenic fungi. **Fungal Biol. Rev.**, v. 21, p. 130-132, 2007.

CASTELLI, L. A.; NGUYEN, N. P.; MACREADIE, I. G. Sulfa drug screening in yeast: fifteen sulfa drugs compete with *p*-aminobenzoate in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 199, p. 181-184, 2001.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Revision of the CDC surveillance case definition of acquired immunodeficiency syndrome. **MMWR**, v. 36, Suppl. 1, p. 1S-15S, 1987.

CHANDRASEKAR, P. H.; SOBEL, J. D. Micafungin: A New Echinocandin. **Clin. Infect. Dis.**, v. 42, p. 1171-1178, 2006.

CHANDRASEKAR, P. H. Amphotericin B lipid complex: treatment of invasive fungal infections in patients refractory to or intolerant of amphotericin B deoxycholate. **Ther. Clin. Risk Manag.**, v. 4, n. 6, p. 1285-1294, 2008.

CHANG, M. R.; TAIRA, C. L.; PANIAGO, A. M. M.; TAIRA, D. L.; CUNHA, R. V.; WANKE, B. Study of 30 cases of Histoplasmosis observed in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 49, n. 1, p. 37-39, 2007.

CHRISTIE, A.; PETERSON, J. C. Pulmonary calcifications in negative reactors to tuberculin. **Am. J. Publ. Health**, v. 35, p. 1131-1147, 1945.

COELHO, I. C. B.; GADELHA, J. B.; CÂMARA, L. M. C. Estudo sobre a paracoccidiodomicose no Estado do Ceará: análise preliminar da paracoccidiodomicose-infecção, utilizando reações intradérmicas com paracoccidiodina e histoplasmina. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 19, p. 97-98, 1986.

COHEN, M. L. Changing patterns of infectious disease. **Nature**, v. 406, p. 17, 2000.

COLOMBO, A. L.; ALVES, S. H. Testes de susceptibilidade a antifúngicos. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 50-62.

COMRIE, A. C. Climate Factors Influencing Coccidiodomycosis Seasonality and Outbreaks. **Environ. Health Perspect.**, v. 113, n. 6, 2005.

CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G.; FECHINE, M. A. B.; COSTA, A. K. F.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. C. *In vitro* activities of caspofungin, amphotericin B and azoles against *Coccidioides posadasii* strains from Northeast, Brazil. **Mycopathologia**, v. 161, p. 21-26, 2006.

CORDEIRO, R. A.; COELHO, C. G. V.; BRILHANTE, R. S. N.; SIDRIM, J. J. C.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; MOURA, F. B. P.; ROCHA, F. A. C.; ROCHA, M. F. G. Serological evidence of *Histoplasma capsulatum* infection among dogs with leishmaniasis in Brazil **Acta Tropica**, 2011. In press.

CORTI, M. E.; CENDOYA, C. A.; SOTO, I.; ESQUIVEL, P.; TRIONE, N.; VILLAFANE, M. F.; CORBERA, K. M.; HELOU, S.; NEGRONI, R. Disseminated Histoplasmosis and AIDS: Clinical Aspects and Diagnostic Methods for Early Detection. **AIDS Patient Care STDs**, v. 14, n. 3, p. 149-154, 2000.

COUPPIE, P.; SOBESKY, M.; AZNAR, C.; BICHAT, S.; CLYTI, E.; BISSUEL, F.; GUEDJ, M.; ALVAREZ, F.; DEMAR, M.; LOUVEL, D.; PRADINAUD, R.; CARME, B. Histoplasmosis and acquired immunodeficiency syndrome: A study of prognostic factors. **Clin. Infect. Dis.**, v. 38, p. 134–138, 2004.

CHRISTENSEN, K. E.; MACKENZIE, R. E. Mitochondrial methylenetetrahydrofolate dehydrogenase, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase, and formyltetrahydrofolate synthetases. **Vitam. Horm.**, v. 79, p. 393-410, 2008.

CRUZ, R.; OPAZO, H.; BARTHEL, E.; CAMPOS, S.; PIONTELLI, E. Reporte clinico: histoplasmosis diseminada aloctona en un paciente con sindrome de inmunodeficiencia adquirida. **Bol. Micol**, v. 21, p. 77 – 84, 2006.

CURY, G. C.; DINIZ FILHO, A.; CRUZ, A. G. C.; HOBAIKA, A. B.S. Surto de histoplasmosis em Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, n. 5, p. 483-486, 2001.

CUTLER, J. E.; DEEPE, G. S.; KLEIN, B. S. Advances in combating fungal diseases: vaccines on the threshold. **Nat. Rev.**, v. 5, p. 13-28, 2007.

DAHER, E. F.; BARROS, F. A. S.; SILVA, G. B.; TAKEDA, C. F.; MOTA, R. M.; FERREIRA, M. T.; MARTINS, J. C.; OLIVEIRA, S. A.; GUTIÉRREZ-ADRIANZÉN, O. A. Risk Factors For Death In Acquired Immunodeficiency Syndrome–Associated Disseminated Histoplasmosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 74, p. 600–603, 2006.

DAHER, E. F.; SILVA, G. B.; BARROS, F. A.; TAKEDA, C. F.; MOTA, R. M.; FERREIRA, M. T.; OLIVEIRA, S. A.; MARTINS, J. C.; ARAÚJO, S. M.; GUTIÉRREZ-ADRIANZÉN, O. A. Clinical and laboratory features of disseminated histoplasmosis in HIV patients from Brazil. **Trop. Med. Int. Health**, v. 12, n. 9, p. 1108–1115, 2007.

DANIEL, T. M.; BAUM, G. L. Drama and discovery: the story of histoplasmosis. **Contrib. Med. Stud.**, v. 48, p. 1-174, 2002.

DEAN, G. The Curse of the Pharaohs. **World Medicine**, p. 17-21, 1975.

DEAN, G. The Curse of the Pharaohs. In: _____. **The turnstone: a doctor's story.** [S.l.]: Liverpool University Press, 2002. p. 92-96.

DERESINSKI, S. C.; STEVENS, D. A. Caspofungin. **Clin. Infect. Dis.**, v. 36, n. 11, p. 1445-1457, 2003.

DIÓGENES, M. J. N.; GONÇALVES, H. M.; MAPURUNGA, A. C.; ALENCAR, K. F.; ANDRADE, F. B.; NOGUEIRA-QUEIROZ, J. A. Histoplasmin and paracoccidioidin reactions in Serra de Pereiro (Ceara State-Brazil). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 32, n. 2, p. 116-120, 1990.

DISMUKES, W. E. Introduction to antifungal drugs. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, p. 653-657, 2000.

DONOGHUE, M.; SEIBEL, N. L.; FRANCIS, P. S.; WALSH, T. J. Fungal infections of the respiratory tract. In: ANAISSIE, E. J.; MCGINNIS, M. R.; PFALLER, M. A. **Clinical mycology.** New York: Elsevier, 2009. p. 574-576.

DURKIN, M. M.; CONNOLLY, P. A.; KARIMI, K.; WHEAT, E.; SCHNIZLEIN-BICK, C.; ALLEN, S. D.; ALVES, K.; TEWARI, R. P.; KEATH, E. Pathogenic Differences between North American and Latin American Strains of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in Experimentally Infected Mice. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 4370-4373, 2004.

EDWARDS, P. Q.; BILLINGS, E. L. Worldwide pattern of skin sensitivity to histoplasmin. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 20, n. 2, p. 288-319, 1971.

EISSENBERG, L. G.; GOLDMAN, W. Histoplasma variation and adaptive strategies for parasitism: new perspectives on histoplasmosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 4, n. 4, p. 411-421, 1991.

EGERE, J. U.; GUGNANI, H. C.; OKORO, A. N.; SUSEELAN, A. V. African histoplasmosis in Eastern Nigeria: report of two culturally proven cases treated with septrin and amphotericin B. **J. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, n. 11, p. 225-229, 1978.

EMMONS, C. W. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil. **Public Health Rep.**, v. 64, n. 28, p. 892-896, 1949.

EMMONS, C. W. Histoplasmosis: Animal Reservoirs and Other Sources in Nature of Pathogenic Fungus, *Histoplasma*. **Am. J. Public Health Nat. Health**, v. 40, n. 4, p. 436-440, 1950.

EPSTEIN, P. Climate change and emerging infectious diseases. **Microbes Infect.**, v. 3, p. 747-754, 2001.

FAÇANHA, M. C.; CAFÉ, V. S.; WANKE, B.; SOUZA, A. Q.; BORNAY, F. L.; COELHO FILHO, J. Estudo soropidemiológico de paracoccidioidomicose e histoplasmosose em Palmácia-Ce. (resumo). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 24, Suppl. 2, p. 28, 1991.

FAVA NETTO, C.; SILVA, U. A.; CHAMMAS, F.; LACAZ, C. S. Histoplasmose epidêmica. Estudo clínico, radiológico, micológico e imunológico de surto ocorrido no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 9, p. 222–232, 1967.

FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S. Histoplasmose. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 42, n.2, p. 192-198, 2009.

FERREIRA, O. G.; CARDOSO, S. V.; BORGES, A. S.; FERREIRA, M. S.; LOYOLA, A. M. Oral Histoplasmosis in Brazil. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 93, n. 6, p. 654-659, 2002.

FREIFELD, A.; PROIA, L.; ANDES, D.; BADDOUR, L. M.; BLAIR, J.; SPELLBERG, B.; ARNOLD, S.; LENTNEK, A.; WHEAT, L. J. Voriconazole Use for Endemic Fungal Infections. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 53, n. 4, p. 1648–1651, 2009.

FRESSATTI, R.; DIAS-SIQUEIRA, V. L.; SVIDZINSKI, I. E.; HERRERO, F.; KEMMELMEIER, C. A médium for inducing conversion of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* into its yeast-like form. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 53-58, 1992.

FURCOLOW, M. L.; BRASHER, C. A. Chronic progressive (cavitary) histoplasmosis as problem in tuberculosis sanatoriums. **Am. Rev. Tuberc.**, v. 73, n. 5, p. 609-619, 1956.

GALLANT, J. E.; MOORE, R. D.; CHAISSON, R. E. Prophylaxis for opportunistic infections in patients with HIV infection. **Ann. Intern. Med.**, v.122, n. 9, p. 730-731, 1995.

GANGJEE, A.; KURUP, S.; NAMJOSHI, O. Dihydrofolate reductase as a target for chemotherapy in parasites. **Curr. Pharm. Des.**, v. 13, n. 6, p. 609-639, 2007.

GASPARETTO, E. L.; CARVALHO NETO, A.; ALBERTON, J.; DAVAUS, T.; PIANOVSKI, M. A. D.; YAMAUCHI, E.; TORRES, L. F. B. Histoplasmoma como lesão isolada do sistema nervoso central em paciente imunocompetente. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 63, n. 3A, p. 689-692, 2005.

GOLDANI, L. Z.; AQUINO, V. R.; LUNARDI, L. W.; CUNHA, V. S.; SANTOS, R. P. Two specific strains of *Histoplasma capsulatum* causing mucocutaneous manifestations of histoplasmosis: preliminary analysis of a frequent manifestation of histoplasmosis in southern Brazil. **Mycopathologia**, v. 167, n. 4, p. 181-186, 2009.

GONZÁLEZ, G. M. *In vitro* activities of isavuconazole against opportunistic filamentous and dimorphic fungi. **Med. Mycol.**, v. 47, p. 71-76, 2009.

GOODWIN, R. A.; LOYD, J. E.; DES PREZ, R. M. Histoplasmosis in normal hosts. **Medicine (Baltimore)**, v. 60, n. 4, p. 231-266, 1981.

GRAHAM, S. M. HIV-related pulmonary disorders: practice issues. **Ann. Trop. Paediatr.**, v. 27, n. 4, p. 243-252, 2007.

GRAYBILL, J. R.; NAJVAR, L. K.; MONTALBO, E. M.; BARCHIESI, F. J.; LUTHER, M. F.; RINALDI, M. G. Treatment of histoplasmosis with MK-0991 (L-743,872). **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, p. 151–153, 1998.

GREEN, H.; PAUL, M.; VIDAL, L.; LEIBOVICI, L. Prophylaxis of Pneumocystis pneumonia in immunocompromised non-HIV-infected patients: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Mayo Clin. Proc.**, v. 82, n. 9, p. 1052-1059, 2007.

GUIMARÃES, A. J.; NOSANCHUK, J. D.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Diagnosis of Histoplasmosis. **Braz. J. Microbiol.**, v. 37, p. 1-13, 2006.

GUTIERREZ, M. E.; CANTON, A.; SOSA, N.; PUGA, E.; TALAVERA, L. Disseminated histoplasmosis in patients with AIDS in Panama: a review of 104 cases. **Clin. Infect. Dis.**, v. 40, n. 8, p. 1199-1202, 2005.

HAGE, C. A.; WHEAT, L. J.; LOYD, J.; ALLEN, S. D.; BLUE, D.; KNOX, K. S. Pulmonary histoplasmosis. **Semin. Respir. Crit. Care Med.**, v. 29, n. 2, p. 151-165, 2008.

HAHN, R. C.; MORATO-CONCEIÇÃO, Y. T.; SANTOS, N. L.; FERREIRA, J. F.; HAMDAN, J. S. Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and *in vitro* resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. **Mycoses**, v. 46, p. 342-347, 2003.

HAJJEH, R. A.; PAPPAS, P. G.; HENDERSON, H.; LANCASTER, D.; BAMBERGER, D. M.; SKAHAN, K. J.; PHELAN, M. A.; CLOUD, G.; HOLLOWAY, M.; KAUFFMAN, C. A.; WHEAT, L. J.; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group. Multicenter case-control study of risk factors for histoplasmosis in human immunodeficiency virus-infected persons. **Clin. Infect. Dis.**, v. 32, p. 1215-1220, 2001.

HANAFY, A.; UNO, J.; MITANI, H.; KANG, Y.; MIKAMI, Y. In vitro antifungal activities of sulfa drugs against clinical isolates of *Aspergillus* and *Cryptococcus* species. **Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 38, p. 47-56, 2007.

HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M. J. **Atlas of Clinical Fungi**. 2. ed, [S.l.]: Centraalbureau voor Schimmelcultures Utrecht, Universitat Rovira i Virgili, 2000.

HOSPENTHAL, D. R.; ROGERS, A. L. Immunology of fungal infection. **Curr. Top. Med. Mycol.**, v. 6, p. 127-188, 1995.

HOSPENTHAL, D. R.; MURRAY, C. K.; RINALDI, M. G. The role of antifungal susceptibility testing in the therapy of candidiasis. **Diagn. Micr. Infec. Dis.**, v. 48, p. 153-160, 2004.

HUANG, L.; CROTHERS, K. HIV-associated opportunistic pneumonias. **Respirology**, v. 14, n. 4, p. 474-485, 2009.

HUBER, F.; NACHER, M.; AZNAR, C.; PIERRE-DEMAR, M.; GUEDJ, M. E.; VAZ, T.; VANTILCKE, V.; MAHAMAT, A.; MAGNIEN, C.; CHAUVET, E.; CARME, B.; COUPPIÉ, P. AIDS-related *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* infection: 25 years experience of French Guiana. **AIDS**, v. 22, p. 1047-1053, 2008.

HURTLEY, S. El Niño's Cousin. **Science**, v. 325, p. 8, 2009.

IDEMYOR, V. Emerging opportunistic fungal infections: where are we heading? **J. Natl. Med. Assoc.**, v. 95, p. 1211-1215, 2003.

KANG, D. W.; CANZIAN, M.; BEYRUTI, R.; JATENE, F. B. Sclerosing mediastinitis in the differential diagnosis of mediastinal tumors. **J. Bras. Pneumol.**, v. 32, n. 1, p. 78-83, 2006.

KARIMI, K.; WHEAT, L. J.; CONNOLLY, P.; CLOUD, G.; HAJJEH, R.; WHEAT, E.; ALVES, K.; LACAZ, C. D.; CDA, S.; KEATH, E. Differences in histoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome in the United States and Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 186, n. 11, p. 1655-1660, 2002.

KAUFFMAN, C. A. Endemic Mycoses: Blastomycosis, Histoplasmosis, and Sporotrichosis. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 20, p. 645-662, 2006.

KAUFFMAN, C. A. Histoplasmosis: a Clinical and Laboratory Update. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 20, n. 1, p. 115-132, 2007.

KAUFFMAN, C. A. Histoplasmosis. **Clin. Chest Med.**, v. 30, p. 217-225, 2009.

KERR, R. A. A Surprise La Niña. **Science**, v. 300, 2003.

KERR, R. A. El Niño or La Niña? The Past Hints at the Future. **Science**, v. 309, 2005.

KOHLER, S.; WHEAT, L. J.; CONNOLLY, P.; SCHNIZLEIN-BICK, C.; DURKIN, M.; SMEDEMA, M.; GOLDBERG, J.; BRIZENDINE, E. Comparison of the echinocandin caspofungin with amphotericin B for treatment of histoplasmosis following pulmonary challenge in a murine model. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, p. 1850-1854, 2000.

KOO, H. L.; HAMILL, R. J.; ANDRADE, R. A. Drug-Drug Interaction between Itraconazole and Efavirenz in a Patient with AIDS and Disseminated Histoplasmosis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 45, p. 77-79, 2007.

KOVATS, R. S.; BOUMA, M. J.; HAJAT, S.; WORRALL, E.; HAINES, A. El Niño and health. **Lancet**, v. 362, p. 1481-1489, 2003.

KUROKAWA, C. S.; SUGIZAKI, M. F.; PERAÇOLI, M. T. S. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. **Rev. Inst. Méd. Trop. S. Paulo**, v. 40, n. 3, 1998.

KUROWSKI, R.; OSTAPCHUK, M. Overview of Histoplasmosis. **Ann. Fam. Med.**, v. 66, n. 66, p. 2247-2252, 2002.

KWON-CHUNG, K. J. Sexual stage of *Histoplasma capsulatum*. **Science**, v. 175, n. 19, p. 326, 1972.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LASS-FLORL, C.; PERKHOFER, S.; MAYR, A. In vitro susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods. **Mycoses**, v. 53, n. 1, p. 1-11, 2010.

LEMONTE, A. M.; WASHUM, K. E.; SMEDEMA, M. L.; SCHNIZLEIN-BICK, C.; KOHLER, S. M.; WHEAT, L. J. Amphotericin B combined with itraconazole or fluconazol for treatment of histoplasmosis. **J. Infect. Dis.**, v. 182, n. 2, p. 545-550, 2000.

LEIMANN, B. C. Q.; PIZZINI, C. V.; MUNIZ, M. M.; ALBUQUERQUE, P. C.; MONTEIRO, P. C. F.; REIS, R. S.; ALMEIDA-PAES, R.; LAZÉRA, M. S.; WANKE, B.; PÉREZ, M. A.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Histoplasmosis in a Brazilian center: clinical forms and laboratory tests. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 22, p. 141-146, 2005.

LI, R.; CIBLAK, M. A.; NORDOFF, N.; PASARELL, L.; WARNOCK, D. W.; MCGINNIS, M. R. *In Vitro* Activities of Voriconazole, Itraconazole, and Amphotericin B against *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, and *Histoplasma capsulatum*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, p. 1734-1736, 2000.

LIU, J.; BOLSTAD, D. B.; BOLSTAD, E. S.; WRIGHT, D. L.; ANDERSON, AC. Towards new antifolates targeting eukaryotic opportunistic infections. **Eukaryot. Cell**, v. 8, n. 4, p. 483-486, 2009.

LOEFFLER, J.; STEVENS, D. Antifungal drug resistance. **Clin. Infect. Dis.**, v. 36, p. S31-41, 2003.

LONDERO, A. T.; RAMOS, C. D. The status of histoplasmosis in Brazil. **Mycopathologia**, v. 3, p. 153-156, 1978.

LONDERO, A. T.; WANKE, B. Histoplasmosose capsulata. **J. Bras. Méd.**, v. 55, p. 94 -109, 1988.

MAPURUNGA, A. C. P.; GONÇALVES, H. M. G.; SILVA, J. B.; CABRAL, S. E. S. X.; DIÓGENES, M. J. N. Micoses profundas no Ceará: estudo dos casos diagnosticados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Ceará (1983-1988). **An. Bras. Dermatol.**, v. 65, n. 3, p. 117-118, 1990.

MARQUES, F. J. F. **Efeito inibitório das drogas antituberculose, antifúngicas e análogos químicos da isoniazida frente a *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, in vitro.** 2009. 122 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

MARTINEZ, R.; FIGUEIREDO, J. F. C. Diagnosis and empirical treatment of acute bacterial infections. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 36, p. 345-350, 2003.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **J. Bras. Pneumol.**, v. 32, n. 5, p. 449-60, 2006.

MCGINNIS, M. R.; KATZ, B. *Ajellomyces* and its synonym *Emmonsia*. **Mycotaxon**, v. 8, p. 157–164, 1979.

MCKINSEY, D. S.; SPIEGEL, R. A.; HUTWAGNER, L.; STANFORD, J.; DRIKS, M. R.; BREWER, J.; GUPTA, M. R.; SMITH, D. L.; O'CONNOR, M. C.; DALL, L. prospective study of histoplasmosis in patients infected with human immunodeficiency virus: incidence, risk factors, and pathophysiology. **Clin. Infect. Dis.**, v. 24, p. 1195-1203, 1997.

MCKINSEY, D. S.; MCKINSEY, J. P.; BRUNE, P. R. Diagnosis and Management of Histoplasmosis. **Curr. Fungal Infect. Rep.**, v. 2, p. 94-102, 2008.

MCPHADEN, M. J.; ZEBIAK, S. E.; GLANTZ, M. H. ENSO as an integrating concept in Earth Science. **Science**, v. 314, n. 5806, p. 1740-1745, 2006.

MELHEM, M. S. C.; SZESZS, M. W. Testes de suscetibilidade a drogas antifúngicas. In: _____. **Compêndio de micologia médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 406-422, 2010.

MEYERS, T.; MOULTRIE, H.; NAIDOO, K.; COTTON, M.; ELEY, B.; SHERMAN, G. Challenges to pediatric HIV care and treatment in South Africa. **J. Infect. Dis.**, v. 1, n. 196, p. S474-481, 2007.

MOFENSON, L. M.; BRADY, M. T.; DANNER, S. P.; DOMINGUEZ, K. L.; HAZRA, R.; HANDELSMAN, E.; HAVENS, P.; NESHEIM, S.; READ, J. S.; SERCHUCK, L.; VAN DYKE, R. Guidelines for the Prevention and Treatment of Opportunistic Infections Among HIV-Exposed and HIV-Infected Children: Recommendations from CDC, the National Institutes of Health, the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America, the Pediatric Infectious Diseases Society, and the American Academy of Pediatrics. **MMWR**, v. 58, n. 4, 2009.

MORA, D. J.; SANTOS, C. T. B.; SILVA-VERGARA, M. L. Disseminated histoplasmosis in acquired immunodeficiency syndrome patients in Uberaba, MG, Brazil. **Mycoses**, v. 51, p. 136-140, 2007.

MORAES, M. A. P.; ALMEIDA, M. M. R. Isolamento de *Histoplasma capsulatum* do solo de Humboldt (Estado de Mato Grosso, Brasil). **Acta Amaz.**, v. 6, p. 43-47, 1976.

MUKHERJEE, A.; TANGRI, R.; VERMA, N.; GAUTAM, D. Chronic disseminated histoplasmosis bone marrow involvement in an immunocompetent patient. **Indian J. Hematol. Blood Transfus.**, v. 26, n. 2, p. 65-67, 2010.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Micoses sistêmicas causadas por patógenos fúngicos dimórficos endêmicos. In: _____. **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 745-758.

NAIFF, R. D.; BARRET, T. B.; NAIFF, M. F.; FERREIRA, L. C. L.; ARIAS, J. R. New records of *Histoplasma capsulatum* from wild animals in the Brazilian Amazon. **Rev. Inst. Méd. Trop. S. Paulo**, v. 38, n. 4, p. 273-277, 1996.

NAKAI, T.; UNO, J.; IKEDA, F.; TAWARA, S.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. In vitro antifungal activity of micafungin (FK463) against dimorphic fungi: comparison of yeast-like and mycelial forms. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, n. 4, p. 1376-1381, 2003.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. (Estados Unidos). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved standard M27-A**. Wayne, USA, 1997.

_____. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi:** approved standard M38-A. Wayne, USA, 2002.

_____. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts:** approved standard M27-A2. Wayne, USA, 2002.

_____. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts:** approved standard M27-A3. Wayne, USA, 2008.

_____. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi:** approved standard M38-A2. Wayne, USA, 2008.

NEGRONI, R. Micosis sistémicas tropicales asociadas al sida. Enfermedades emergentes. **Med. Mycol.**, v. 15, n. 1, p. 33-35, 2003.

NOSANCHUK, J. D.; GACSER, A. *Histoplasma capsulatum* at the host-pathogen interface, **Microbes Infect.**, v. 10, n. 9, p. 973-977, 2008.

OLIVEIRA, F. M.; UNIS, G.; SEVERO, L. C. Microepidemia de histoplasmose em Blumenau, Santa Catarina. **J. Bras. Pneumol.**, v. 32, n. 4, p. 375-378, 2006.

OLSON, T. C.; BONGARTZ, T.; CROWSON, C. S.; ROBERTS, G. D.; ORENSTEIN, R.; MATTESON, E. L. Histoplasmosis Infection in Patients with Rheumatoid Arthritis, 1998-2009. **BMC Infect. Dis.**, v. 11, n. 1, p. 145, 2011.

OSTROSKY-ZEICHNER, L.; MARR, K. A.; REX, J. H.; COHEN, S. H. Amphotericin B: time for a new 'gold standard'. **Clin. Infect. Dis.**, v. 37, p. 415-425, 2003.

PATEL, O.; SATCHELL, J.; BAELL, J.; FERNLEY, R.; COLOE, P.; MACREADIE, I. Inhibition studies of sulfonamide-containing folate analogs in yeast. **Microb. Drug Resist.**, v. 9, n. 2, p. 139-146, 2003.

PARSONS, R. J.; ZARAFONETIS, C. J. D. Histoplasmosis in Man; Report of Seven Cases and review of Seventy-One Cases. **Arch. Int. Med.**, v. 75, 1945.

PAULA, A. Microepidemia de histoplasmose. **Rev. Serv. Nac. Tuberc.**, v. 3, p. 11-20, 1959.

PERLIN, D. S. Resistance to echinocandins-class antifungal drugs. **Drug Res. Updates**, v. 10, p. 121-130, 2007.

PETRI JUNIOR, W. A. Sulfonamidas, sulfametoxazol-trimetoprima, quinolonas e agentes para infecções do trato urinário. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (Ed.). **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill Interamericana do Brasil, 2006. p. 999-1012.

PFALLER, M. A.; SHEEHAN, D. J.; REX, J. H. Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. **Clin. Microbiol. Ver.**, v. 17, p. 2, p. 268-280, 2004.

PIETROBONA, D.; NEGRO-MARQUÍNEZA, L.; KILSTEINA, J.; GALÍNDEZB, J.; GRECA, A.; BATTAGLIOTTIA, C. Histoplasmosis diseminada y sida en un hospital argentino: manifestaciones clínicas, diagnóstico y tratamiento. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v. 22, n. 3, p. 156-159, 2004.

POLAK, A.; DIXON, D. M. Fungistatic and fungicidal effects of amphotericin B, ketoconazole and fluconazole (UK 49,858) against *histoplasma capsulatum* in vitro and in vivo. **Mykosen**, v. 30, n. 4, p. 186-194, 1987.

PRADO, M.; SILVA, M. B.; LAURENTI, R.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 513-521, 2009.

RAPPLEYE, C. A. *Histoplasma capsulatum*. In: BORKOVICH, K. S.; EBBOLE, D. J. **Cellular and molecular biology of filamentous fungi**. Washington: ASM Press, 2010. p. 736-750.

REX, J. H.; PFALLER, M. A.; WALSH, T. J.; CHATURVEDI, V.; ESPINEL-INGROFF, A.; GHANNOUM, M. A.; GOSEY, L. L.; ODDS, F. C.; RINALDI, M. G.; SHEEHAN, D. J.; WARNOCK, D. W. Antifungal Susceptibility Testing: Practical Aspects and Current Challenges, **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 14, n. 4, p. 643-658, 2001.

REX, J. H.; PFALLER, M. A. Has antifungal susceptibility testing come of age? **Clin. Infect. Dis.**, v. 35, n. 8, p. 982-989, 2002.

REYES-MONTES, M. R.; BOBADILLA-DEL VALLE, M.; MARTINEZ-RIVERA, M. A.; RODRÍGUEZ-ARELLANES, G.; MARAVILLA, E.; SIFUENTES-OSORNIO, J.; TAYLOR, M. L. Relatedness analyses of *Histoplasma capsulatum* isolates from mexican patients with AIDS-associated histoplasmosis by using histoplasmin electrophoretic profiles and randomly amplified polymorphic DNA patterns. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 5, p. 1404-1408, 1999.

RICKABY, R. E. M.; HALLORAN, P. Coll La niña during the warmth of the Pliocene? **Science**, v. 307, n. 5717, p. 1948-1952, 2005.

ROCHA, M. M.; SEVERO, L. C. Histoplasmosis diseminada em pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA). Estudo de 25 casos. **Rev. Inst. Méd. Trop. S. Paulo**, v. 36, n. 2, p. 167-170, 1994.

ROGERS, J. C. Precipitation variability over the Caribbean and tropical Americas associated with the Southern Oscillation. **J. Climate**, v. 1, p. 172-182, 1988.

ROPELEWSKI, C. F.; HALPERT, M. S. Precipitation patterns associated with the high index of the Southern Oscillation. **J. Climate**, v. 2, p. 268-284, 1989.

ROSSINI, T. F.; GOULART, L. S. Histoplasmosis clássica: revisão. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, v. 38, n. 4, p. 275-279, 2006.

SABATELLI, F.; PATEL, R.; MANN, P. A.; MENDRICK, C. A.; NORRIS, C. C.; HARE, R.; LOEBENBERG, D.; BLACK, T. A.; MCNICHOLAS, P. M. *In vitro* activities of

posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, n. 6, p. 2009–2015, 2006.

SABLE, C. A.; STROHMAIER, K. M.; CHODAKEWITZ, J. A. Advances in antifungal therapy. **Annu. Rev. Med.**, v. 59, p. 361-379, 2008.

SACCENT, M. Fungal infections in the patient with human immunodeficiency virus infection. In: ANAISSIE, E. J.; MCGINNIS, M. R.; PFALLER, M. A. **Clinical mycology**. New York: Elsevier, 2009. p. 420-421.

SANTOS JUNIOR, I. D.; SOUZA, I. A. M.; BORGES, R. G.; SOUZA, L. B. S.; SANTANA, W. J.; COUTINHO, H. D. M. Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. **Sci. Med.**, v. 15, n. 3, p. 189-197, 2005.

SAROSI, G. A.; DAVIES, S. F. Endemic mycosis complicating human immunodeficiency virus infection. **West J. Med.**, v. 164, p. 335-340, 1996.

SCAPELLATO, P. G.; DESSE, J.; NEGRONI, R. Acute disseminated histoplasmosis and endocarditis. **Ver. Inst. Méd. Trop. S. Paulo**, v. 40, n. 1, 1998.

SCHMIDT, S.; MACHADO, O. P.; GALVÃO, A. B. Microepidemia de histoplasmose em zona rural de Brasília-DF. II Estudo epidemiológico e parasitológico da fonte de infecção. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 7, p. 107-115, 1973.

SCHNADIG, V. J.; WOODS, G. L. Histopathology of fungal infections. In: ANAISSIE, E. J.; MCGINNIS, M. R.; PFALLER, M. A. **Clinical mycology**. [S.l.]: Elsevier, 2009. p. 88-92.

CEARÁ. Secretaria da Saúde. **Informe Epidemiológico AIDS**, p. 1-11, 2010.

SEGER, R. A. Modern management of chronic granulomatous disease. **Br. J. Haematol.**, v. 140, n. 3, p. 255-266, 2008.

SEVERO, L. C.; PETRILLO, V. F.; CAMARGO, J. J.; GEYER, G. R.; PORTO, N. S. Acute pulmonary histoplasmosis and first isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil of Rio Grande do Sul, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 28, n. 1, p. 51-55, 1986.

SEVERO, L. C.; OLIVEIRA, F. M.; IRION, K.; PORTO, N. S.; LONDERO, A. T. Histoplasmosis in Rio Grande do Sul, Brazil: a 21-year experience. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 43, n. 4, p. 183-187, 2001.

SHIMAMOTO, A.; TAKAO, M.; SHOMURA, S.; TARUKAWA, T.; SHIMPO, H.; THORAC, G. Pulmonary histoplasmosis as an example of imported mycoses in Japan. **Cardiovasc. Surg.**, v. 55, p. 335–338, 2007.

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. Micoses profundas. In: _____. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1999. p. 152-170.

SILVA, M. E. Isolamento de *Histoplasma capsulatum* do solo, em zona endêmica de Calazar na Bahia, Brasil. **Bol. Fundacao Goncalo Mmiz**, v. 10, p. 1-15, 1956.

SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R.; BORGES-MALTA, M. E.; LEITE-MAFFEI, C. M.; RAMIREZ, L. E. *Histoplasma capsulatum* isolated from *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae) in the State of Minas Gerais, Brazil. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 18, n. 4, p. 180-182, 2001.

SUH, K. N.; ANEKTHANANON, T.; MARIUZ, P. R. Gastrointestinal Histoplasmosis in Patients with AIDS: Case Report and Review. **Clin. Infect. Dis.**, v. 32, p. 483–491, 2001.

SZYMCZAK, W. A.; DEEPE JR, G. S.; WINTERS, M. S. The Interface Between Virulence and Host Response to the Pathogenic Fungus *Histoplasma capsulatum*. **Curr. Fungal Infect. Rep.**, v.2, p. 159 – 164, 2008.

TABORDA, C. P.; SILVA, M. B.; NOSANCHUK, J. D.; TRAVASSOS, L. R. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4, p. 331–339, 2008.

TOBÓN, A. M.; AGUDELO, C. A.; ROSERO, D. S.; OCHOA, J. E.; DE BEDOUT, C.; ZULUAGA, A.; ARANGO, M.; CANO, L. E.; SAMPEDRO, J.; RESTREPO, A. Disseminated histoplasmosis: a comparative study between patients with acquired immunodeficiency syndrome and non-human immunodeficiency virus-infected individuals. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 73, p. 576-582, 2005.

THOMAZ, L.; APITZ-CASTRO, R.; MARQUES, A. F.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Experimental paracoccidioidomycosis: alternative therapy with ajoene, compound from *Allium sativum*, associated with sulfamethoxazole/trimethoprim. **Med. Mycol.**, v. 46, p. 113-118, 2008.

UNAIDS. **Report on the global AIDS epidemic 2010**. Geneva: Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, 2010.

UNIS, G.; OLIVEIRA, F. M.; SEVERO, L. C. Histoplasmose disseminada no Rio Grande do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 37, n. 6, p. 463-468, 2004.

UNTEREINER, W. A.; SCOTT, J. A.; NAVEAU, F. A.; SIGLER, L.; BACHEWICH, J.; ANGUS, A. The *Ajellomycetaceae*, a new family of vertebrate-associated *Onygenales*. **Mycologia**, v. 96, n. 4, p. 812–821, 2004.

VAN BURIK, J. A. H.; MAGEE, P. T. Aspects of fungal pathogenesis in humans. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 55, p. 743–772, 2001.

VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* Reduces Their Susceptibilities to Amphotericin B and Caspofungin. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 11, p. 33994-33400, 2002.

VASUDEVAN, B.; ASHISH, B.; AMITABH, S. A. P. M. Primary Cutaneous Histoplasmosis in a HIV-Positive Individual. **J. Glob. Infect. Dis.**, v. 2, n. 2, p. 112–115, 2010.

VEHRESCHILD, J. J.; BOHME, A.; REICHERT, D.; KIEHL, M. G.; ARENZ, D.; PANKRAZ, K.; KOCHANEK, M.; ULLMANN, A. J.; CORNELLY, O. A. Treatment of invasive fungal infections in clinical practice: a multi-centre survey on customary dosing, treatment indications, efficacy and safety of voriconazole. **Int. J. Hematol.**, v. 87, p. 126–131, 2008.

WALDRON, H. A. Occupational health and the archaeologist. **Br. J. Ind. Med.**, v. 42, p. 793-794, 1985.

WANKE, B. **Histoplasmose**: estudo epidemiológico, clínico e experimental. 1985. 167 f. Doutorado (Doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1985.

WANKE, B.; LAZÉRA, M. Histoplasmose clássica e africana. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 222-251.

WHEAT, J. Endemic mycoses in AIDS: a clinical review. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 8, n. 1, p. 146–159, 1995.

WHEAT, L. Histoplasmosis in the acquired immunodeficiency syndrome. **Curr. Trop. Med. Mycol.**, v. 7, p. 7–18, 1996.

WHEAT, J.; MARICHAL, P.; BOSSCHE, H. V.; LE-MONTE, A.; CONNOLLY, P. Hypothesis on the mechanism of resistance to fluconazole in *Histoplasma capsulatum*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, n. 2, p. 410-414, 1997.

WHEAT, L. J.; CHETCHOTISAKD, P.; WILLIAMS, B.; CONNOLLY, P.; SHUTT, K.; HAJJEH, R. Factors associated with severe manifestations of Histoplasmosis in AIDS. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, p. 877–881, 2000a.

WHEAT, J.; SAROSI, G.; MCKINSEY, D.; HAMILL, R.; BRADSHER, R.; JONHSON, P.; LOYD, J.; KAUFFMAN, C. Practice guidelines for management of patients with histoplasmosis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, p. 688-695, 2000b.

WHEAT, L. J.; CONNOLLY, P.; SMEDEMA, M.; BRIZENDINE, E.; HAFNER, R. AIDS Clinical Trials Group and the Mycoses Study Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Emergence of resistance to fluconazole as a cause of failure during treatment of histoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency disease syndrome. **Clin. Infect. Dis.**, v. 33, n. 11, p. 1910-1913, 2001.

WHEAT, L. J.; KAUFFMAN, C. A. Histoplasmosis. **Infect. Dis. Clin. North. Am.**, v. 17, p. 1–19, 2003.

WHEAT, L. J.; CONCES, D.; ALLEN, S. D.; BLUE-HNIDY, D.; LOYD, J. Pulmonary histoplasmosis syndromes: recognition, diagnosis, and management. **Semin. Respir. Crit. Care Med.**, v. 25, n. 2, p. 129-144, 2004.

WHEAT, L. J.; CONNOLLY, P.; SMEDEMA, M.; DURKIN, M.; BRIZENDINE, E.; MANN, P.; PATEL, R.; MCNICHOLAS, P. M.; GOLDMAN, M. Activity of newer triazoles

against *Histoplasma capsulatum* from patients with AIDS who failed fluconazole. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 57, p. 1235–1239, 2006.

WHEAT, L. J.; FREIFELD, A. G.; KLEIMAN, M. B.; BADDLEY, J. W.; MCKINSEY, D. S.; LOYD, J. E.; KAUFFMAN, C. A. Clinical Practice Guidelines for the Management of Patients with Histoplasmosis: 2007 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Dis.**, n. 45, p. 807–825, 2007a.

WHEAT, L. J. Nonculture Diagnostic Methods for Invasive Fungal Infections. **Curr. Infect. Dis. Rep.**, v. 9, p. 465–471, 2007b.

WOOLHOUSE, M. E. J.; GOWTAGE-SEQUERIA, S. Host Range and Emerging and Reemerging Pathogens. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 11, n. 12, p. 1842-1847, 2005.

WÜTHRICH, M.; GERN, B.; HUNG, C. Y.; ERSLAND, K.; ROCCO, N.; PICK-JACOBS, J.; GALLES, K.; FILUTOWICZ, H.; WARNER, T.; EVANS, M.; COLE, G.; KLEIN, B. Vaccine-induced protection against 3 systemic mycoses endemic to North America requires Th17 cells in mice. **J. Clin. Invest.**, v. 121, n. 2, p. 554-568, 2011.

YEKUTIEL, A.; SHALIT, I.; SHADKCHAN, Y.; OSHEROV, N. In Vitro Activity of Caspofungin Combined with Sulfamethoxazole against Clinical Isolates of *Aspergillus* spp. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, p. 3279-3283, 2004.

YEO, S. F.; WONG, B. Current Status of Nonculture Methods for Diagnosis of Invasive Fungal Infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, n. 3, p. 465–484, 2002.

ZACHARIAH, R.; HARRIES, A. D.; LUO, C.; BACHMAN, G.; GRAHAM, S. M. Scaling-up co-trimoxazole prophylaxis in HIV-exposed and HIV-infected children in high HIV-prevalence countries. **Lancet Infect. Dis.**, v. 8, n. 5, p. 278, 2008.

ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; WANKE, B. Isolamento do *Histoplasma capsulatum* de animais silvestres no município do Rio de Janeiro. **Cad. Saude Publica**, v. 2, n. 1, p. 42-52, 1986.

ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; WANKE, B. Distribuição das pontes de infecção do *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* em Rio da Prata, Município do Rio de Janeiro. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 29, n. 4, p. 243-250, 1987.

ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; MUNIZ, M. M.; WANKE, B. Histoplasmose. In: COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 1208-1221.

ZEIDBERG, L. D.; AJELLO, L. Environmental factors influencing the occurrence of *Histoplasma capsulatum* and *Microsporium gypseum* in soil. **J. Bacteriol.**, v. 68, n. 2, p. 156-159, 1954.

ZEIDBERG, L. D.; AJELLO, L.; WVEBSTER, R. H. Physical and Chemical Factors in Relation to *Histoplasma capsulatum* in Soil. **Science**, v. 122, p. 33-34, 1955.

ZELL, R. Global climate change and the emergence/re-emergence of infectious diseases. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 293, p. 16-26, 2004.

ZOLOPA, A. R.; ANDERSEN, J.; POWDERLY, W.; SANCHEZ, A.; SANNE, I.; SUCKOW, C.; HOGG, E.; KOMAROW, L. Early Antiretroviral Therapy Reduces AIDS Progression/Death in Individuals with Acute Opportunistic Infections: A Multicenter Randomized Strategy Trial. **PLoS One**, v. 4, p. 5575, 2009.

APÊNDICE A

Quadro 3 - Cepas de *H. capsulatum* utilizadas na pesquisa

CEPA	IDENTIFICAÇÃO NA MICOTECA	ORIGEM	DATA DA COLETA	MATERIAL
1	CEMM 03-2-088	Ceará	2007	Creme leucocitário
2	CEMM 03-2-090	Ceará	2007	Creme leucocitário
3	CEMM 03-3-002	Ceará	2007	Aspirado medular
4	CEMM 03-3-003	Ceará	2007	Creme leucocitário
5	CEMM 03-3-004	Ceará	2007	Creme leucocitário
6	CEMM 03-3-013	Ceará	2007	Creme leucocitário
7	CEMM 03-3-023	Ceará	2007	Creme leucocitário
8	CEMM 03-3-024	Ceará	2007	Creme leucocitário
9	CEMM 03-3-026	Ceará	2007	Creme leucocitário
10	CEMM 03-3-030	Ceará	2007	Creme leucocitário
11	CEMM 03-3-031	Ceará	2007	Creme leucocitário
12	CEMM 03-3-032	Ceará	2007	Creme leucocitário
13	CEMM 03-3-033	Ceará	2007	Creme leucocitário
14	CEMM 03-3-034	Ceará	2008	Aspirado medular
15	CEMM 03-3-035	Ceará	2007	Aspirado medular
16	CEMM 03-3-036	Ceará	2007	Creme leucocitário
17	CEMM 03-3-037	Ceará	2008	Creme leucocitário
18	CEMM 03-3-038	Ceará	2008	Creme leucocitário
19	CEMM 03-3-039	Ceará	2007	Creme leucocitário
20	CEMM 03-3-040	Ceará	2007	Creme leucocitário
21	CEMM 03-3-050	Ceará	2008	Creme leucocitário
22	CEMM 03-3-051	Ceará	2008	Creme leucocitário
23	CEMM 03-3-053	Ceará	2008	Creme leucocitário
24	CEMM 03-3-054	Ceará	2008	Creme leucocitário
25	CEMM 03-3-055	Ceará	2008	Creme leucocitário
26	CEMM 03-4-058	Ceará	2009	Creme leucocitário
27	CEMM 03-4-059	Ceará	2009	Creme leucocitário
28	CEMM 03-4-060	Ceará	2009	Creme leucocitário
29	CEMM 03-4-061	Ceará	2009	Creme leucocitário
30	CEMM 03-4-062	Ceará	2009	Creme leucocitário
31	CEMM 03-5-047	Ceará	2008	Creme leucocitário
32	CEMM 03-5-045	Ceará	2008	Aspirado medular
33	CEMM 03-5-061	Ceará	2008	Creme leucocitário
34	CEMM 03-5-064	Ceará	2008	Creme leucocitário
35	CEMM 03-5-056	Ceará	2008	Creme leucocitário
36	CEMM 03-5-046	Ceará	2008	Creme leucocitário
37	CEMM 03-5-062	Ceará	2008	Creme leucocitário
39	CEMM 03-5-084	Ceará	2008	Creme leucocitário

CEPA	IDENTIFICAÇÃO NA MICOTECA	ORIGEM	DATA DA COLETA	MATERIAL
41	CEMM 03-5-073	Ceará	2008	Creme leucocitário
44	CEMM 03-5-078	Ceará	2008	Creme leucocitário
45	CEMM 03-5-080	Ceará	2008	Creme leucocitário
46	CEMM 03-5-081	Ceará	2008	Creme leucocitário
47	CEMM 03-5-052	Ceará	2008	Creme leucocitário
48	CEMM 03-5-048	Ceará	2008	Creme leucocitário
50	CEMM 03-5-049	Ceará	2008	Creme leucocitário
51	CEMM 03-5-050	Ceará	2008	Creme leucocitário
52	CEMM 03-5-051	Ceará	2008	Creme leucocitário
54	CEMM 03-5-054	Ceará	2008	Creme leucocitário
55	CEMM 03-5-055	Ceará	2008	Creme leucocitário
56	CEMM 03-5-058	Ceará	2008	Creme leucocitário
57	CEMM 03-5-059	Ceará	2008	Creme leucocitário
58	CEMM 03-5-057	Ceará	2008	Creme leucocitário
59	CEMM 03-5-077	Ceará	2008	Aspirado medular
64	CEMM 03-5-090	Ceará	2008	Aspirado medular
65	CEMM 03-5-091	Ceará	2008	Creme leucocitário
66	CEMM 03-5-092	Ceará	2008	Creme leucocitário
67	CEMM 03-5-093	Ceará	2008	Creme leucocitário
68	CEMM 03-5-094	Ceará	2008	Creme leucocitário
69	CEMM 03-5-095	Ceará	2009	Aspirado medular
70	CEMM 03-5-096	Ceará	2008	Aspirado medular
71	CEMM 03-5-097	Ceará	2009	Aspirado medular
72	CEMM 03-5-098	Ceará	2008	Creme leucocitário
73	CEMM 03-5-099	Ceará	2008	Creme leucocitário
74	CEMM 03-5-100	Ceará	2008	Creme leucocitário
75	CEMM 03-5-101	Ceará	2008	Creme leucocitário
77	CEMM 03-5-102	Ceará	2008	Creme leucocitário
78	CEMM 03-5-103	Ceará	2008	Creme leucocitário
H1	CEMM 05-1-075	Ceará	2009	Creme leucocitário
H2	CEMM 05-1-069	Ceará	2009	Aspirado medular
H3	CEMM 05-2-034	Ceará	2009	Creme leucocitário
H5	CEMM 05-2-038	Ceará	2009	Creme leucocitário
H18	CEMM 05-1-079	Ceará	2009	Creme leucocitário
H31	CEMM 05-2-001	Ceará	2009	Creme leucocitário
HA1	CEMM 03-3-055	Ceará	2009	Creme leucocitário
HA2	CEMM 03-6-059	Ceará	2009	Creme leucocitário
A	CEMM 03-3-087	Rio de Janeiro	2007	Aspirado medular
B	CEMM 03-4-049	Rio de Janeiro	2007	Aspirado medular
C	CEMM 03-5-071	Rio de Janeiro	2007	Aspirado medular
D	CEMM 03-6-019	Rio de Janeiro	2007	Aspirado medular
E	CEMM 03-4-050	Rio de Janeiro	2008	Desconhecido

H CEPA	CEMM 03-5-068 IDENTIFICAÇÃO NA MICOTECA	Rio de Janeiro ORIGEM	2008 DATA DA COLETA	Desconhecido MATERIAL
I	CEMM 03-5-069	Espírito Santo	2007	Aspirado medular
K	CEMM 03-4-018	Espírito Santo	2007	Aspirado medular
L	CEMM 03-4-051	Espírito Santo	2007	Aspirado medular
O	CEMM 03-4-052	Espírito Santo	2007	Aspirado medular
Q	CEMM 03-6-020	Espírito Santo	2008	Aspirado medular
R	CEMM 03-6-009	Espírito Santo	2008	Aspirado medular
U	CEMM 03-5-034	Espírito Santo	2008	Aspirado medular
V	CEMM 03-5-033	Espírito Santo	2008	Desconhecido
X	CEMM 03-6-024	São Paulo	2007	Biopsia (palato)
Y	CEMM 03-4-036	São Paulo	2007	Biopsia (duodeno)
1B (HS1)	CEMM 03-5-053	São Paulo	2007	Biopsia
Y (HS5)	CEMM 03-4-036	São Paulo	2008	Biopsia (duodeno)

Quadro 4 – Número de casos de histoplasmose disseminada e AIDS por município no Estado do Ceará

PROCEDÊNCIA	TOTAL	PROCEDÊNCIA	TOTAL
Aquiraz	4	Paraipaba	3
Aracati	2	Quixadá	1
Boa viagem	2	Russas	3
Caucaia	16	S.g. amarante	2
Chorozinho	1	Tabuleiro	1
Fortaleza	162	Taua	1
Horizonte	4	Tejuçuoca	1
Icapuí	1	Tianguá	2
Icó	2	Trairi	3
Iguatu	3	Pentecoste	1
Itaitinga	4	Cascavel	1
Itapagé	2	Mons tabosa	1
Itapipoca	1	Paracuru	2
Jaguaribe	1	Limoeiro	1
Maracanau	9	Paramoti	0
Missão velha	1	Beberibe	1
Mombaça	1	Pindoretama	1
Morada nova	3	Paramoti	1
Mulungu	1	Viçosa	1
Orós	2	Pacoti	1
Pacajus	2	Uruburetama	1
Pacatuba	1	TOTAL GERAL	254

Tabela 11 - Número de casos de histoplasmoze disseminada e AIDS ao longo dos meses e anos

MÊS/ANO	2006		2007		2008		2009		2010		TOTAL	
	neg	pos	neg	pos								
JANEIRO	0	6	1	9	1	4	1	2	2	1	5	
FEVEREIRO	0	4	1	4	1	5	1	3	0	5	3	22
MARÇO	1	3	1	0	4	2	1	8	1	5	8	21
ABRIL	1	1	1	6	0	4	1	2	1	4	4	18
MAIO	0	2	0	6	0	1	0	4	0	2	0	17
JUNHO	0	1	1	7	0	3	1	2	1	1	3	15
JULHO	0	3	0	2	0	4	1	1	0	5	1	14
AGOSTO	2	1	1	5	2	2	1	7	0	4	6	15
SETEMBRO	2	3	1	2	3	6	1	4	1	1	8	19
OUTUBRO	0	2	0	7	1	5	0	9	0	2	1	16
NOVEMBRO	0	3	1	4	1	3	1	4	0	1	3	25
DEZEMBRO	1	3	2	4	0	2	1	1	0	1	4	15
TOTAL	7	32	10	56	13	41	10	47	6	32	46	11
												208

Legenda: Neg= grupo dos negativos; Pos=grupo dos positivos

Tabela 12 - Estatísticas básicas da CFM, conforme a região

ESTATÍSTICA	REGIÃO	AMB	CAS	FLU	ITR	VRZ
N ^o CASOS	NE	68	68	68	68	68
	SE	16	16	16	16	16
MÍNIMO	NE	0,008	0,06	7,1	0,00195	0,02
	SE	0,063	0,50	3,9	0,00195	0,03
MÁXIMO	NE	1	64	500	0,0625	1
	SE	0,5	32	500	0,0625	1
MÉDIA GEOMÉTRICA	NE	0,17	10,32	98,74	0,02	0,26
	SE	0,16	5,19	74,32	0,01	0,12

Tabela 13 - Distribuição de frequência das CFM's, conforme a região, para anfotericina B

CFM	NE	SE
0,008	1	--
0,016	1	--
0,031	1	--
0,063	6	3
0,125	25	5
0,25	24	7
0,5	9	1
1	1	--
TOTAL	68	16

Tabela 14 - Distribuição de frequência das CFM's, conforme a região, para caspofungina

CFM	NE	SE
0,06	1	--
0,25	1	--
0,5	5	5
1	6	--
2	2	--
4	2	--
8	7	4
16	14	4
32	23	3
TOTAL	68	16

Tabela 15 - Distribuição de frequência das CFM's, conforme a região, para fluconazol

CFM	NE	SE
3,9	--	1
7,1	1	--
15,6	--	1
31,3	12	--
62,5	16	8
125	23	3
250	11	2
500	5	1
TOTAL	68	16

Tabela 16 - Distribuição de frequência das CFM's, conforme a região, para itraconazol

CFM	NE	SE
0,0020	3	2
0,0039	2	2
0,0078	15	6
0,0156	12	4
0,0312	14	1
0,0625	22	1
TOTAL	68	16

Tabela 17 - Distribuição de frequência das CFM's, conforme a região, para voriconazol

CFM	NE	SE
0,02	1	0
0,03	2	2
0,06	7	2
0,13	10	8
0,25	19	3
0,5	19	0
1	10	1
TOTAL	68	16

Tabela 18 - Comparação das CFM's entre as regiões, para cada droga utilizada

DROGA	T-STUDENT	GL	P-VALUE
AMB	0,687	82	0,4940
CAS	2,632	36,69	0,0124
FLU	0,619	82	0,5378
ITR	3,806	34,57	0,0006
VRZ	2,929	28,92	0,0066

Análise: a CFM das drogas CAS ($p=0,0124$), ITR ($p=0,0006$) e VRZ ($0,0066$) é maior no NE do que no SE, não havendo diferença significativa nessa comparação entre as demais drogas.

Tabela 19 - Comparação da CIM entre as regiões, para cada droga utilizada, na forma filamentosa.

DROGA	T-STUDENT	GL	P-VALUE
AMB	1,409	82	0,1626
CAS	1,614	82	0,1105
FLU	0,428	82	0,6695
ITR	2,864	33,5	0,0072
VRZ	1,998	82	0,0490

Tabela 20 - Comparação da CIM entre as regiões, para cada droga utilizada, na forma leveduriforme.

DROGA	T-STUDENT	GL	P-VALUE
AMB	1,509	8	0,1698
CAS	2,200	8	0,0590
ITR	0,508	8	0,6254
VRZ	2,758	7,5	0,0263

Tabela 21 - Comparação das CIM's entre as formas, para cada droga utilizada, na região NE.

DROGA	T-STUDENT	GL	P-VALUE
AMB	1,204	74	0,2324
CAS	6,490	73,4	0,0000
FLU	11,355	67	0,0000
ITR	1,730	74	0,0878
VRZ	8,144	74	0,0000

Tabela 22 - Comparação da CIM entre as formas, para cada droga utilizada, na região SE.

DROGA	T-STUDENT	GL	P-VALUE
AMB	1,344	16	0,1978
CAS	1,068	16	0,3012
FLU	1,167	16	0,2602
ITR	3,177	16	0,0059
VRZ	0,872	16	0,3959

APÊNDICE B

MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

1. MEIOS DE CULTURA

1.1 Ágar-batata

Infusão de batatas* 500 mL

Dextose 10 g

Ágar bacteriológico 15 g

Água deionizada q.s.p. 1000 mL

* 250 g de batatas (*Solanum tuberosum*) cozidas em 500 mL de água por 1 hora, seguido-se filtração em gaze e reconstituição do volume para 500 mL.

1.2 Ágar-BHI (*Brain Heart Infusion*)

Cérebro-coração, infusão de sólidos 8,0 g

Hidrolisado péptico de tecido animal 5,0 g

Hidrolisado pancreático de caseína 16,0 g

Cloreto de sódio 5,0 g

Glucose 2,0 g

Fosfato dissódico de hidrogênio 2,5 g

Ágar 13,5 g

Água destilada q.s.p 1000 mL

Os meios de cultura foram preparados conforme indicação do fabricante, fervidos para dissolução do ágar e autoclavados a 121°C por 15 minutos. Em seguida foram esfriados a 50°C e distribuídos em alíquotas de 4 mL em tubos de ensaio estéreis sob condições assépticas.

1.3 Ágar-Lactrimel

Mel de abelhas 7 g

Farinha de trigo 20 g

Solução de leite 200 mL

Ágar bacteriológico 20 g

Água destilada 800 mL

Pesar 20 g de leite em pó integral e dissolver em 200 mL de água destilada. Autoclavar por 15 minutos a 121°C. Dissolver a farinha de trigo e o ágar em água destilada sob aquecimento em banho-maria. Adicionar o mel, homogeneizar. Ajustar o pH para 6,2. Autoclavar por 15 minutos a 121°C. Deixar o meio esfriar, até 48°C e acrescentar o leite esterilizado. Distribuir em alíquotas de 4 mL em tubos de ensaio estéreis sob condições assépticas.

1.4 RPMI 1640

RPMI 1640 com glutamina e sem bicarbonato de sódio 10,5 g

Água destilada q.s.p 1000 ml

Adicionar lentamente o pó sob agitação em água destilada e ajustar o pH final para 7,0, utilizando-se solução de MOPS com a concentração final de 0,165 mol/L. Completar o volume com água destilada e filtrar em membranas de 0,22 µm de poro, utilizando pressão positiva.

1.5 Ágar BHI suplementado com sangue de carneiro a 10%

Ágar BHI 5,2g

Água destilada 100 ml

Sangue de carneiro 10 ml

Modo de preparo:

Dissolver o ágar BHI em água destilada. Autoclavar por 15 minutos a 121°C. Esperar esfriar até 45°C e adicionar o sangue. Homogeneizar. Distribuir em tubos inclinados estéreis.

2. SOLUÇÕES

2.1 Lactofenol azul-algodão

Ácido láctico 20 g

Fenol 20 g

Glicerina 20 g

Azul-algodão 0,05 g

Água deionizada 20 mL

2.2 Solução salina

NaCl 0,85 g

Água deionizada 100 mL

2.3 MOPS (ácido 2-[N-morfolino] propanosulfônico)

MOPS em pó 6,9 g

Dissolver o MOPS em 200 mL de água destilada autoclavada e armazenar na geladeira em garrafa envolvida com papel alumínio.

APÊNDICE C

PUBLICAÇÕES