



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

GLAUCIA MORGANA DE MELO GUEDES

HISTOPLASMOSE DISSEMINADA EM PACIENTES COM AIDS NO ESTADO DO CEARÁ: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, DIAGNÓSTICO E ANÁLISE *IN VITRO* DA SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA E DO BIOFILME DE *Histoplasma capsulatum*.

FORTALEZA

2018

GLAUCIA MORGANA DE MELO GUEDES

**HISTOPLASMOSE DISSEMINADA EM PACIENTES COM AIDS NO ESTADO DO
CEARÁ: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, DIAGNÓSTICO E ANÁLISE *IN VITRO*
DA SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA E DO BIOFILME DE *Histoplasma capsulatum*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia humana e animal
Orientadora: Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.
Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G957h Guedes, Gláucia Morgana de Melo.
HISTOPLASMOSE DISSEMINADA EM PACIENTES COM AIDS NO ESTADO DO CEARÁ:
ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, DIAGNÓSTICO E ANÁLISE IN VITRO DA SENSIBILIDADE
ANTIFÚNGICA E DO BIOFILME DE *Histoplasma capsulatum*. / Gláucia Morgana de Melo Guedes. –
2018.
114 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2018.

Orientação: Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.

Coorientação: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha.

1. Histoplasmose. 2. H. capsulatum. 3. Diagnóstico. 4. Cutoff. 5. Biofilme. I. Título.

CDD 616.9

GLAUCIA MORGANA DE MELO GUEDES

**HISTOPLASMOSE DISSEMINADA EM PACIENTES COM AIDS NO ESTADO DO
CEARÁ: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, DIAGNÓSTICO E ANÁLISE *IN VITRO*
DA SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA E DO BIOFILME DE *Histoplasma capsulatum*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Microbiologia Médica.

Área de concentração: Microbiologia humana e animal.

Aprovada em: 31/08/2018.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha (Co-orientador)
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho
Universidade Regional do Cariri (URCA)

Profa. Dra. Tatiana de Castro Abreu Pinto
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

A Deus.

Aos meus pais, Neide e Guedes.

Aos meus irmãos.

Ao meu sobrinho, João Gabriel.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) pelo espaço e infraestrutura disponibilizados.

À Central Analítica da UFC pelo apoio na análise das imagens de microscopia eletrônica.

Aos que fazem parte do Hospital São José de Doenças Infecciosas pela contribuição relevante na obtenção dos dados.

Ao Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) pelos recursos destinados para concretização deste trabalho

À Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante que dedicadamente me auxiliou a trilhar esse caminho no doutorado. Agradeço pela confiança, incentivo, ensinamentos e mentoria. Obrigada pelo seu empenho em administrar diariamente o CEMM e assim, fornecer as melhores condições de trabalho aos alunos.

Ao Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha pela dedicação, sabedoria e ajuda inestimável na elaboração dos artigos científicos.

Ao Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim pelo empenho no crescimento do CEMM, proporcionando um ambiente de extrema qualidade, como o NB3, fundamental para a concretização deste trabalho. Admiro sua perspicácia mesmo com poucas falas.

À Profa. Dra. Débora Castelo Branco por compartilhar seu enorme conhecimento de maneira simples. Por ser prestativa e nos fazer acreditar que “vai dar certo”. Agradeço pelo tempo que sempre disponibiliza, mesmo quando tem muito trabalho.

À Profa. Rossana de Aguiar Cordeiro por sempre instigar a busca por novos conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho por ter aceitado o convite em participar da banca de defesa do doutorado. Agradeço por ter me apresentado a pesquisa com microbiologia. Levo sempre comigo os valorosos ensinamentos que aprendi enquanto estive sob sua orientação fazendo parte da equipe do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM).

Aos professores Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento e Dra. Tatiana de Castro Abreu Pinto por terem aceitado participar da banca de defesa de doutorado, pelo tempo e pelas colaborações.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica (PPGMM) que contribuíram para minha formação acadêmica e científica.

À secretária Carolinda Vilma Soares de Oliveira pela disponibilidade e atenção.

À Silviane Praciano pelo carinho, palavras de apoio e ensinamentos.

À Terezinha Rodrigues por sua receptividade diária e por contribuir para minha formação pessoal e profissional.

À Isis Meneses, Janaina Freire e Lucilene Silva pela prazerosa parceria nas etapas de execução deste trabalho.

À Giovanna Riello pela amizade, palavras de incentivo e por dividir aflições científicas.

Aos colegas do CEMM pelo convívio aprazível e contribuições na construção deste trabalho, com destaque para Jamile Alencar e Jonathas Sales pelos 06 anos de parceria.

Aos demais alunos do PPGMM pelo apoio nas disciplinas cursadas.

Aos meus pais, José Guedes e Neide Guedes, pelo amor incondicional e uma vida inteira de dedicação e carinho. Por entenderem as minhas faltas, sempre me motivarem na busca dos meus ideais e valorizarem as minhas conquistas.

Aos meus irmãos, Glória Izabel e Guilherme Eugênio, pelos momentos de cumplicidade e incentivo.

Ao meu sobrinho, João Gabriel, que encanta os meus dias com seu humor.

À minha família pelo carinho e torcida.

A Deus pelas bênçãos concedidas em minha vida, por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos.

“Em seu coração o homem planeja o seu caminho, mas o Senhor determina os seus passos.” (Provérbios 16:9)

RESUMO

Histoplasma capsulatum é o agente etiológico da histoplasmose, uma micose endêmica nas Américas, comum em indivíduos com HIV/aids. Nos últimos anos, além dos estudos voltados para análise dos padrões clínico-laboratoriais da histoplasmose, pesquisas tem buscado caracterizar esse fungo. Neste contexto, objetivou-se avaliar os aspectos epidemiológicos da histoplasmose disseminada em pacientes soropositivos para HIV atendidos em hospital de referência do estado do Ceará, no período de 2011-2015; e ainda analisar o gene *RYP1*, um regulador transcricional da transição dimórfica, como alvo para o diagnóstico molecular da histoplasmose. Ademais, estabeleceram-se valores de ponto de corte epidemiológico (ECVs / *cutoff*) para os antifúngicos clássicos, com base na sensibilidade antifúngica dos isolados, bem como analisou-se o biofilme de *H. capsulatum* na forma filamentosa. Foram coletados dados sócio-demográficos e clínico-laboratoriais para caracterização da população e identificação dos fatores mais relacionados a um desfecho desfavorável (recidiva ou óbito), mediante análise por *ODDS ratio*. Os resultados mostraram uma média de 42,2 casos por ano. A população era constituída na sua maioria por homens adultos jovens que apresentavam como principais sinais clínicos febre (91,9%), tosse (76,3%), perda de peso (74,9%), dispneia (65,2%). A taxa de recidiva e letalidade foi de 14,7% e 39,3%, respectivamente. Dentre os fatores mais relacionados a recidiva e letalidade, destacam-se a ocorrência da histoplasmose como doença definidora de aids, a presença de comorbidades pulmonares e a elevação dos níveis de ureia e creatinina. Quanto ao gene *RYP1*, a detecção pela técnica de PCR ocorreu em 18/18 culturas de *H. capsulatum* e em 13/13 espécimes clínicos de pacientes HIV positivos com histoplasmose disseminada. A sensibilidade aos antifúngicos foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo com a forma filamentosa (n=70) e leveduriforme (n=07) e as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) variaram de 0,0078 a 1 µg/mL para anfotericina B e voriconazol; 0,0005 a 0,0625 µg/mL para itraconazol; 1 a ≥256 µg/mL para fluconazol e ≤0,0156 a 16 µg/mL para caspofungina. Posteriormente, estabeleceram-se os ECVs contra a forma filamentosa, para classificação das cepas em selvagem ou não-selvagem. Obtivemos ECVs de 0,5; 0,5; 0,0313; 128 e 16 µg/mL para anfotericina B, voriconazol, itraconazol, fluconazol e caspofungina, respectivamente; sendo mais de 96% dos isolados do tipo selvagem para todas as drogas. Avaliou-se ainda, a cinética de formação de biofilme de *H. capsulatum* na forma filamentosa nos meios RPMI, YNB e ureia, utilizando-se cristal violeta (0,3%), XTT e análises microscópicas. Observou-se que o melhor meio foi o RPMI após 8 dias de incubação. Dos 46 isolados avaliados, 43 foram fortes e 3 moderados formadores de biofilme. Em suma, a prevalência e letalidade da histoplasmose no Ceará destacam a necessidade da adoção de medidas para facilitar o diagnóstico precoce, o tratamento adequado e a melhora do prognóstico. Nesse contexto o gene *RYP1* é uma região alvo promissora para o rápido diagnóstico da histoplasmose. Adicionalmente, mais de 96% dos isolados nessa casuística são do tipo selvagem e esses valores de ECV são uma ferramenta valiosa para o monitoramento da sensibilidade antifúngica. E por fim, *H. capsulatum* na forma filamentosa forma biofilme *in vitro*, podendo ser uma importante forma de adaptação ao ambiente por longos períodos.

Palavras chaves: Histoplasmose. Aids. Diagnóstico. *H. capsulatum*. *Cutoff*. Biofilme.

ABSTRACT

Histoplasma capsulatum is the etiologic agent of histoplasmosis, an endemic mycosis in the Americas, common in individuals with HIV / AIDS. In the past years, in addition to studies aiming at analyzing the clinical and laboratory patterns of histoplasmosis, some researches have sought to characterize this fungus. The objective of this study was to evaluate the epidemiological aspects of disseminated histoplasmosis in HIV/AIDS patients, from the state of Ceará (2011-2015) and to analyze the *RPY1* gene, a conserved transcriptional regulator, as a target for the molecular diagnosis of histoplasmosis. In addition, epidemiological cutoff values (ECVs) were established for classic antifungals, based on the antifungal susceptibility of the isolates, and the biofilm-forming ability of *H. capsulatum* in the mycelial form was analyzed. Socio-demographic and clinical-laboratory data were collected to characterize the population and identify the factors that are mostly related to unfavorable outcomes (relapse or death), by ODDS ratio analysis. The results showed an average of 42.2 cases/year. The population consisted mainly of young men with clinical signs of fever (91.9%), cough (76.3%), weight loss (74.9%), dyspnea (65.2%). The rate of relapse and lethality was 14.7% and 39.3%, respectively. Among the factors that are mostly related to relapse and lethality, the occurrence of histoplasmosis as AIDS-defining disease, the presence of pulmonary comorbidities and elevated levels of urea and creatinine are highlighted. As for *RPY1* gene, detection by PCR was observed in 18/18 cultures of *H. capsulatum* and in 13/13 clinical specimens from HIV-positive patients with disseminated histoplasmosis. Susceptibility to antifungals was evaluated by the broth microdilution method with mycelial (n =70) and yeast (n=07) forms and the minimum inhibitory concentration (MIC) ranges were 0.0078-1 µg/mL for amphotericin B and voriconazole; 0.0005-0.0625 µg/mL for itraconazole; 1-≥256µg /mL for fluconazole and ≤0.0156-16 µg/mL for caspofungin. ECVs were established against the mycelial form for the classification of the isolates as wild type or non-wild type. We obtained ECVs of 0.5; 0.5; 0.0313; 128 and 16 µg/mL for amphotericin B, voriconazole; itraconazole; and caspofungin, respectively, with more than 96% of the isolates classified as wild-type for all drugs. The kinetics of *H. capsulatum* biofilm formation in the filamentous form in RPMI, YNB and urea broth was evaluated using crystal violet (0.3%) assay, XTT assay and microscopic analysis. RPMI was the best medium, in which all isolates formed biofilms, after 8 days of incubation. Of the 46 evaluated isolates, 43 were strong and 3 were moderate biofilm producers. In summary, the prevalence and lethality of histoplasmosis in Ceará emphasize the need to adopt measures to facilitate early diagnosis, adequate treatment and improve prognosis. In this context, the *RPY1* gene is a promising target region for the rapid diagnosis of histoplasmosis. In addition, more than 96% of the isolates are wild-type and these ECV values are a valuable tool for monitoring antifungal susceptibility. Finally, *H. capsulatum* in filamentous form forms biofilm *in vitro*, which may be an important way of adaptation to the environment for long periods.

Key words: Histoplasmosis. Aids. Diagnosis. *H. capsulatum*. Cutoff. Biofilm.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Distribuição geográfica dos clados e linhagens de <i>H. capsulatum</i>	25
Figura 2	- Ciclo biológico de <i>H. capsulatum</i>	30
Figura 3	- Manifestações cutâneas da histoplasmose disseminada em pacientes diagnosticados com aids	33
Figura 4	- Radiografia de paciente diagnosticado com aids/histoplasmose	34
Figura 5	- Aspectos macroscópicos e microscópicos de <i>H. capsulatum</i>	37
Figura 6	- Fluxograma de desenvolvimento da tese	51
Figura 7	- Número de casos e óbitos de pacientes com aids e histoplasmose no estado do Ceará de 2011 a 2015	62
Figura 8	- Aspectos clínicos dos pacientes com histoplasmose e aids	64
Figura 9	- Aspectos laboratoriais dos pacientes com histoplasmose e aids	65
Figura 10	- Detecção do gene <i>RYP1</i> em <i>H. capsulatum</i> de cultura e espécimes clínicos	68
Figura 11	- Distribuição da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e valores de pontos de corte epidemiológico (ECV) para anfotericina B, itraconazol, fluconazol, voriconazol e caspofungina frente a isolados de <i>H. capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>	71
Figura 12	- Cinética de formação do biofilme de <i>H. capsulatum</i> na forma filamentosa durante 10 dias	73
Figura 13	- Biofilme de <i>H. capsulatum</i> na forma filamentosa	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Características clínico-laboratoriais mais relacionadas com recidiva e óbito da histoplasmose em pacientes com aids no estado do Ceará de 2011 a 2015.....	67
Tabela 2	- Detecção de gene <i>RYP1</i> em amostras de sangue de pacientes saudáveis ou com micoses sistêmicas	69
Tabela 3	- Distribuição de frequência da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 5 agentes antifúngicos contra <i>H. capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i> na forma de levedura e filamentosa	70
Tabela 4	- Valores de pontos de corte epidemiológico (ECV) para anfotericina B, itraconazol, fluconazol, voriconazol e caspofungina frente a isolados de <i>H. capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>	72
Tabela 5	- Caracterização da formação de biofilme de <i>H. capsulatum</i>	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	- Mecanismos de sobrevivência intracelular de <i>H. capsulatum</i>	29
Quadro 2	- Apresentações clínicas da histoplasmose	32
Quadro 3	- Métodos moleculares para a detecção de <i>H. capsulatum</i> diretamente de espécimes clínicos	39
Quadro 4	- Esquema terapêutico da histoplasmose	40
Quadro 5	- Requisitos para estabelecimento de pontos de corte	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CTAB	<i>Cetyl Trimethylammonium Bromide</i>
CV	Cristal violeta
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DO	Densidade óptica
ECOFF	<i>Epidemiological cutoff</i>
ECV	<i>Epidemiological cutoff values</i>
EUCAST	European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HSJ	Hospital São José de Doenças Infecciosas
LDH	Lactato desidrogenase
MG	Média geométrica
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
MOPS	Ácido 3-(N-morfolina) propanossulfônico
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>

RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RYP	<i>Regulator for yeast-phase</i>
SAME	Serviço de Arquivos Médicos e Estatísticas
TARV	Terapia Antirretroviral
ITS1/ITS4	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
ufc	Unidade formadora de colônia
XTT	2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[carbonilofenilamino]-2-tetrazóliohidróxido
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	Aspectos históricos da histoplasmose	21
2.2	Aspectos epidemiológicos da histoplasmose	22
2.3	<i>Histoplasma capsulatum</i>: revisitando o patógeno fúngico	24
2.3.1	<i>Aspectos taxonômicos e filogenéticos</i>	24
2.3.2	<i>Aspectos ecológicos</i>	26
2.3.2.1	<i>Biofilmes</i>	27
2.3.3	<i>Fatores de virulência</i>	28
2.4	Patogenia da histoplasmose	30
2.5	Manifestações clínicas	31
2.6	Diagnóstico da histoplasmose	35
2.6.1	<i>Diagnóstico micológico</i>	35
2.6.2	<i>Diagnóstico molecular</i>	38
2.7	Tratamento da histoplasmose	39
2.8	Sensibilidade antifúngica <i>in vitro</i> e estabelecimento de pontos de corte .	41
3	HIPÓTESES CIENTÍFICAS	46
4	OBJETIVOS	48
4.1	Objetivo geral	48
4.2	Objetivos específicos	48
5	MATERIAIS E MÉTODOS	50
5.1	Descrição do estudo	50
5.2	Parte I: Caracterização dos aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais da histoplasmose	52

5.2.1	<i>Comitê de ética</i>	52
5.2.2	<i>População do estudo</i>	52
5.2.3	<i>Coleta de dados</i>	52
5.2.4	<i>Variáveis analisadas</i>	53
5.2.5	<i>Análise estatística</i>	53
5.3	Parte II: Caracterização laboratorial de <i>Histoplasma capsulatum</i>	53
5.3.1	<i>Identificação molecular de <i>H. capsulatum</i> em cultura e detecção fúngica em espécimes clínicos</i>	53
5.3.1.1	<i>Micro-organismos e espécimes clínicos</i>	53
5.3.1.2	<i>Extração do DNA para PCR</i>	54
5.3.1.3	<i>Ensaio de PCR</i>	54
5.3.1.4	<i>Estabelecimento do limite de detecção</i>	55
5.3.2	<i>Sensibilidade a antifúngicos e determinação do ponto de corte epidemiológico antifúngico contra <i>H. capsulatum</i></i>	55
5.3.2.1	<i>Micro-organismos e inóculo</i>	55
5.3.2.2	<i>Drogas antifúngicas</i>	56
5.3.2.3	<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)</i>	56
5.3.2.4	<i>Análise de dados e determinação do ponto de corte epidemiológico (ECV)</i> ..	57
5.3.3	<i>Caracterização da formação do biofilme</i>	57
5.3.3.1	<i>Cinética de formação do biofilme</i>	57
5.3.3.2	<i>Determinação da atividade metabólica do biofilme por ensaio de redução do XTT</i>	58
5.3.3.3	<i>Quantificação da biomassa do biofilme por coloração com cristal violeta</i> ..	58
5.3.3.4	<i>Classificação da capacidade de formação de biofilme</i>	58
5.3.3.5	<i>Análise da arquitetura do biofilme de <i>H. capsulatum</i></i>	59
6	RESULTADOS	62

6.1	Parte I: Caracterização dos aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais da histoplasmose	62
6.2	Parte II: Caracterização laboratorial de <i>Histoplasma capsulatum</i>	68
7	DISCUSSÃO	77
8	CONCLUSÃO	88
	REFERÊNCIAS	89
	APÊNDICE A – MEIOS DE CULTURA	104
	APÊNDICE B – FICHA PARA COLETA DE DADOS.....	106
	ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	108
	ANEXO B – PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS ORIGINADAS A PARTIR DO TRABALHO	109

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A histoplasmose é uma micose sistêmica causada pelo fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum*, descrita em vários países. Em indivíduos imunocompetentes, a infecção é normalmente assintomática e a cura espontânea ocorre na maioria dos casos. Quando acomete imunocomprometidos, a exemplo de indivíduos HIV positivos, a doença se apresenta principalmente na forma disseminada, apresentando elevada taxa de letalidade.

Nos últimos anos, vários casos de histoplasmose disseminada associada à infecção por HIV têm sido relatados em todo o mundo. No Brasil, essa micose tem se apresentado de forma endêmica em vários estados, inclusive no Ceará, onde estudos epidemiológicos demonstram o aumento anual dos casos, bem como da letalidade.

A morte dos pacientes com histoplasmose ocorre logo nos primeiros meses da doença e, em decorrência disto, ferramentas moleculares têm sido propostas como alternativas para o diagnóstico precoce da histoplasmose, devido à maior rapidez para obtenção dos resultados aliada a falta de necessidade de manipular o fungo na forma infectante. Nessa perspectiva, estudos moleculares têm sido realizados com o objetivo de buscar regiões alvo específicas para *H. capsulatum*.

Por outro lado, a cultura continua sendo o padrão ouro para o diagnóstico da histoplasmose e a vantagem do isolamento fúngico é a caracterização fenotípica dos isolados tanto na forma filamentosa como leveduriforme. Dentre estes estudos, cita-se a realização dos testes de sensibilidade *in vitro*, os quais permitem o monitoramento da sensibilidade aos antifúngicos clássicos ao longo dos anos. Para algumas espécies fúngicas, é difícil o estabelecimento de pontos de corte clínicos (*clinical breakpoints*), entretanto, pesquisas têm investido no estabelecimento de pontos de corte epidemiológico (ECV) que levam em consideração apenas a distribuição dos valores de concentração inibitória mínima (CIM) das drogas antifúngicas. Nesse contexto, já foram determinados ECV para leveduras, fungos filamentosos e, recentemente, fungos dimórficos, entretanto, são escassos os dados para *H. capsulatum*.

Outros estudos de caracterização fazem referência à formação de biofilme *in vitro*. Este fenômeno já foi reportado para *H. capsulatum* na forma de levedura, entretanto ainda não existem relatos de sua caracterização na forma filamentosa, que pode estar relacionada à persistência desse patógeno no ambiente por longos períodos.

Diante do exposto, neste estudo foi realizada uma análise epidemiológica descritiva dos casos de histoplasmose disseminada em pacientes com aids atendidos no período de 2011

a 2015 em um hospital de referência no estado do Ceará, Nordeste do Brasil, enfatizando a busca por características clínico-laboratoriais mais relacionadas a um pior prognóstico (recidiva ou óbito) nesses pacientes. Em análises subsequentes, foi avaliada a aplicação do gene *RYP1*, um importante regulador transcricional da forma filamentosa para leveduriforme, como alvo para o diagnóstico molecular da histoplasmose, tendo sido estabelecido ainda pontos de corte epidemiológico (ECV) para os antifúngicos clássicos e, por último, caracterizada a formação do biofilme de *H. capsulatum* var. *capsulatum* na forma filamentosa.

Revisão de literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos históricos da histoplasmose

A documentação científica sobre o fungo *Histoplasma capsulatum* iniciou-se em 1905 com os achados histopatológicos do patologista Samuel Taylor Darling do Hospital Ancon, nos Estados Unidos da América. A análise histopatológica foi realizada com tecidos oriundos de amostras do baço, fígado, linfonodo e medula óssea de um trabalhador da construção do Canal do Panamá que apresentava quadro clínico de febre irregular, leucopenia, anemia e hepatoesplenomegalia. O resultado revelou a presença de numerosos corpos ovais medindo de 1 a 6 µm de diâmetro, rodeados por um halo translúcido, no interior de macrófagos alveolares. Esses achados levaram o patologista a considerar o agente etiológico como um protozoário, devido à semelhança morfológica com o gênero *Leishmania*, e nomeá-lo *Histoplasma capsulatum* por causa da similaridade do halo com uma cápsula (DARLING, 1906).

Posteriormente, entre os anos de 1905 e 1908, Darling descreveu outros dois casos fatais da doença em um paciente chinês que residia no Panamá e em outro homem que trabalhava próximo ao Canal do Panamá, que apresentavam a mesma sintomatologia previamente descrita (DARLING, 1909).

Em prosseguimento aos estudos de Darling, em 1912, o médico patologista Henrique da Rocha Lima avaliou lâminas oriundas de um paciente com suspeita de leishmaniose visceral e inferiu a natureza fúngica de *H. capsulatum*, caracterizando-o como uma levedura. Dessa forma, das três proposições feitas por Darling, apenas uma foi precisa: *H. capsulatum* é um patógeno intracelular de macrófagos, entretanto, é um fungo e não possui cápsula (CONANT, 1941).

As pesquisas com *H. capsulatum* avançaram e, em 1932, os médicos Dodd e Tompkins diagnosticaram a histoplasmose pela primeira vez em um indivíduo vivo nos EUA, a partir de esfregaço de sangue periférico. O material deste paciente foi enviado para o pesquisador De Monbreum que realizou o isolamento da forma filamentosa em cultura e a reversão para a forma de levedura em experimentos com animais de laboratório, comprovando, assim, o caráter dimórfico de *H. capsulatum* (DE MONBREUM, 1934). Estudos posteriores evidenciaram o caráter geofílico do fungo e a capacidade de causar infecções em animais (EMMONS et al., 1949; EMMONS et al., 1956).

No Brasil, as pesquisas com *H. capsulatum* iniciaram em 1939, quando Almeida e Lacaz isolaram, pela primeira vez, o fungo a partir do cultivo de um fragmento de biópsia de

uma lesão suspeita de cromoblastomicose (ALMEIDA; LACAZ, 1939). Em seguida, em 1941, este mesmo grupo de pesquisadores realizou o segundo isolamento fúngico por meio do cultivo de escarro de um paciente com diagnóstico de tuberculose (ALMEIDA; LACAZ, 1941). Neste mesmo ano, diagnosticou-se, mediante visualização do fungo em fragmentos de fígado e células retículo-endoteliais, o primeiro caso fatal de histoplasmose disseminada em Minas Gerais (VILLELA; PARA, 1941).

Desde o seu descobrimento até meados de 1945, a histoplasmose era considerada uma doença pouco conhecida entre a comunidade médica e de rara ocorrência. Entretanto, a partir de 1947, com a primeira epidemia descrita nos EUA, estudos epidemiológicos demonstraram a elevada prevalência da infecção nessa região, assim como em outros países (EDWARDS; BILLINGS, 1971). No Brasil, por exemplo, diversos surtos epidêmicos vêm sendo descritos desde 1959, sendo o estado do Rio de Janeiro responsável pelo maior número de casos, apesar da histoplasmose ser observada em todas as regiões brasileiras (AIDÉ, 2009; PAULA, 1959). No Ceará, inquéritos epidemiológicos utilizando a histoplasmina, um extrato antigênico de *H. capsulatum* utilizado em testes imunológicos, demonstraram uma positividade de 23,7% em 1986 e, mais tarde, nos anos de 1990 e 1992 apresentaram positividade de 61,5% e 87,3%, respectivamente (ALENCAR et al., 1992; COELHO et al., 1986; DIÓGENES et al., 1990).

Nas décadas de 80 e 90, com o advento da aids, a histoplasmose se tornou uma doença de destaque entre as infecções fúngicas em todo o mundo. Neste período, centenas de casos de histoplasmose disseminada foram descritos em indivíduos portadores de aids, sendo considerada, em algumas áreas endêmicas, a micose sistêmica mais comum em indivíduos infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (BRILHANTE et al., 2012b; DAHER et al., 2007; FERREIRA; BORGES, 2009; GOMEZ, 2011).

Nos últimos anos, esta micose adquiriu maior relevância do ponto de vista social pelo fato de ser uma doença endêmica em grandes áreas do continente Americano; de ter sido reconhecida como doença definidora de aids; estar associada a diferentes atividades ocupacionais e ter sido relatada em um grande número de espécies de animais em todos os continentes (ANDREU et al., 2011).

2.2 Aspectos epidemiológicos da histoplasmose

A histoplasmose é considerada uma micose cosmopolita, já tendo sido descrita em todos os continentes, com exceção da Antártica, e em mais de 60 países (WHEAT et al., 2016).

Nas Américas, a prevalência da histoplasmose é elevada. Na América do Norte, há relatos da infecção no Canadá, México e, principalmente, nos EUA, nas áreas dos vales dos rios Ohio e Mississippi. Em um estudo de 75 anos (1938-2013), foram registrados 105 surtos envolvendo 2.850 casos em 26 estados americanos, tais como Ohio, Iowa, Tennessee, Missouri, Carolina do Norte, Arkansas, Delaware, Illinois, Indiana, Kentucky, Michigan, Minnesota, Nebraska, Pensilvânia e Wisconsin (BENEDICT; DERADO; MODY, 2016; CDC, 2013). Na América Central, a histoplasmose já foi descrita em várias ilhas do Caribe, Honduras, Guatemala, Nicarágua, Panamá e Porto Rico (FERREIRA; BORGES, 2009).

Na América do Sul, essa micose sistêmica ocorre na Venezuela, Peru, Uruguai, Colômbia, Argentina, Guiana Francesa e Brasil (ADENIS et al., 2014b; BAHR et al., 2015; BENEDICT; DERADO; MODY, 2016; BRILHANTE et al., 2012b). Nesses países, a histoplasmose é relatada principalmente em indivíduos com HIV/aids, sendo a doença definidora de aids mais comum na Guiana Francesa (ADENIS et al., 2014b; ARANGO et al., 2011; LÓPEZ et al., 2016).

No Brasil, essa infecção fúngica já foi relatada no Distrito Federal e em vários estados da federação (AIDÉ, 2009; BRILHANTE et al., 2016a; DEUS FILHO et al., 2009; SILVA et al., 2017b). No estado do Ceará a histoplasmose tem se configurado como doença emergente, tendo um aumento da incidência ao longo dos últimos 20 anos (BRILHANTE et al., 2012b; DAHER et al., 2007). O primeiro estudo que relatou o diagnóstico da infecção fúngica neste estado foi desenvolvido por Daher et al. (2007) que registraram 164 casos no período de 1995 a 2004. Posteriormente, de 2006 a 2010, Brilhante et al. (2012b) documentaram 208 casos.

No continente africano, as informações são escassas devido à falta de estudos epidemiológicos mais amplos e à limitada capacidade laboratorial. Nesse continente, coexistem duas variedades do fungo: *H. capsulatum* var. *capsulatum*, agente etiológico da histoplasmose clássica e *H. capsulatum* var. *duboisii*, agente etiológico da histoplasmose africana, existindo relatos da doença em países como Nigéria, Zimbábue, Uganda e Congo (OLADELE et al., 2018).

Com relação ao continente asiático, casos autóctones já foram documentados na Índia, China, Malásia, Indonésia, Cingapura, Tailândia, Vietnã e Japão (BAHR et al., 2015). Na China, por exemplo, os casos são mais esporádicos, como demonstrado em um estudo realizado ao longo de 21 anos (1990-2011), que notificou apenas 300 casos nesse período, dos quais 75% ocorreram ao longo do rio Yangtze (PAN et al., 2013). Na Tailândia, por outro lado, a epidemia de aids foi responsável por um aumento da histoplasmose disseminada, com relatos superiores a 1200 casos entre 1984 a 2010 (BAHR et al., 2015).

No tocante ao continente europeu, a maioria dos casos relatados de histoplasmose está relacionada a imigrantes ou indivíduos que retornaram de áreas altamente endêmicas (BAHR et al., 2015; INOJOSA et al., 2011), entretanto, já houve relatos de casos em pacientes do Reino Unido e Itália que não viajaram para fora do país de origem (ASHBEE et al., 2008; WHEAT et al., 2016).

2.3 *Histoplasma capsulatum*: revisitando o patógeno fúngico

2.3.1 Aspectos taxonômicos e filogenéticos

O gênero *Histoplasma* pertence à família Ajellomycetaceae, ordem Onygenales e filo Ascomycota. Esse gênero é composto pela espécie *H. capsulatum*, cuja forma teleomorfa, ou de reprodução sexuada, é denominada de *Ajellomyces capsulatus*, um organismo heterotático com *mating types* MAT (+) e MAT (-) (NCBI, 2018; WOODS, 2016).

Historicamente, a espécie foi dividida em três variantes taxonômicas, incluindo *H. capsulatum* var. *capsulatum*, var. *duboisii* e var. *farciminosum*, com base na micromorfologia, distribuição geográfica, predileção de hospedeiro e apresentações clínicas da doença. Dessa forma, a var. *capsulatum* é considerada o principal agente etiológico mundial para a histoplasmose clássica humana, var. *duboisii* está associada à doença humana em partes da África e var. *farciminosum* à doença em equinos (BRILHANTE et al., 2016a; NCBI, 2018; WANKE; LAZÉRA, 2004).

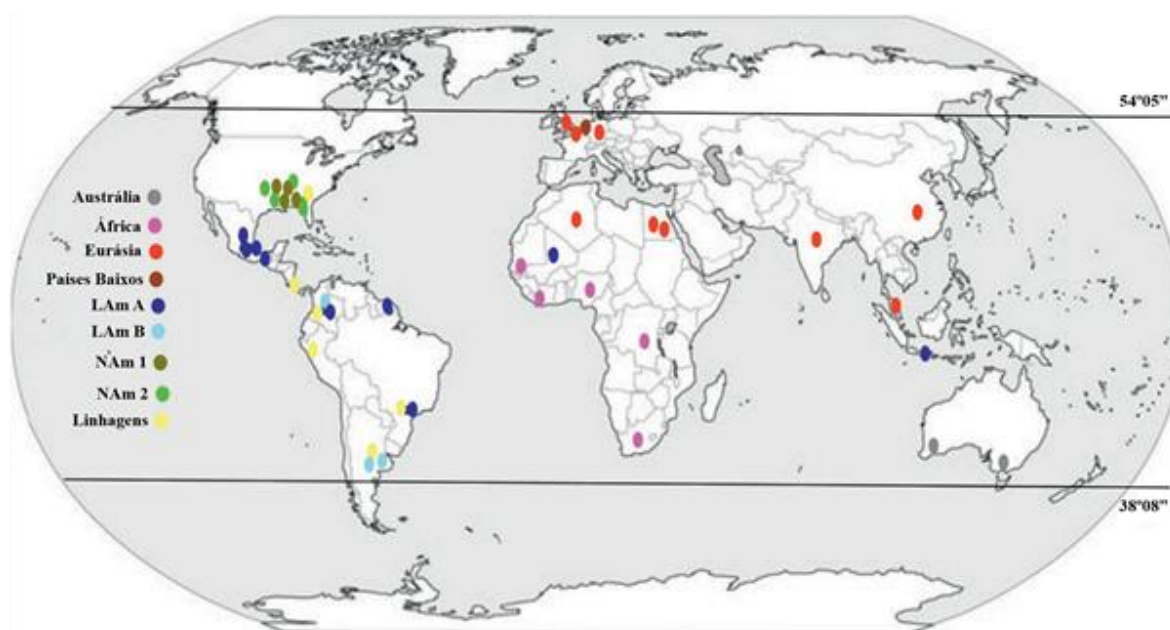
Nos últimos anos, devido ao aumento dos casos de histoplasmose no mundo e com o advento de técnicas moleculares para classificar espécies fúngicas, vários esquemas de genotipagem foram propostos para explorar as características filogenéticas do fungo. O método frequentemente empregado para distinguir cepas de *H. capsulatum* é o *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD, amplificação aleatória de DNA polimórfico). Esses estudos identificaram uma relação entre os perfis de RAPD e a origem geográfica, revelando uma importante diferença genética entre os isolados de *H. capsulatum* dos EUA e da América Latina (DAMASCENO et al., 2016).

No Brasil, os estudos filogenéticos demonstraram o perfil molecular de cepas de *H. capsulatum* circulantes nas regiões Sul e Sudeste (MUNIZ et al., 2010; ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2005). Segundo Zancopé-Oliveira et al. (2005), as cepas de diferentes regiões geográficas do Brasil foram agrupadas por RAPD-PCR e os autores observaram a presença de 3 agrupamentos: I – cepas do nordeste, II – cepas do sul e sudeste e III – cepas do

centro oeste. Adicionalmente, em 2012, um grupo de pesquisa do Ceará realizou uma análise da diversidade genética de *H. capsulatum* var. *capsulatum* e os isolados foram separados em dois grupos: o cluster 1, que incluiu as cepas das regiões Sudeste e Nordeste, com separação de isolados em três subgrupos distintos, e o cluster 2, que incluiu apenas amostras do Nordeste, contribuindo assim, para a caracterização das populações deste micro-organismo na região (BRILHANTE et al., 2012c).

Outra técnica aplicada ao estudo da diversidade genética é a *Multilocus Sequence Typing* (MLST, tipagem por sequenciamento multiloci). Baseado nesse método, *H. capsulatum* pode ser agrupado em oito clados com sete espécies filogenéticas: América do Norte clado 1 (NAM1), América do Norte clado 2 (NAM2), América Latina clado A (LAM A), América Latina clado B (LAM B), Austrália, Indonésia, Eurásia e África (KASUGA et al., 2003) (Figura 1). Adicionalmente, estudos recentes, como por exemplo a análise de Teixeira et al., (2016), têm proposto novas espécies filogenéticas na América Latina, tais como RJ, LAm B1, LAm B2, LAm A1, LAm A2, BAC1 (TEIXEIRA et al., 2016).

Figura 1. Distribuição geográfica dos clados e linhagens de *H. capsulatum*.



Fonte: KASUGA et al., 2003; VITE-GARÍN et al., 2014.

Legenda: Os dados foram obtidos com base nas sequências parciais de quatro genes codificadores de proteínas, utilizando 137 isolados de fungos de 25 países. A maioria dos isolados era *H. capsulatum* var. *capsulatum*, mas *H. capsulatum* var. *duboisii* e *H. capsulatum* var. *farcimosum* também foram incluídos. *H. capsulatum* var. *capsulatum* (todos os clados), *H. capsulatum* var. *duboisii* (clado africano), *H. capsulatum* var. *farcimosum* (NAM 2, clados africanos e euro-asiáticos).

Em contrapartida, em 2017, Sepúlveda e colaboradores propuseram um novo rearranjo taxonômico para o gênero *Histoplasma*, o qual seria composto por, pelo menos, quatro

diferentes espécies crípticas que possuem diferenças genéticas e de virulência, *H. capsulatum*, *H. mississippiense* sp., *H. ohioense* sp. e *H. suramericanum* sp. (SEPÚLVEDA et al., 2017). Entretanto, estudos adicionais são necessários para explorar a diversidade genética deste fungo e definir a classificação taxonômica para correlacionar seu genótipo com fenótipos clinicamente importantes através da genômica populacional.

2.3.2 Aspectos ecológicos

H. capsulatum é um fungo saprófita que se desenvolve em condições ambientais encontradas nas regiões de climas tropical e subtropical, entre as latitudes 45° Norte e 30° Sul; onde a temperatura varia em torno de 22 a 29 °C, com precipitação anual entre 35 a 50 mm e umidade relativa de 60 a 87% (FERREIRA; BORGES, 2009; WANKE; LAZÉRA et al., 2004).

O fungo é tipicamente encontrado em solos ácidos, úmidos e ricos em carboidratos, fosfato e alto teor de nitrogênio, o que inibe o crescimento de organismos competidores, favorecendo a sobrevivência do patógeno. O isolamento ocorre, particularmente, em ambientes enriquecidos com guano de aves ou morcegos, como cavernas, minas, parques públicos, ocos de árvores, galinheiros, forros de casas e edificações antigas (AIDÉ, 2009; FERREIRA, BORGES, 2009; GUPTA et al., 2017).

Nesse contexto, a realização de atividades que revolvam o solo, como escavações, construções ou atividades exploratórias em cavernas ou grutas, é considerada de risco para infecção por *H. capsulatum* (GUPTA et al., 2017). Surtos de histoplasmose já foram descritos em trabalhadores de um túnel que removeram grandes quantidades de guano de morcegos sem proteção respiratória; assim como em pedreiros expostos à poeira de demolição contendo excrementos de morcegos ou aves (ARMSTRONG et al., 2017; CDC, 2013). Da mesma forma, Benedict, Derado e Mody (2016) investigaram 2.850 casos de histoplasmose e constataram que 23% desses surtos estavam relacionados à exposição a morcegos ou guano, e 56% a aves ou seus excrementos (BENEDICT; DERADO; MODY, 2016).

Acredita-se ainda que as aves também tenham um papel importante na disseminação do fungo pois podem carregá-lo em suas asas, penas e bicos; entretanto, não são comumente infectadas por *H. capsulatum*, uma vez que sua temperatura corporal é muito alta, em torno de 40 a 42 °C (ADENIS et al., 2014c). Os morcegos, por sua vez, são susceptíveis à infecção, além de participarem ativamente do ciclo epidemiológico da histoplasmose. Devido à capacidade migratória, os quirópteros podem disseminar o patógeno através da eliminação de

formas viáveis do fungo pelas fezes, contaminando o solo (SANTOS et al., 2017; WANKE; LAZÉRA, 2004).

Estima-se que os propágulos do fungo presentes no solo/guano podem atingir um raio de até 32 km ao redor de fontes de infecção em locais abertos, como copa de árvores, mesmo sem o revolvimento de solos contaminados (WANKE; LAZÉRA, 2004). Além disso, *H. capsulatum* pode permanecer por até 10 anos, mesmo após este local ter sido limpo, inclusive em áreas urbanas (ADENIS et al., 2014c). Uma outra possibilidade de apresentação desse fungo no ambiente é na forma de biofilme.

2.3.2.1 Biofilmes

Biofilmes são comunidades microbianas sésseis que aderem fortemente às superfícies bióticas ou abióticas e são protegidas por uma matriz extracelular polimérica composta principalmente de polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios. Estas células sésseis apresentam modificações fenotípicas, genéticas e estruturais quando comparadas com as células planctônicas (COSTA-OLANDI et al., 2017; KUMAR et al., 2017).

No meio ambiente, esta forma de crescimento prevalece na natureza em comparação com as células planctônicas e proporcionam ao fungo proteção dos conídios contra danos ambientais, tais como radiação UV, temperaturas extremas e agentes químicos (COSTA-OLANDI et al., 2017; GUIMARÃES et al., 2011; SARDI et al., 2014).

A formação de biofilmes por micro-organismos, particularmente bactérias, tem sido amplamente estudada há décadas. Nos últimos anos, diversos estudos com biofilmes formados por fungos patogênicos têm sido descritos, dentre estes, citam-se *Candida* spp. (GULATI et al., 2016; SHERRY et al., 2017; SOLDINI et al., 2017), *Cryptococcus* spp. (AJESH et al., 2012; MARTINEZ; CASADEVALL, 2015); *Malassezia* spp. (ALLEN et al., 2015; BRILHANTE et al., 2018a); *Trichosporon* spp. (ALMEIDA et al., 2016; CORDEIRO et al., 2015); *Fusarium* spp. (SAV et al., 2018), *Aspergillus* spp. (KAUR; SINGH, 2014; VILLENA et al., 2007).

As pesquisas com fungos dimórficos já demonstraram a caracterização do biofilme de *Sporothrix* spp. nas formas filamentosa e leveduriforme (BRILHANTE et al., 2017a; SILVA, 2017a), bem como de *Paracoccidoides* spp. e *Histoplasma capsulatum* na forma de levedura (BRILHANTE et al., 2015; PITANGUI et al., 2012; SARDI et al., 2015), não havendo relatos da forma filamentosa.

De forma geral, as fases de formação de biofilme envolvem primeiramente uma

adesão ao substrato. Posteriormente, ocorre a primeira formação de microcolônia, que envolve alongamento e ramificação de hifas, com a produção de matriz extracelular; e a segunda formação de microcolônias ou maturação inicial, na qual redes de hifas compactas se formam em três dimensões, cobertos por uma matriz extracelular e formação de canais de água. Por fim, ocorre a maturação do biofilme e dispersão de conídios e/ou fragmentos de hifas (COSTA-OLANDI et al., 2017; KUMAR et al., 2017).

Os estudos realizados com objetivo de caracterizar esses biofilmes fúngicos *in vitro* fazem uso de algumas ferramentas, tais como o sal de XTT (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[carbonilofenilamino]-2-tetrazóliohidróxido), usado para determinar a atividade metabólica nos estágios de desenvolvimento dos biofilmes e nos testes de sensibilidade antifúngica; e a coloração com cristal violeta para quantificação de biomassa (BRILHANTE et al., 2017a,b; CORDEIRO et al., 2015).

Outras avaliações do biofilme podem ser feitas com o auxílio de microscopias especiais como a eletrônica de varredura, para observação da morfologia e a microscopia confocal, para analisar a arquitetura e espessura tridimensional por meio de parâmetros como espessura, rugosidade, biovolume e relação área/volume. A espessura é definida como a espessura máxima em um determinado local, ignorando poros dentro do biofilme; o coeficiente de rugosidade fornece uma medida de quanto a espessura do biofilme varia, sendo um indicador da heterogeneidade do biofilme; o biovolume representa o volume total do biofilme, e também fornece uma estimativa da biomassa; e a relação área/volume reflete a área da superfície dividida pelo biovolume, indicando qual fração do biofilme está de fato exposta ao fluxo de nutrientes e como ele se adapta ao ambiente. Por exemplo, pode-se especular que em ambientes de baixa concentração nutricional, a relação entre superfície e volume aumentaria para otimizar o acesso ao suprimento limitado de nutrientes (BRILHANTE et al., 2017b; HEYDORN et al., 2000).

2.3.3 Fatores de virulência

Histoplasma capsulatum possui diferentes atributos de virulência que medeiam sua interação com as células imunes do hospedeiro, evitando a destruição pela resposta imune e facilitando a replicação em um novo ambiente (GARFOOT; RAPPLEYE, 2016; PITANGUI et al., 2012), como por exemplo, o dimorfismo térmico.

Dessa forma, o fungo se apresenta na forma filamentosa (fase saprofítica) quando exposto à temperatura de ambientes de clima temperado e tropical, mas quando expostos à

temperatura corporal de mamíferos, modifica sua morfologia para a forma de levedura (fase parasitária) (WOODS, 2016). Neste momento há uma alteração na composição dos polissacarídeos da parede celular mediante a substituição da camada imuno-estimuladora de β -glucano por α -glucano (GARFOOT; RAPPLEYE, 2016).

Apesar de a temperatura ser o pré-requisito básico para que esses fungos sofram a reversão morfológica, sabe-se que fatores nutricionais também são de suma importância, e que essa reversão é governada por reguladores transcricionais dos quais destaca-se o gene *RYP* (BOYCE; ADRIANOPOULOS, 2015; NGUYEN; SIL, 2008).

O gene *RYP1* foi identificado como um regulador estável principal na transição dimórfica, de modo que, o bloqueio desse gene impede o crescimento leveduriforme de cepas à 37 °C (NGUYEN; SIL, 2008). Ademais, estudos demonstraram que o gene *RYP1* regula a expressão de diferentes genes, pois analisando a comparação do perfil transcricional de cepas de *H. capsulatum* do tipo selvagem versus cepas mutantes para *RYP1*, observou-se que as células mutantes não expressavam alguns genes a 37 °C, como por exemplo os genes importantes para obtenção de cálcio (BOHSE, WOODS 2007; BOYCE; ADRIANOPOULOS, 2015).

Outros reguladores transcricionais nomeados de *RYP2*, *RYP3* e *RYP4* que também atuam no controle do crescimento da forma de levedura já foram identificados (BEYHAN et al., 2013; BOYCE; ADRIANOPOULOS, 2015). A regulação de *RYP1*, *RYP2*, *RYP3* e *RYP4* é interdependente, sugerindo que cada uma delas é necessária para a expressão e função dos outros (BEYHAN et al., 2013).

Ademais, existem fatores de virulência produzidos por *H. capsulatum* na forma de levedura que permitem o fungo parasitar e sobreviver em células imunológicas fagocíticas por longos períodos (Quadro 1) (GARFOOT; RAPPLEYE, 2016).

Quadro 1. Mecanismos de sobrevivência intracelular de *H. capsulatum*.

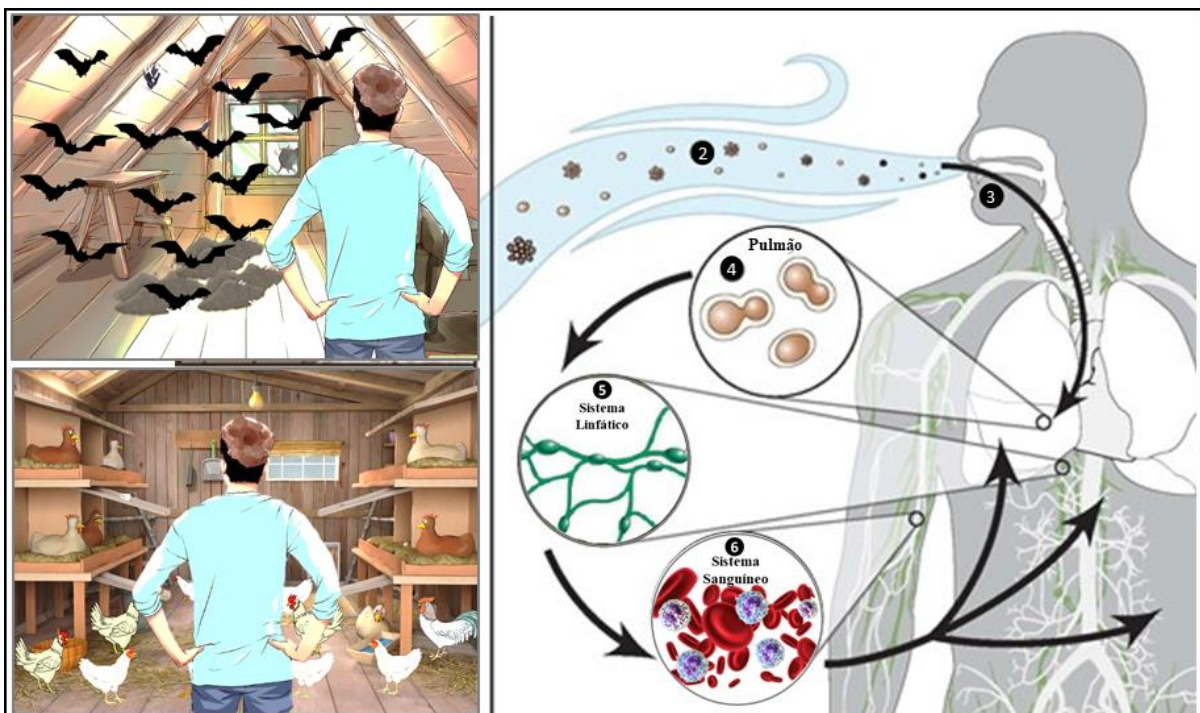
Mecanismos	Função
Produção de Superóxido dismutase extracelular (Sod3) e Catalases (CatB e CatP)	Eliminar espécies reativas de oxigênio
Produção de Sideróforos e redução de Fe ³⁺ a Fe ²⁺	Adquirir ferro em um ambiente com limitações de nutrientes
Gene <i>URA5</i>	Biossíntese de pirimidina e ácidos nucleicos
Produção da proteína de ligação ao cálcio (Cbp1)	Ligação e transporte de Ca ²⁺ ao ambiente intracelular

Fonte: GARFOOT; RAPPLEYE, 2016

2.4 Patogenia da Histoplasmose

A via mais comum para a infecção de seres humanos ou animais por *H. capsulatum* é a inalação de conídios ou fragmentos miceliais do fungo presentes em ambientes contaminados, que são facilmente disseminados pelo ar (Figura 2). Raramente, a forma parasitária também pode ser transmitida diretamente por transplante de tecido ou acidentes laboratoriais (ADENIS et al., 2014c; LIMAYE et al., 2000; WHEAT et al., 2016).

Figura 2. Ciclo biológico de *H. capsulatum*



Fonte: CDC, com adaptações (<http://www.cdc.gov/>).

Ciclo biológico de *H. capsulatum*, evidenciando a fase saprofítica no ambiente (1-2) e a fase parasitária após a sua inalação por um hospedeiro susceptível (3-6). Os propágulos do fungo presentes no ambiente (1) são inalados (2), assim, o pulmão é o órgão de choque (3). A temperatura mais quente dentro do hospedeiro sinaliza uma transformação para forma de levedura (4) e esta é fagocitada por células imunes e transportada para linfonodos regionais (5). A partir daí eles se disseminam pelo sangue para outras partes do corpo (6).

Dentro dos espaços alveolares, *H. capsulatum* encontra as proteínas surfactantes SP-A e SP-D. *In vitro*, tanto SP-A quanto SP-D têm efeitos antifúngicos diretos sobre leveduras de *H. capsulatum*, causando a permeabilização e morte das células (GARFOOT; RAPPLEYE, 2016). Portanto, a internalização das leveduras de *H. capsulatum* por macrófagos alveolares anula completamente a atividade fungicida de SP-A e SP-D, indicando que os macrófagos alveolares protegem *H. capsulatum* dos efeitos antimicrobianos das proteínas do surfactante (GARFOOT; RAPPLEYE, 2016).

Os fagócitos facilitam a disseminação de *H. capsulatum* em vários órgãos, em todo o sistema mononuclear fagocitário, incluindo o baço, fígado, medula óssea e linfonodos (Figura 2). Assim, para controlar o crescimento intracelular do organismo, o hospedeiro deve montar uma resposta pró-inflamatória robusta e a imunidade celular desempenha um papel essencial na defesa contra *H. capsulatum* (WHEAT et al., 2016).

Na ausência de condições de imunocomprometimento, ocorre o controle da infecção após a segunda ou terceira semanas pois células CD4⁺ passam a secretar citocinas do tipo Th1, levando a formação de reação granulomatosa e tendência à calcificação no pulmão. Fungos viáveis podem permanecer nas áreas cicatrizadas por vários anos (WHEAT et al., 2016), e pode ocorrer uma reativação fúngica, quando há queda ou falha da imunidade celular (SHEN; RAPPLEYE, 2017).

Pacientes imunocomprometidos, particularmente aqueles com deficiência na imunidade celular, têm capacidade reduzida para conter uma infecção crescente. Esses pacientes têm maior probabilidade de desenvolver doença disseminada progressiva, mesmo quando expostos a inóculos fúngicos menores (AZAR; HAGE, 2017b). As populações de risco identificadas são os pacientes em extremos de idade; indivíduos infectados com o vírus HIV; síndrome da imunodeficiência adquirida; receptores de transplante de órgãos sólidos; e pacientes que recebem inibidores do fator de necrose tumoral (TNF) (AZAR; HAGE, 2017b).

Dentre estes grupos, a população de indivíduos infectados com o vírus HIV apresenta-se como a principal acometida. A histoplasmose ocorre em 2-25% dos pacientes, sendo considerada a primeira manifestação da aids em 50-75% dos casos, principalmente naqueles com contagem de CD4⁺ inferior a 150 células/ μ L (BENEDICT; DERADO; MODY, 2016; LIMPER et al., 2017).

2.5 Manifestações clínicas

A maioria das infecções por *H. capsulatum* evolue de forma assintomática (90-95%), todavia, 5 a 10% dos indivíduos apresentam sintomatologia variável, a depender do inóculo e do estado imunológico do hospedeiro. As formas clínicas podem ser classificadas em assintomáticas, forma pulmonar aguda, forma pulmonar subaguda, forma pulmonar crônica e histoplasmose progressiva disseminada (AZAR; HAGE, 2017b). As principais características das diferentes manifestações clínicas estão sumarizadas no Quadro 2.

Quadro 2. Apresentações clínicas da histoplasmose.

Características	Formas clínicas				
	Assintomática (90-95% dos casos)	Pulmonar aguda	Pulmonar subaguda	Pulmonar crônica	Progressiva disseminada
População de risco	• Indivíduos sem doença de base	• Indivíduos sem doença de base expostos a altas concentrações de carga fúngica	• Indivíduos sem doença de base expostos a baixas concentrações de carga fúngica	• Indivíduos com defeito anatômico estrutural que favorece a instalação do foco inicial; como DPOC, fumantes	• Imunossuprimidos
Curso clínico	-	• 1 a 2 semanas	• Semanas a meses	• Meses a anos	• 1 a 2 semanas
Diagnóstico	• Reconhecida apenas pela resposta intradérmica a prova da histoplasmina	• Teste cutâneo: positivo em mais de 90% dos casos • Anticorpo contra <i>H. capsulatum</i> pode estar presente em 25% a 85% dos casos • Antígeno urinário pode ser positivo em 20% dos casos • Cultura de escarro pulmonar pode ser positiva em menos de 25% dos casos.	-	• Teste cutâneo: positivo 70-90% dos casos • Anticorpo contra <i>H. capsulatum</i> pode estar presente em 75% a 95% dos casos • Antígeno urinário pode ser positivo em 40% dos casos • Cultura de escarro pulmonar pode ser positiva em 5% a 70% dos casos	• Teste cutâneo: positivo 3% a 55% dos casos • Anticorpo contra <i>H. capsulatum</i> pode estar presente em 70% a 90% dos casos • Antígeno urinário pode ser positivo em 70% a 90% dos casos • Cultura de sangue/aspirado medular podem ser positivas em mais de 85% dos casos
Achados radiográficos	• Presença de focos pulmonares calcificados	• Presença de infiltrados difusos	• Infiltrado focal	• Cavitações, fibrose, calcificações, espessamento pleural	• Infiltrados reticulo nodulares difusos, derrame pleural
Manifestações	• Quadro gripal	• Febre, dispneia, cefaleia, tosse não produtiva, dor torácica, insuficiência respiratória • Manifestações menos comuns: pneumonias artralguas, artrite, eritema nodoso e eritema multiforme	• Febre, mal-estar, cefaleia, mialgia, anorexia, tosse não produtiva, dor torácica	• Febre, tosse produtiva, dispneia, possível hemoptise, cianose	• Febre, anorexia, perda de peso, astenia, tosse, dispneia, diarreia, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatia generalizada.
Tratamento	-	• Grave: Anfotericina B por 1 a 2 semanas seguida por itraconazol • Leve a moderada: Itraconazol	• Itraconazol por 6 a 12 semanas	• Itraconazol por 1 a 2 anos e até resolução ou estabilização radiológica	• Grave: Anfotericina B por 1 a 2 semanas, seguida de itraconazol • Leve e moderada: Itraconazol

Fonte: AKRAM; KOIRALA, 2017; AZAR; HAGE, 2017b; WHEAT et al., 2007; HAGE et al., 2015.

Legenda: (-) Sem informação.

Como este estudo teve como foco indivíduos diagnosticados com HIV/aids e histoplasmose, detalharemos a forma progressiva disseminada da histoplasmose que é a mais comum nesta população (ADENIS et al., 2014b; SHEN; RAPPLEYE, 2017).

Nesses pacientes, a sintomatologia reflete o comprometimento dos órgãos atingidos, sendo os principais alvos extrapulmonares o fígado, baço, medula óssea, pele e tecidos subcutâneos (BRILHANTE et al., 2012b; WHEAT et al., 2016; WOODS, 2016). O acometimento do sistema nervoso central ocorre em 10% a 20 % dos casos, mas as lesões podem assemelhar-se a infecções por outros agentes etiológicos. Os sintomas mais característicos são hidrocefalia, meningite aguda ou crônica, consciência rebaixada, cefaleia, deficiência de nervos cranianos e convulsões (GÓRALSKA; BLASZKOWSKA; DZIKOWIEC, 2018).

Ademais, observam-se lesões cutâneas polimórficas, que vão desde pápulas, placas com ou sem crostas, pústulas e nódulos às úlceras da mucosa, erosões, lesões parecidas com o molusco contagioso, dentre outras (Figura 3) (BRILHANTE et al., 2012b; DAHER et al., 2007; LÓPEZ et al., 2016).

Figura 3. Manifestações cutâneas da histoplasmose disseminada em pacientes diagnosticados com aids.



Fonte: CHANG, RODAS, 2012.

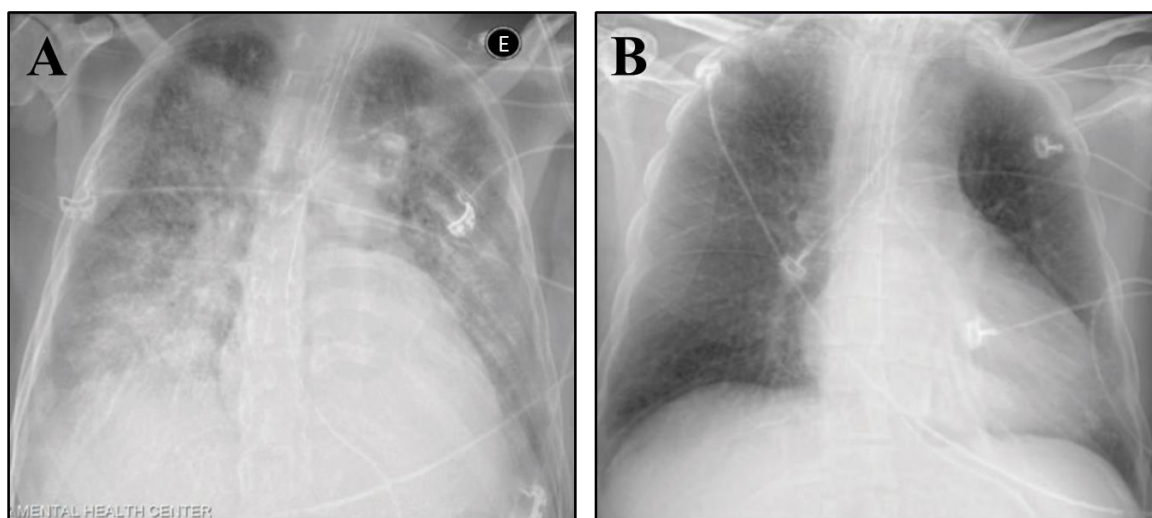
Legenda:

- A) Placas ulceradas com crostas hemáticas e pápulas;
- B) Lesão nodular.

As alterações laboratoriais inespecíficas mais encontradas são pancitopenia, aumento de lactato desidrogenase (LDH), aumento da velocidade de hemossedimentação (VHS) e

elevação das transaminases (BRILHANTE et al., 2012b; DAMASCENO et al., 2013; PONTES et al., 2010; SAMAYOA et al., 2017). Quanto aos achados radiográficos, os infiltrados pulmonares retículo-nodulares e intersticiais difusos (Figura 4) são os mais descritos (BRASIL, 2017a; BRILHANTE et al., 2012b), entretanto, comumente são encontradas radiografias de tórax normais.

Figura 4. Radiografia de paciente diagnosticado com aids/histoplasmose.



Fonte: ZARLASHT et al., 2016.

Legenda:

Radiografia torácica. Em A, projeção anteroposterior mostrando infiltrados intersticiais difusos antes do tratamento antifúngico. Em B, paciente após o tratamento com anfotericina B.

Nas áreas endêmicas para a doença, este quadro clínico inespecífico faz da tuberculose e leishmaniose visceral os principais diagnósticos diferenciais de histoplasmose. Dessa forma, é necessária a suspeição da histoplasmose pelos clínicos diante de um quadro de pancitopenia e valores altos de Lactato desidrogenase (LDH), para que haja uma abordagem diagnóstica precisa (ADENIS et al., 2014a). Essa inespecificidade e similaridade dos sinais clínicos com aqueles de outras doenças infecciosas disseminadas podem atrasar o diagnóstico e o tratamento, contribuindo para o aumento da letalidade (SAMAYOA et al., 2017; ADENIS et al., 2014a).

Nos indivíduos que apresentam histoplasmose disseminada, os óbitos ocorrem em 10 a 60%, logo no primeiro mês após o diagnóstico (BRILHANTE et al., 2012b; COLOMBO et al., 2011; DAMASCENO et al., 2014). Alguns estudos têm avaliado possíveis fatores de risco para os altos índices de letalidade da doença, tais como o não uso de terapia antirretroviral, presença de co-infecções, baixos níveis de plaquetas e hemoglobina e níveis elevados de ureia

e creatinina (AGABA et al., 2011; DAHER et al., 2006; DAMASCENO et al., 2014; SAMOYA et al., 2017). No Ceará, há relatos de aumento nos índices de letalidade de 32% para 42,3% (BRILHANTE et al., 2012b; DAHER et al., 2006), portanto, mais pesquisas objetivando uma maior e melhor caracterização da letalidade são de grande importância, visto que o mapeamento de fatores de risco possibilita a elaboração de estratégias para o melhor direcionamento das ações a serem realizadas.

2.6 Diagnóstico da histoplasmose

Para o diagnóstico da histoplasmose, é imprescindível a avaliação dos dados epidemiológicos e clínicos, dos aspectos imuno-hematológicos e bioquímicos do paciente e a realização do diagnóstico micológico com a pesquisa direta e cultura para fungos (CACERES et al., 2016). Adicionalmente, ferramentas moleculares têm sido propostas como alternativas para o diagnóstico da histoplasmose diretamente do espécime clínico devido à rapidez dos resultados e à não manipulação do patógeno na sua forma infectante (AZAR; HAGE, 2017a; MURAOSA et al., 2016).

2.6.1 Diagnóstico micológico

O diagnóstico micológico abrange duas técnicas: a visualização de leveduras na pesquisa para fungos e o isolamento da forma filamentosa em cultura de espécimes clínicos, que constitui o padrão ouro para o diagnóstico de histoplasmose (AZAR; HAGE, 2017a).

Para realização da pesquisa, os espécimes clínicos mais utilizados dos pacientes com histoplasmose disseminada são o creme leucocitário e o aspirado de medula óssea, que podem ser corados pela coloração de Giemsa (Figura 5A). As amostras positivas são caracterizadas pela presença de células leveduriformes ovais que medem de 2 a 4 μm na maior dimensão. Estas leveduras localizam-se, na maioria das vezes, no interior de macrófagos (Figura 5), entretanto, em muitas preparações, também podem ser observadas no meio extracelular (BRILHANTE et al., 2016a; WHEAT et al., 2016).

Adicionalmente, podem ser realizadas colorações especiais para tecidos, tais como Grocott-Gomori (Figura 5B), ácido periódico-Schiff (PAS) e hematoxilina-eosina (HE) (Figura 5C), que permitem realizar o diagnóstico diferencial de micro-organismos, tais como *Leishmania* spp. que não é corado por Grocott-Gomori (AZAR; HAGE, 2017a; WHEAT et al., 2016). A vantagem da realização da pesquisa é a rapidez de resultados, apesar da técnica

apresentar uma baixa sensibilidade, em torno de 50% (ANDREU et al., 2011).

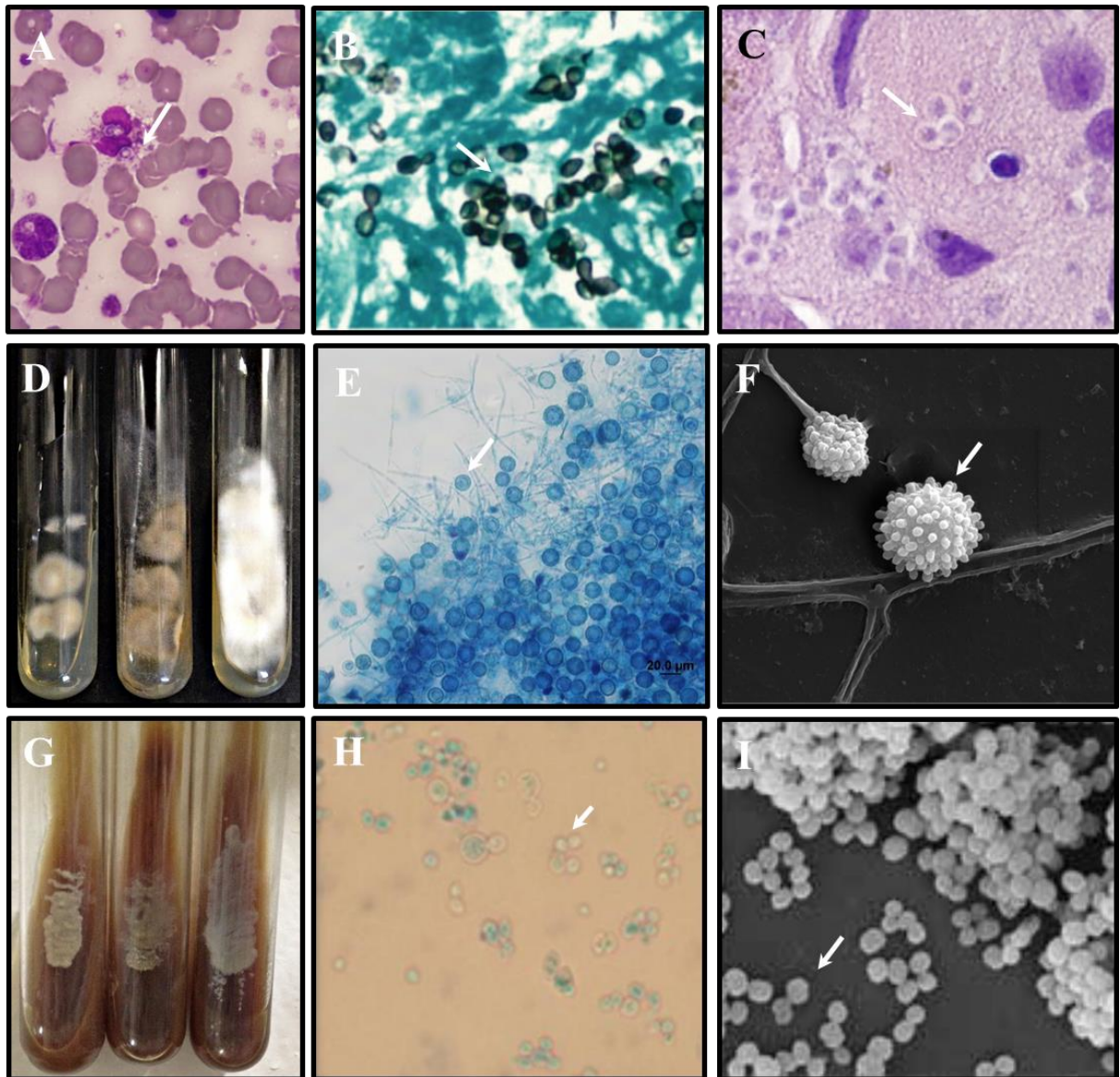
Paralelamente ao exame direto, deve-se realizar a cultura fúngica do espécime clínico. Após 2-4 semanas de incubação em ágar Sabouraud acrescido ou não com cloranfenicol e cicloheximida, podem crescer colônias algodonosas com micélio aéreo, abundância de hifas, presença de macroconídios e microconídios; ou colônias marrons com micélio aplanado, poucas hifas, numerosos macroconídios tuberculados e poucos microconídios (Figura 5D) (AIDÉ et al., 2009). Os microconídios são estruturas ovais com paredes lisas e diâmetro de cerca de 2-4 μm ; e os macroconídios são estruturas arredondadas, com parede rugosa coberta com projeções distintas e diâmetro variando de 8-15 μm (Figura 5E, 5F) (ANDREU et al., 2011; BRILHANTE et al., 2016a; WANKE; LAZÉRA, 2004).

A sensibilidade da cultura de espécimes clínicos oriundos de pacientes com diagnóstico clínico de histoplasmose disseminada é variável, sendo positiva em 50% a 85% dos casos, mas sua especificidade é de 100%. Após o crescimento em cultura, a manipulação de *H. capsulatum*, por apresentar-se em sua forma infectante, deve sempre ser realizada em cabines de segurança biológica em laboratórios de nível de biossegurança 3. Os procedimentos devem ser executados por funcionários devidamente capacitados usando equipamentos de proteção individual apropriados (WHEAT et al., 2016).

Outro método que pode ser utilizado para complementar o diagnóstico da histoplasmose é a reversão *in vitro* da fase filamentosa para a fase leveduriforme. Para tanto, as cepas são incubadas a 37 °C em meios enriquecidos, como ágar infusão de cérebro e coração (BHI) ou ágar Sabouraud suplementados com 5-10% de sangue de carneiro. Macroscopicamente, as colônias leveduriformes de *H. capsulatum* apresentam cor creme, textura cremosa e superfície lisa ou rugosa (Figura 5G) (ANDREU et al., 2011; BRILHANTE et al., 2016a). Microscopicamente, as leveduras apresentam-se como pequenas células ovais (blastoconídios) medindo cerca de 3-5 μm de diâmetro (Figura 5H, 5I).

A reversão *in vitro* é um processo laborioso que pode aumentar o tempo para o diagnóstico, uma vez que requer repiques sucessivos do fragmento da colônia filamentosa por 2 a 4 semanas (BRILHANTE et al., 2016a). Ademais, as culturas envelhecidas mantidas por muito tempo em sua forma filamentosa, geralmente não se convertem facilmente (ANDREU et al., 2011). Este método não faz parte da rotina laboratorial de diagnóstico, todavia, é realizado por centros de pesquisa em estudos para a caracterização dos isolados de *H. capsulatum* nas fases filamentosa e leveduriforme (BRILHANTE et al., 2015; CORDEIRO et al., 2011).

Figura 5. Aspectos macroscópicos e microscópicos de *H. capsulatum*.



Legenda:

- A)** Células leveduriformes de *H. capsulatum* no interior de um leucócito (seta branca) de um esfregaço de sangue periférico corados pelo Giemsa (CEMM, 2015);
- B)** Presença de blastoconídios de levedura na cor acastanhada (seta branca) após coloração de tecido com Grocott Gomori (HAGE et al., 2015);
- C)** Presença de células leveduriformes envoltos em um halo (seta branca) em coloração com hematoxilina-eosina de uma biópsia hepática (WHEAT et al, 2016);
- D)** Aspecto macromorfológico da colônia crescida a 28 °C em ágar Sabouraud dextrose 2%, demonstrando textura algodoadosa de coloração branca e acastanhada (CEMM, 2017);
- E)** Aspecto micromorfológico da forma filamentososa demonstrando a presença de macroconídios (seta branca) após coloração com lactofenol azul de algodão (CEMM, 2015);
- F)** Macroconídio turbeculado, conhecido como corpo mamilonado (seta branca) em Microscopia Eletrônica de Varredura (CEMM, 2015);
- G)** Forma leveduriforme a 37 °C em ágar-BHI, demonstrando colônias de aspecto úmido, coloração creme-amarronzada (CEMM, 2017);
- H)** Aspecto micromorfológico da forma leveduriforme demonstrando blastoconídios (seta branca) em lactofenol azul de algodão (CEMM, 2015);
- I)** Blastoconídio de *H. capsulatum* na fase leveduriforme (seta branca) em Microscopia Eletrônica de Varredura (PITANGUI et al., 2012).

2.6.2 Diagnóstico molecular

Os métodos moleculares surgiram como uma ferramenta adicional para o diagnóstico precoce da histoplasmose, uma vez que possuem tempo de resposta menor que outros métodos e uma alta sensibilidade, que permite detectar a histoplasmose em diferentes formas clínicas. Entretanto, sua aplicação ainda não substitui testes tradicionais como o exame direto e a cultura, pois não existem ensaios diagnósticos aprovados pela *Food and Drug Administration* ou nenhum outro órgão de padronização (AZAR; HAGE, 2017a; GOMEZ, 2014).

Vários protocolos de *Reação em Cadeia de Polimerase* (PCR) foram descritos para a detecção de DNA de *H. capsulatum* em espécimes clínicos, incluindo amostras respiratórias, biópsias frescas e sangue total (BUITRAGO et al., 2013; GAGO et al., 2014; MURAOSA et al., 2016). Estudos têm demonstrado sensibilidade variando de 33 a 100% e especificidade superior a 90%, quando comparado com a cultura (AZAR; HAGE, 2017a) (Quadro 3).

Para a obtenção de boa sensibilidade e especificidade, a escolha do método e a seleção das regiões alvo deve ser criteriosa a fim de se evitar reações cruzadas (MURAOSA et al., 2016). Como exemplos das técnicas empregadas temos PCR simples, *Nested PCR* e *Real Time PCR*, com algumas pesquisas demonstrando positividade mesmo em amostras com baixas concentrações de DNA (BUITRAGO et al. 2013; FALCI et al., 2017; GOMEZ et al., 2014). No quadro 3 são descritos alguns métodos moleculares e seus respectivos alvos desenvolvidos para a detecção de *H. capsulatum* diretamente de espécimes clínicos.

Quadro 3. Métodos moleculares para a detecção de *H. capsulatum* diretamente de espécimes clínicos.

Método Molecular	Região alvo para <i>H. capsulatum</i>	Nº de amostras clínicas	Espécimes clínico (n)	Teste comparativo	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Nested PCR (31)	<i>Locus</i> do gene hcp100	40	MO (11), biópsia hepática (9), AB (6), LBA (4), nódulo linfático (2), biópsia intestinal (2), sangue (2), FCE (2), soro (2)	Cultura	100	100
PCR-EIA (34)	Sequência de genes específica para HC (99pb)	76	Urina (76)	Cultura	80	100
PCR Real-time (30)	Região de 192pb do gene GAPDH	797	Lavagens brônquicas (346), LBA (212), líquido pleural (157), secreções traqueais (35), tecido (14), escarro (13), lavagens pulmonares (6), sangue (4), medula óssea (5), fluido peritoneal (3), outros fluidos corporais (2)	Cultura	73	100
PCR (35)	rRNA	33	Sangue	Cultura	100	100
PCR Real-time (33)	<i>ITS</i>	348	Medula óssea (108), FCE (55), sangue (48), LBA (43), biópsia intestinal (31), biópsia hepática (30), linfonodos (25), biópsia cutânea (8)	Cultura	96	96

Fonte: AZAR; HAGE, 2017a, com adaptações.

Legenda:

EIA: imunoenensaio enzimático; MO: medula óssea / AB: aspirado brônquico / LBA: lavado bronco-alveolar / LCR: cefalorraquidiano.

A validação de métodos moleculares configura-se como novo desafio a ser enfrentado no diagnóstico da histoplasmose. A difusão dessas técnicas é um importante fator a ser observado, pois apenas alguns laboratórios em países endêmicos podem estar equipados e preparados para realizar corretamente tais metodologias. Entretanto, a possibilidade de um diagnóstico precoce, melhorando os índices de sucesso terapêutico, justifica a busca por esses novos métodos.

2.7 Tratamento da histoplasmose

A escolha do esquema terapêutico para histoplasmose deve ser orientada pela gravidade das manifestações clínicas. Dentre o arsenal antifúngico disponível, a anfotericina B continua sendo a droga recomendada para indivíduos com doença disseminada grave, apesar do seu potencial de toxicidade para o hospedeiro. O itraconazol é indicado nos casos menos graves, na manutenção do tratamento antifúngico pós-anfotericina B ou na profilaxia (GOUGHENOUR; RAPPLEYE et al., 2016; WHEAT et al., 2007). O fluconazol, menos eficaz que o itraconazol, pode ser utilizado como tratamento de segunda linha, em pacientes

com histoplasmose no sistema nervoso e em doentes intolerantes a itraconazol. O posaconazol e o voriconazol são considerados tratamentos de segunda escolha para a histoplasmose não disseminada severa (WHEAT et al., 2007). Quanto à caspofungina, não existe evidência clínica sobre sua recomendação para o tratamento da histoplasmose (WHEAT et al., 2007).

Nos casos disseminados da doença, o tratamento é sempre recomendado uma vez que a enfermidade geralmente é fatal se não tratada (WHEAT et al., 2016). Esse tratamento é dividido em 2 fases: fase de indução e fase de manutenção. A terapia na fase de indução é direcionada ao controle das manifestações clínicas da doença e a fase de manutenção destina-se a prevenir recaídas.

As indicações para o tratamento da histoplasmose, segundo as últimas diretrizes da Sociedade Americana de Doença Infecciosas (IDSA) e Ministério da Saúde, encontram-se bem definidas (Quadro 4) com base na classificação das formas clínicas da doença em leve a moderada ou moderada a grave (BRASIL, 2017a; WHEAT et al., 2007).

Quadro 4. Esquema terapêutico da histoplasmose.

FORMA MODERADA A GRAVE: presença de sinais indicativos de doença disseminada, tais como: pancitopenia e instabilidade clínica, bem como comprometimento do SNC, disfunções orgânicas, incluindo insuficiência respiratória.

1. Tratamento inicial (pelo menos duas semanas): anfotericina B lipossomal 3mg/kg/dia ou anfotericina B desoxicolato 0,7mg a 1mg/kg/dia por pelo menos duas semanas ou até melhora clínica. Em pacientes com meningite confirmada, a anfotericina B lipossomal deverá ser administrada na dose de 5mg/kg/dia, por 4-6 semanas.

2. Consolidação (por pelo menos 12 meses): itraconazol 200mg duas vezes ao dia. Após 12 meses de consolidação, deve-se considerar mudança para a fase de manutenção (profilaxia secundária) em pacientes com cura clínica e sem sinais radiológicos e sorológicos de doença ativa.

3. Manutenção: itraconazol 200mg/dia. Considerar a suspensão após o período mínimo de um ano de tratamento de manutenção, ausência de sintomas e $LT-CD4^+ >150$ céls/mm³ por mais de seis meses.

FORMA LEVE A MODERADA (NÃO MENÍNGEA):

1. Tratamento inicial (até melhora clínica): itraconazol 200mg três vezes ao dia;

2. Consolidação (por pelo menos 12 meses): itraconazol 200mg duas vezes ao dia;

3. Manutenção: itraconazol 200mg/dia. Considerar a suspensão após um período mínimo de um ano de tratamento de manutenção, ausência de sintomas e $LT-CD4^+$ acima de 150 céls/mm³ por mais de seis meses.

Nos casos de formas leves a moderadas, o fluconazol pode ser considerado uma alternativa para tratamento inicial e/ou consolidação, devendo ser administrado em dose de 600mg/dia inicialmente e 400mg/dia após melhora clínica.

Fonte: BRASIL, 2017 (Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos); WHEAT et al., 2007.

Apesar das drogas disponíveis geralmente proporcionarem resultados favoráveis, já foram relatadas infecções refratárias e recaídas (WHEAT et al., 2006; WHEAT et al., 2009). A maioria das falhas com anfotericina B e itraconazol é causada pela terapia inadequada, baixa adesão ou terapia retardada, e não pela maior tolerância do fungo à droga. Entretanto, a falha do tratamento associada à tolerância fúngica à droga já foi relatada para fluconazol (GOUGHENOUR; BALADA-LLASAT; RAPPLEYE, 2015; WHEAT et al., 2006; WHEAT et al., 2009).

2.8 Sensibilidade antifúngica *in vitro* e estabelecimento de pontos de corte

Dentre as metodologias disponíveis para a avaliação da sensibilidade antifúngica, o método de microdiluição é o padrão-ouro para a análise da sensibilidade antimicrobiana. Este método avalia o crescimento *in vitro* de fungos sob diferentes concentrações de drogas, de modo a determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da droga contra um micro-organismo (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2015; JOHNSON, 2008).

Duas organizações, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), têm padronizado a realização dos testes, preparação dos agentes antifúngicos, interpretação dos resultados e implementação do controle de qualidade; o que garante a reprodutibilidade dos resultados e permite uma análise interlaboratorial (ESPINEL-INGROFF; PFALLER, 2007; CLSI, 2017a,b; EUCAST, 2017). As diferenças entre as metodologias de microdiluição em caldo empregadas por CLSI e EUCAST estão relacionadas, principalmente, à concentração do inóculo, tempo de incubação e composição do meio de cultura; entretanto, os resultados obtidos por ambos os métodos são comparáveis entre si (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2015).

O CLSI, anteriormente conhecido como *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), publicou o documento M27A “Método de Referência para Testes de Sensibilidade Antifúngica por Diluição do Caldo para Leveduras” em 1997 e, desde então, ocorreram várias atualizações, sendo, a quarta edição, aprovada em 2017 (CLSI, 2017a). Para os fungos filamentosos, o primeiro documento disponibilizado foi publicado em 2002 e denominado M38A “Método de Referência para Testes de Sensibilidade Antifúngica por Diluição do Caldo para Fungos Filamentosos”, com a terceira edição também publicada recentemente, em 2017 (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2015; CLSI, 2017b; JOHNSON, 2008).

O EUCAST, em 1997, formou um subcomitê de testes de sensibilidade antifúngica que, em 2008, publicou um padrão de teste de sensibilidade para fungos filamentosos o “Método de Diluição em Caldo para a Determinação de Concentrações Inibitórias Mínimas de Agentes Antifúngicos para Fungos Filamentosos Formadores de Conídios” e outro padrão para leveduras o “Método de Diluição em Caldo para a Determinação de Concentrações Inibitórias Mínimas de Agentes Antifúngicos para Leveduras”, que foram atualizados 2017 (EUCAST, 2017).

Esses comitês estabelecem, para algumas drogas frente a alguns fungos, a correlação entre os dados *in vitro* e a resposta terapêutica dos pacientes, determinando assim pontos de cortes clínicos (*breakpoints*), que caracterizam os isolados em (i) sensíveis (quando os isolados são inibidos pelos agentes antimicrobianos, possibilitando maior chance de sucesso terapêutico); (ii) resistentes (quando os isolados não são inibidos pelos agentes antimicrobianos), e (iii) intermediários (quando os isolados podem ser inibidos a depender da concentração, do sítio de infecção e das vias de eliminação da droga) (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2015; CLSI, 2008b). Todavia, vale destacar que nem sempre os dados obtidos de testes *in vitro* refletem resultados observados *in vivo*. Nesse sentido, a "regra 90-60" prediz que 90% dos isolados sensíveis *in vitro*, são responsivos ao tratamento, enquanto, 60% dos isolados resistentes *in vitro*, são também responsivos à terapia (REX; PFALLER, 2002).

No tocante aos testes de sensibilidade com o fungo dimórfico *H. capsulatum*, esses comitês ainda não estabeleceram uma padronização global dos métodos de microdiluição. Em contrapartida, alguns estudos têm adaptado os procedimentos dos documentos M38 e M27, preconizados pelo CLSI, para a determinação da sensibilidade *in vitro* de *H. capsulatum* (BRILHANTE et al., 2010; BRILHANTE et al., 2012b; GOUGHENOUR; BALADALLASAT; RAPPLEYE, 2015; KATHURIA et al., 2014).

Estudos de sensibilidade *in vitro* demonstram que anfotericina B e itraconazol possuem baixos valores de CIM contra isolados do gênero *Histoplasma* (BRILHANTE et al., 2012b). Ademais, há relatos que fluconazol apresenta CIMs significativamente mais baixas contra cepas isoladas de doentes responsivos à terapêutica com fluconazol do que contra cepas isoladas de pacientes que recidivaram após tratamento (WHEAT et al., 2009).

As avaliações supracitadas demonstram a aplicabilidade do teste de microdiluição *in vitro* para fornecer informações sobre a sensibilidade antifúngica. Vale ressaltar que não se conhece a correlação entre a atividade antifúngica *in vitro* e a eficácia clínica de antifúngicos contra *H. capsulatum* (WHEAT et al., 2009) e que estes dados são de difícil obtenção,

especialmente, a correlação entre o tratamento e o desfecho clínico, uma vez que a maioria dos pacientes com histoplasmosose apresentam comorbidades (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2015).

Essa dificuldade em determinar o desfecho clínico e a letalidade associada a infecções fúngicas em indivíduos com doenças subjacentes dificulta o estabelecimento de pontos de corte clínicos para drogas contra muitas espécies de fungos, pois esses e outros fatores são levados em consideração pelos Comitês (Quadro 5). Adicionalmente, o estabelecimento desses pontos de corte representa altos custos para realização de ensaios clínicos (LOCKHART; GHANNOUM; ALEXANDER, 2017).

Quadro 5. Requisitos para estabelecimento de pontos de corte.

Pontos de corte clínico	Pontos de corte epidemiológico
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Classifica as cepas em sensível, intermediária ou resistente 1. Distribuição de frequência de valores de CIM 2. Dados farmacocinéticos / farmacodinâmicos 3. Acompanhamento do tratamento clínico 4. Análise da resposta terapêutica 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Classifica as cepas como do tipo selvagem e não-selvagem 1. Distribuição de frequência de valores de CIM de no mínimo 100 isolados 2. Dados de CIM de pelo menos 3 laboratórios diferentes

Fonte: LOCKHART; GHANNOUM; ALEXANDER, 2017; ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2015.

Diante desses entraves, nos últimos anos, centros de pesquisas têm investido na determinação de pontos de corte epidemiológico, tendo em vista que esses parâmetros são mais simples de serem gerados (Quadro 5). A definição de ponto corte epidemiológico é a CIM que separa uma população em isolados sem e com expressão de resistência, selvagens e não-selvagens, respectivamente. Dessa forma, quando a CIM de um determinado antifúngico é inferior ou igual ao ECV, os isolados são classificados como do tipo selvagem. Por outro lado, quando a CIM de um determinado antifúngico é superior ao ECV, os isolados são classificados como do tipo não selvagem (ESPINEL-INGROFF; TURNIDGE, 2016).

Os valores de pontos de corte epidemiológico, ECV para CLSI ou ECOFF para EUCAST, podem ser calculados contra qualquer espécie de fungo com base na distribuição de frequência dos valores de CIM dos antifúngicos. Para tanto, devem ser realizados testes de sensibilidade *in vitro* com, no mínimo, 100 isolados (LOCKHART; GHANNOUM;

ALEXANDER, 2017).

Artigos científicos já têm proposto ECV de antifúngicos contra diferentes espécies de leveduras e fungos filamentosos (CARFACHIA et al., 2015; ESPINEL-INGROFF et al., 2011; ESPINEL-INGROFF et al., 2014; ESPINEL-INGROFF et al., 2015a; ESPINEL-INGROFF et al., 2015b; FERRARA et al., 2017; LOCKHART; GHANNOUM; ALEXANDER, 2017) e, recentemente, contra o fungo dimórfico *Sporothrix* spp. (ALMEIDA-PAES et al., 2017; ESPINEL-INGROFF et al., 2017). Nessa mesma perspectiva, o CLSI divulgou documentos padronizando o uso e a interpretação de ECV para a comunidade científica para algumas leveduras e fungos filamentosos (CLSI, 2016a,b).

Embora os ECVs não prevejam a resposta à terapia antifúngica, são úteis para monitorar a expressão de mecanismos de resistência, portanto, a emergência de resistência a drogas. Além disso, também permitem comparar a sensibilidade antifúngica de uma espécie de fungo a uma dada droga ao longo do tempo, possibilitando a compreensão do comportamento epidemiológico de micro-organismos, especialmente em resposta a pressões seletivas ambientais (LOCKHART; GHANNOUM; ALEXANDER, 2017). Para isolados de *H. capsulatum*, a tentativa de determinar pontos de corte epidemiológicos poderia fornecer diretrizes para o tratamento da histoplasmose, especialmente para os pacientes que usam drogas antifúngicas por longos períodos.

Diante das informações expostas na revisão de literatura, considerando que a histoplasmose é uma doença de distribuição mundial, que possui relevância nos pacientes com HIV/aids e é emergente no estado do Ceará, são necessários estudos para continuar o acompanhamento do perfil epidemiológico no estado, assim como desenvolver ferramentas para o diagnóstico precoce com vistas a melhorar o prognóstico da doença. Ademais, pesquisas com o objetivo de caracterizar os isolados de *H. capsulatum* do Ceará são importantes, uma vez que estudos de sensibilidade antifúngica têm sido realizados ao longo dos anos, entretanto ainda não foram estabelecidos parâmetros/pontos de corte para o monitoramento desta sensibilidade, assim como são escassos os dados sobre a virulência de isolados de *H. capsulatum* circulantes na região.

Hipótesis científicas

3 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

- O adoecimento por histoplasmose dos pacientes com HIV/aids no Ceará segue padrões clínicos, epidemiológicos e laboratoriais semelhantes àqueles previamente relatados na literatura;
- O regulador transcricional da transição dimórfica *RYP1* pode ser utilizado como região alvo para o diagnóstico de histoplasmose disseminada;
- Isolados de *H. capsulatum* provenientes de indivíduos com aids/histoplasmose são classificados como do tipo selvagem com base no ponto de corte epidemiológico (ECV) frente à anfotericina B, itraconazol, fluconazol, voriconazol e caspofungina;
- Isolados de *H. capsulatum* provenientes de indivíduos com aids/histoplasmose formam biofilme *in vitro* na forma filamentosa.

Objetivos

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar os aspectos epidemiológicos da histoplasmose em pacientes com aids no estado do Ceará (2011-2015) e analisar o gene *RYP1* como alvo para o diagnóstico molecular da histoplasmose, bem como, estabelecer pontos de corte epidemiológico para os antifúngicos clássicos e caracterizar o biofilme de *H. capsulatum* var. *capsulatum* na forma filamentosa.

4.2 Objetivos específicos

- Analisar os aspectos epidemiológicos dos casos de histoplasmose disseminada em pacientes com aids, no período de 2011 a 2015, no estado do Ceará, enfatizando a busca por características clínico-laboratoriais mais relacionadas a um pior prognóstico (recidiva e óbito);
- Detectar o gene *RYP1* em cepas clínicas de *H. capsulatum* var. *capsulatum* e validar o seu uso como alvo para o diagnóstico molecular da histoplasmose disseminada a partir de espécimes clínicos;
- Determinar o perfil de sensibilidade *in vitro* de células planctônicas de *H. capsulatum* var. *capsulatum* na forma filamentosa e leveduriforme frente aos antifúngicos anfotericina B, voriconazol, itraconazol, fluconazol e caspofungina;
- Estabelecer os valores de pontos de corte epidemiológico (ECV) para anfotericina B, itraconazol, fluconazol, voriconazol e caspofungina contra cepas de *H. capsulatum* var. *capsulatum* na forma filamentosa;
- Caracterizar a capacidade de formação de biofilme *in vitro* de cepas de *H. capsulatum* var. *capsulatum* na forma filamentosa.

Materialis e Métodos

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Descrição do estudo

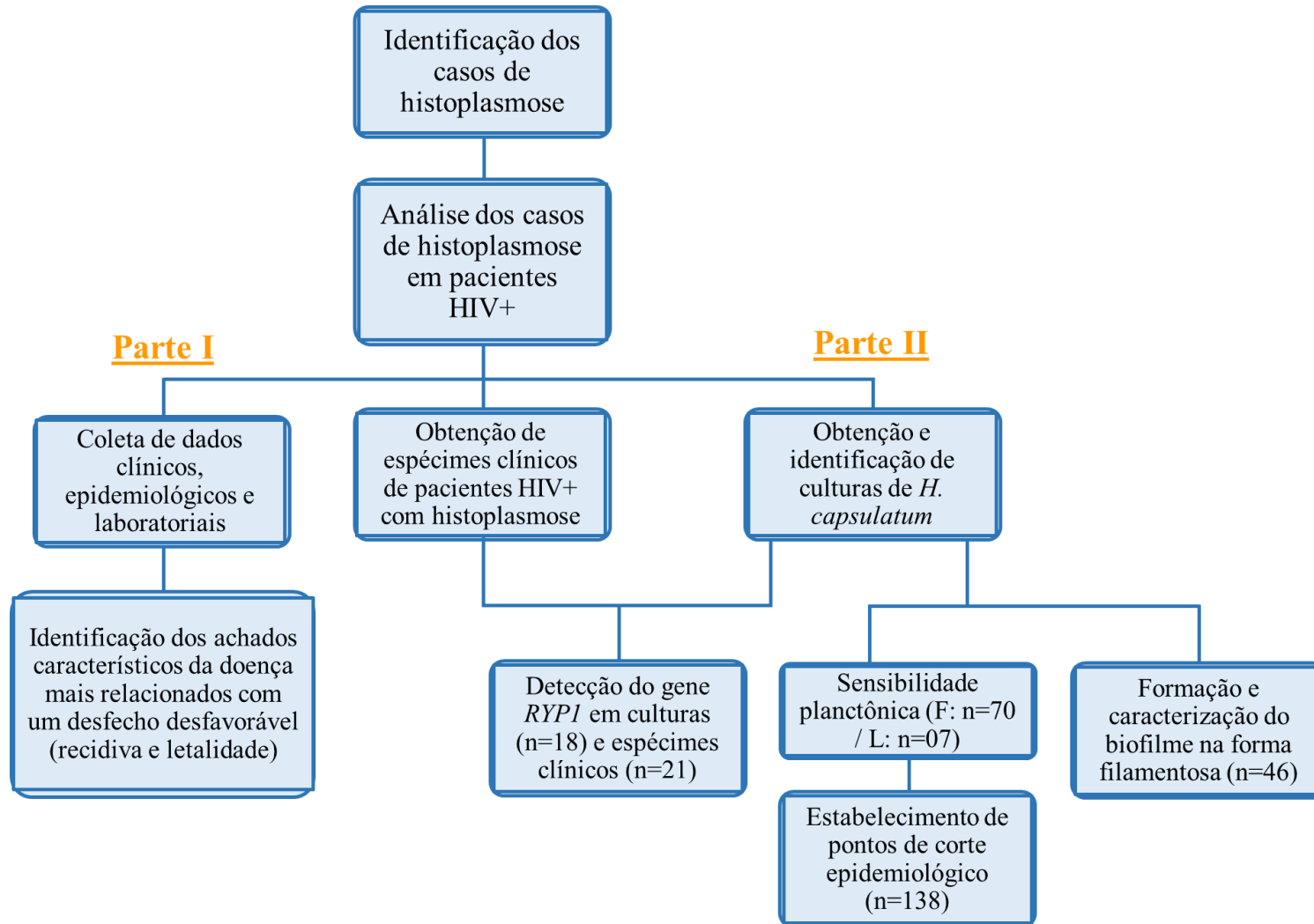
A pesquisa foi realizada em duas etapas. Inicialmente foi feito um estudo retrospectivo dos casos de histoplasmose, em pacientes com aids, durante o período de 5 anos (2011 a 2015). As informações foram obtidas no Hospital São José de Doenças Infecciosas (HSJ), que é referência para doenças infecciosas no Ceará, onde são acompanhados 80-85% da população com HIV/aids do estado.

Posteriormente, na segunda parte do estudo, os isolados fúngicos foram encaminhados para o Centro Especializado em Microbiologia Médica (CEMM), setor de referência para o diagnóstico de fungos patogênicos no Ceará, onde foram realizados estudos de caracterização molecular e fenotípica, incluindo a análise de método diagnóstico, avaliação da sensibilidade antifúngica e formação de biofilme *in vitro*.

Todos os procedimentos envolvendo a manipulação laboratorial das cepas foram realizados em cabine de segurança biológica classe II em laboratório de biossegurança nível 3 (NB-3).

Com intuito de facilitar o entendimento acerca do trabalho, foi elaborado o fluxograma exposto abaixo (Figura 6).

Figura 6. Fluxograma de desenvolvimento da tese.



Fonte: Própria autora

Legenda: F: Forma filamentosa; L: Forma de levedura

5.2 Parte I: Caracterização dos aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais da histoplasmose

5.2.1 Comitê de ética

O protocolo deste estudo foi revisado em 26 de maio de 2015 e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HSJ sob o número 029/2007 (Anexo A), segundo os requisitos da resolução CNS 466/12 e suas complementares que regulamentam a pesquisa em seres humanos. Como foram estudados prontuários médicos, não foi necessário o consentimento verbal ou por escrito do paciente ou responsável. Foi mantido total sigilo acerca dos dados.

5.2.2 População do estudo

Foram incluídos neste estudo 211 pacientes com aids, conforme os critérios de definição de caso de aids em adultos e crianças, elaborado pelo Ministério da Saúde (2004), que foram atendidos no HSJ e tiveram diagnóstico de histoplasmose disseminada, mediante confirmação por visualização do fungo em esfregaço de medula óssea e/ou creme leucocitário e/ou isolamento fúngico a partir dos espécimes clínicos.

Foram excluídos da pesquisa todos os casos de pacientes com infecção pelo HIV, que deram entrada no HSJ, que obtiveram diagnóstico de histoplasmose baseado apenas nos aspectos clínicos, laboratoriais e/ou radiológicos, sem resultados de cultura ou pesquisa. Ademais, excluíram-se os pacientes que não possuíam prontuário arquivado no referido hospital.

5.2.3 Coleta de dados

A primeira etapa da coleta de dados foi realizada com os registros do laboratório do HSJ, onde foram obtidos os prontuários de pacientes que possuíam o resultado do exame micológico positivo (pesquisa direta e/ou cultura). Também foram consultados os livros de registro de altas e óbitos do Serviço de Arquivos Médicos e Estatísticas (SAME) para a identificação dos pacientes que apresentaram diagnóstico de histoplasmose.

A segunda etapa foi a revisão dos prontuários arquivados no SAME, onde foram coletadas informações utilizando um questionário pré-estruturado com as variáveis do estudo (Apêndice A).

5.2.4 Variáveis analisadas

As variáveis analisadas no estudo foram as seguintes:

- **Dados sócio demográficos:** sexo, data de nascimento, procedência;
- **Epidemiologia do HIV:** período do diagnóstico da aids, uso de terapia anti-retroviral, contagem de CD4⁺ e carga viral;
- **Dados clínicos:** sintomatologia, doenças associadas, co-infecções, achados radiográficos, recidiva e desfecho da doença;
- **Dados laboratoriais:** dosagem de hemoglobina, leucograma, número de plaquetas, dosagem de enzimas hepáticas (alanina aminotransferase – ALT e aspartato aminotransferase - AST), lactato desidrogenase (LDH), uréia e creatinina;
- **Diagnóstico:** resultados de pesquisa e/ou cultura para fungos;
- **Tratamento:** drogas antifúngicas utilizadas pelos pacientes.

5.2.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o *software GraphPad Prism 7.0* (GraphPad, software, San Diego, CE, EUA). Foi calculada a Razão de Chance (ODDS Ratio) para mortalidade e recidiva, sendo utilizado um nível de confiança de 95%. Os resultados com significância estatística foram aqueles que apresentaram $P < 0,05$.

5.3 Parte II: Caracterização laboratorial de *Histoplasma capsulatum*

5.3.1 Identificação molecular de *H. capsulatum* em cultura e detecção fúngica em espécimes clínicos

5.3.1.1 Micro-organismos e espécimes clínicos

Foram avaliadas um total de 18 cepas de *H. capsulatum* var. *capsulatum* pertencentes à micoteca do CEMM, na Universidade Federal do Ceará (UFC). Nesta fase, utilizaram-se como controle outros micro-organismos, tais como *Paracoccidioides brasiliensis* (n=2), *Coccidioides posadasii* (n=1), *Sporothrix schenckii* (n=1) e *Candida albicans* (n=1).

Adicionalmente, foram incluídas no estudo 15 amostras sanguíneas oriundas de

pacientes com histoplasmose disseminada, confirmada através de exame direto e/ou cultura. Para esses testes, foram usadas ainda, amostras de sangue de indivíduos saudáveis (n=5) e de paciente com coccidiomicose (n=1) como controle negativo.

5.3.1.2 Extração do DNA para PCR

Para extração do DNA, 350 µL do inóculo de cada micro-organismo ou sangue foi transferido para microtubos contendo *beads* e 350 µL do detergente catiônico Brometo de Cetil Trimetil Amônio (*Cetyl Trimethylammonium Bromide* – CTAB), posteriormente, foram colocados no equipamento *Precellys* durante três ciclos de 30 s a 6000 rpm. O complexo ácido nucleico/CTAB foi separado das proteínas desnaturadas, polissacarídeos e detritos celulares por exposição ao clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Em seguida, a precipitação de ácidos nucleicos foi realizada utilizando álcool isopropílico a 100%, com a remoção do CTAB por lavagem em etanol a 70% (TALBOT, 2001). Finalmente, o precipitado de DNA foi exposto brevemente à temperatura de 35 °C por 10 minutos para secagem e ressuspensão em tampão de eluição. As amostras de DNA foram mantidas congeladas a -20 °C até o momento do uso.

5.3.1.3 Ensaio de PCR

Para a amplificação do gene *RYP1* foram utilizados os *primers* OAS1057 (5'-ACCCTTGCAGCTTACAACCT-3') e OAS1058 (5'-TCCGTCCATCGCTTAATACC-3') (NGUYEN; SIL, 2008). A reação de PCR para a detecção do gene *RYP1* em 18 cepas clínicas de *H. capsulatum*, bem como nas cepas controles de *P. brasiliensis*, *C. posadasii*, *S. schenckii* e *C. albicans* foi realizada utilizando amostras de DNA a uma concentração de 100 ng/µL. Um volume de 3 µL de cada amostra de DNA foi adicionado a 22 µL de mistura contendo: tampão de reação 2,5X (Promega, EUA), 1 mM de MgCl₂ (Promega, EUA), 2 pmol/µL de cada OAS1057 e OAS1058 (Invitrogen, EUA), 0,2 mM de cada desoxirribonucleotideo (Thermo Scientific) e 0,2 U/µL de polimerase *Go Hot Start Taq* (Promega, EUA), resultando em um volume final de 25 µL (BRILHANTE et al., 2012a).

Os parâmetros de PCR incluíam desnaturação inicial a 95 °C durante 2 min, seguida de 10 ciclos de desnaturação a 95 °C, durante 1 min, anelamento a 58 °C, durante 45 s, e extensão a 72 °C, por 1 min; 10 ciclos de desnaturação a 95 °C, durante 1 min, anelamento a 55 °C, durante 45 s, e extensão a 72 °C, durante 1 min; 15 ciclos de desnaturação a 95 °C,

durante 1 min, anelamento a 53 °C, durante 45 s, e extensão a 72 °C, durante 1 min. Finalmente, um ciclo final a 72 °C durante 7 min. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando o corante fluorescente *Blue Green (Loading Dye)*, e visualizados em um transluminador UV. Os *amplicons* de 300 pb foram específicos para o gene *RYP1* (NGUYEN; SIL, 2008).

Adicionalmente, os iniciadores panfúngicos ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3 ') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATG-3 ') foram utilizados como controle interno de PCR em espécimes clínicos para se verificar a presença de DNA fúngico, seguindo as mesmas proporções de reagentes citadas anteriormente, nas seguintes condições: desnaturação inicial uma vez a 95 °C durante 5 min, seguido de 30 ciclos a 95 °C durante 20 s, anelamento a 56 °C por 15 s e extensão a 72 °C por 65 s, e um ciclo final a 72 °C durante 5 min (ELIÁS et al., 2012). Foram visualizados amplicons de 600 pb, em gel de agarose a 1%, com o fluoróforo, conforme descrito acima.

5.3.1.4 Estabelecimento do limite de detecção

Para avaliar o limite de detecção, dois inóculos de aproximadamente 5×10^7 ufc/mL foram preparados com *H. capsulatum* na forma de levedura em água MilliQ (Merck-Millipore, Alemanha). Os microtubos foram centrifugados e o sedimento celular de um tubo foi ressuspenso em 220 µL de tampão TLB (Qiagen, Alemanha), enquanto o sedimento do outro tubo foi ressuspenso no mesmo volume de sangue humano de um indivíduo saudável. Posteriormente, cada amostra foi diluída com o seu diluente inicial na proporção de 1:10, até atingir uma concentração fúngica de aproximadamente 2,5 ufc/mL. Além disso, foram incluídos dois controles negativos (tampão TLB e amostra de sangue de um indivíduo saudável sem fungos) e um controle positivo (DNA fúngico de cultura testado anteriormente) (BRILHANTE et al., 2012a). Os controles e amostras foram submetidos aos procedimentos de PCR descritos no tópico 5.3.1.3.

5.3.2 Sensibilidade a antifúngicos e determinação do ponto de corte epidemiológico antifúngico contra *H. capsulatum*

5.3.2.1 Micro-organismos e inóculo

A sensibilidade das cepas de *H. capsulatum* foi avaliada por meio do método de

microdiluição em caldo, conforme descrito nos protocolos M27-A3 e M38-A2 padronizado pelo CLSI (CLSI, 2008a,b), seguindo as adaptações utilizadas por Brilhante et al. (2010). Para o procedimento, 70 cepas de *H. capsulatum* na fase filamentosa foram cultivadas em BHI ágar e incubadas por 7 dias a 28 °C. Para fase leveduriforme, foram utilizadas 07 cepas semeadas em ágar BHI suplementado com 5% de sangue de carneiro e incubadas por 5 dias a 37 °C. Os inóculos foram preparados em solução salina fisiológica (0,9%) estéril e ajustados na escala 0,5 de McFarland, que por espectrofotometria a 530 nm corresponde a uma transmitância de 90-95%. Posteriormente, os inóculos foram diluídos na proporção de 1:10 em meio RPMI tamponado com ácido 3-(N-morfolina) propanossulfônico (MOPS 0,156M) a um pH 7,0, para obtenção de um inóculo com aproximadamente $0,5 \times 10^3$ e $2,5 \times 10^4$ ufc/mL (BRILHANTE et al., 2010).

5.3.2.2 Drogas antifúngicas

Foram preparadas soluções estoques de anfotericina, itraconazol, voriconazol e caspofungina na concentração de 1600 µg/mL e para fluconazol, na concentração de 6400 µg/mL. Essas soluções ficaram estocadas em -20 °C até o momento do uso. No dia do teste, as drogas foram diluídas com concentrações variando de 0,002 a 1 µg/mL para anfotericina B (Sigma, EUA) e voriconazol (Sigma, EUA); de 0,00012 a 0,0625 µg/mL para itraconazol (Sigma, EUA); de 0,25 a 128 µg/mL para fluconazol (Sigma, EUA) e de 0,031 a 16 µg/mL para caspofungina (Sigma, EUA) (BRILHANTE et al., 2012b). As concentrações para as cepas do controle de qualidade foram baseadas nas recomendações do CLSI (CLSI, 2008a).

5.3.2.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Após 7 dias de incubação a 35 °C para fase filamentosa e 4 dias a 37 °C para fase leveduriforme, a CIM foi obtida por leitura visual das placas (BRILHANTE et al., 2010). A CIM de anfotericina B foi considerada como a menor concentração da droga na qual nenhum crescimento fúngico foi observado. Para itraconazol, fluconazol, voriconazol e caspofungina (fase leveduriforme), a CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir 80% do crescimento fúngico, quando comparado ao controle de crescimento livre de drogas (BRILHANTE et al., 2012b). Quanto à fase filamentosa, para leitura da caspofungina, foi utilizada a definição de Concentração Efetiva Mínima (CEM), conforme recomendada pelo CLSI, que se refere à menor concentração que levou ao crescimento de formas de hifas

pequenas, arredondadas e compactas, em comparação com o crescimento de hifas visto no poço controle livre de drogas (CLSI 2008a). *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258 foram incluídas em todos os ensaios como controle de qualidade (CLSI, 2008a).

5.3.2.4 Análise de dados e determinação do ponto de corte epidemiológico (ECV)

Para determinar os ECVs dos antifúngicos, os valores de CIM de cada droga foram convertidos em valores log₂ e plotados como histogramas no programa GraphPad Prism (versão 7.0, EUA). Posteriormente, os ECVs foram calculados considerando a moda da CIM, a distribuição dos valores de CIM e os pressupostos de que populações do tipo selvagem devem abranger de três a cinco diluições em torno da moda e que pelo menos 95% da população deve ser classificada como do tipo selvagem (ESPINEL-INGROFF et al., 2014).

Dessa forma, os isolados contra os quais a CIM de um determinado fármaco antifúngico era inferior ou igual ao ECV foram classificados como do tipo selvagem; e aqueles contra os quais a CIM de um determinado fármaco antifúngico era superior ao ECV foram classificados como não-selvagem (ESPINEL-INGROFF; TURNIDGE, 2016).

5.3.3 Caracterização da formação do biofilme

5.3.3.1 Cinética de formação do biofilme

A formação de biofilme de *H. capsulatum* na fase filamentosa baseou-se na metodologia padronizada para outro fungo dimórfico, com algumas modificações (BRILHANTE et al., 2017a). Para caracterização da cinética, 4 cepas foram repicadas em BHI ágar e incubadas a 28 °C por 7 dias. Após esse período, os inóculos foram preparados em solução salina fisiológica (0,9%) e ajustados a uma concentração de 2,4 a 5,5 x 10⁶ células/mL. Posteriormente, 100 µL da solução foram adicionados aos poços de uma placa de fundo chato de 96 poços (TPP ®, Trasadingen, Suíça).

As placas foram incubadas a 28 °C, durante 24 h, para pré-adesão celular. Após esse período, o conteúdo de cada poço foi removido. Em seguida, 200 µL de três diferentes meios de cultura, RPMI 1640, ureia e YNB suplementados com 0,2% de glicose (PAIXÃO; SIDRIM; BRILHANTE, 2004) foram adicionados e as placas incubadas por até 10 dias a 28 °C para avaliarmos a melhor condição para maturação do biofilme (BRILHANTE et al., 2017a). O

meio de cultura sem adição de inóculo foi utilizado como controle negativo. Diariamente, foram realizadas avaliações da atividade metabólica com XTT e da biomassa formada com cristal violeta (CV) a 0,3%.

5.3.3.2 *Determinação da atividade metabólica do biofilme por ensaio de redução do XTT*

A atividade metabólica do biofilme foi quantificada por meio do ensaio de redução de XTT. Esse composto, quando em contato com seu catalisador (menadiona), é reduzido a formazam pelas desidrogenases mitocondriais, sendo sua atividade avaliada pela intensidade da cor observada após o tempo de incubação. Os biofilmes formados foram lavados com PBS acrescido de *Tween* 0,05% e então, foram adicionados 131 μL do mix de XTT [50 μL de PBS, 75 μL de XTT (1 mg/mL) e 6 μL de Menadiona (1 mM em acetona)] em cada poço. A leitura da reação colorimétrica foi realizada, após 3 h de incubação a 35 °C, em espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 492 nm (BRILHANTE et al., 2015).

5.3.3.3 *Quantificação da biomassa do biofilme por coloração com cristal violeta*

Adicionalmente, após a formação do biofilme, foi realizada a quantificação da biomassa do biofilme por meio da técnica de coloração com cristal violeta. Para tanto, as placas foram lavadas com PBS acrescido de *Tween* 0,05%, e, após secagem em temperatura ambiente, o material aderido aos poços foi fixado com 200 μL de metanol 99% durante 5 minutos. Posteriormente, os poços foram corados com 200 μL de cristal violeta (CV) 0,3% por 20 minutos. Depois de outra lavagem com PBS e da secagem dos poços, o CV restante foi ressolubilizado em 200 μL de ácido acético glacial a 33% (v/v). Por fim, o conteúdo dos poços teve sua densidade óptica (DO) mensurada por espectrofotometria a 630 nm (BRILHANTE et al., 2017b; CORDEIRO et al., 2015).

5.3.3.4 *Classificação da capacidade de formação de biofilme*

Após o estabelecimento da cinética de formação do biofilme e seleção do melhor meio de cultura, foi avaliada a capacidade de formação dos biofilmes de 46 cepas de *H. capsulatum* na forma filamentosa selecionadas aleatoriamente. Após a formação do biofilme e leitura com cristal violeta, conforme descrito nos itens 5.3.3.2 e 5.3.3.3, respectivamente, os valores de DO dos poços contendo apenas meio de cultura foram usados como controle negativo. Com

base nesses valores de DO do controle negativo, foi definido o valor de corte (DOc) para o teste, como sendo três desvios-padrão acima da média da DO observada no controle negativo. No final, as cepas foram classificadas como não formadoras ($DO \leq DOc$), fracas formadoras ($DOc < DO \leq 2 \times DOc$), formadora moderada ($2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$) ou fortes formadoras ($4 \times DOc < DO$) (BRILHANTE et al., 2017b). Foi incluída uma cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 como controle positivo e todos os experimentos foram realizados em triplicata.

5.3.3.5 Análise da arquitetura do biofilme de *H. capsulatum*

Para esta etapa do estudo, foram selecionadas, aleatoriamente, duas cepas forte formadoras para formar biofilmes em placas de fundo plano de 24 poços contendo lamínulas de Thermanox™. Foram utilizadas três técnicas microscópicas para avaliar os biofilmes: microscopia óptica após coloração com vermelho congo, confocal e eletrônica de varredura.

Microscopia óptica – A coloração do vermelho Congo foi utilizada para a visualização microscópica de biofilmes, uma vez que esta técnica permite a detecção de polissacarídeos que constituem a fração majoritária da matriz extracelular dos biofilmes. Para tanto, a superfície de cada lamínula de Thermanox™, em poços de placas de poliestireno após a formação de biofilmes maduros, foi coberta com 10 mM de cloreto de cetilpiridínio e deixada secar naturalmente à 37 °C por 30 minutos. Em seguida, os biofilmes foram corados com uma mistura 2:1 de solução aquosa saturada de vermelho Congo contendo 10% (v/v) de Tween 80 durante 15 minutos. Após a lavagem com PBS 1X, as lamínulas foram coradas com uma solução de 10% (v/v) de carbolfucsina de Ziehl, durante 6 minutos. As lamínulas foram lavadas novamente com PBS 1X e deixadas secar a 37 °C para serem examinadas em um microscópio Olympus BX41 e as imagens capturadas com uma câmera digital Olympus DP71 (CASTELO-BRANCO et al., 2016).

Microscopia de varredura laser confocal – Os biofilmes também foram analisados por microscopia confocal para a análise quantitativa do coeficiente de rugosidade, espessura, biomassa e relação superfície-volume. Após a formação em Thermanox™, foram lavados com PBS e corados com corante fluorescente LIVE/DEAD™ (Invitrogen, EUA) e Calcoflúor (Sigma, EUA). O corante LIVE/DEAD™ apresenta na sua composição o SYTO9 que identifica as células vivas e iodeto de propídio que identifica células mortas ou danificadas, que podem ser observadas nos comprimentos de onda 488 nm e 561 nm, respectivamente. Calcoflúor, por sua vez, se liga à quitina presente na parede fúngica, sendo detectada sua fluorescência no comprimento de onda de 405 nm. Para as análises foram avaliados 5 pontos

equidistantes do biofilme com microscópio Nikon C2 e as reconstruções tridimensionais dos biofilmes e mensuração do Z-slice foram obtidas pelo software ImageJ (BRILHANTE et al., 2017b; HEYDORN et al., 2000; COLLINS, 2007).

Microscopia eletrônica de varredura – Foi utilizada a microscopia eletrônica de varredura para análise da morfologia. Após a formação, os biofilmes foram fixados com 500 µl de solução de glutaraldeído 2,5% (Sigma - Aldrich - St Louis - EUA) em tampão cacodilato (0,15M) (Electron Microscopy Sciences –Hatfield - PA) e azul de alcian 0,1% (Sigma - Aldrich - São Paulo - Brasil), overnight a 4 °C, para preservar as estruturas fúngicas. Posteriormente, os biofilmes foram lavados com o tampão cacodilato por duas vezes e seguiu-se uma série de desidratações alcoólicas ascendente com 50, 70, 80, 95 e 100% de etanol, repetidas duas vezes cada. Após secagem, os biofilmes foram desidratados com hexametildisilazano (Sigma - St Louis - EUA) durante 30 minutos e colocados em estufa a 35 °C, overnight. As lamínulas contendo o biofilme formado foram recobertas com 10 nm de ouro (Emitech Q150T) e observadas em microscópio eletrônico de varredura Quanta FEG 450, em alto vácuo a 20 kV (BRILHANTE et al., 2017b).

Resultados

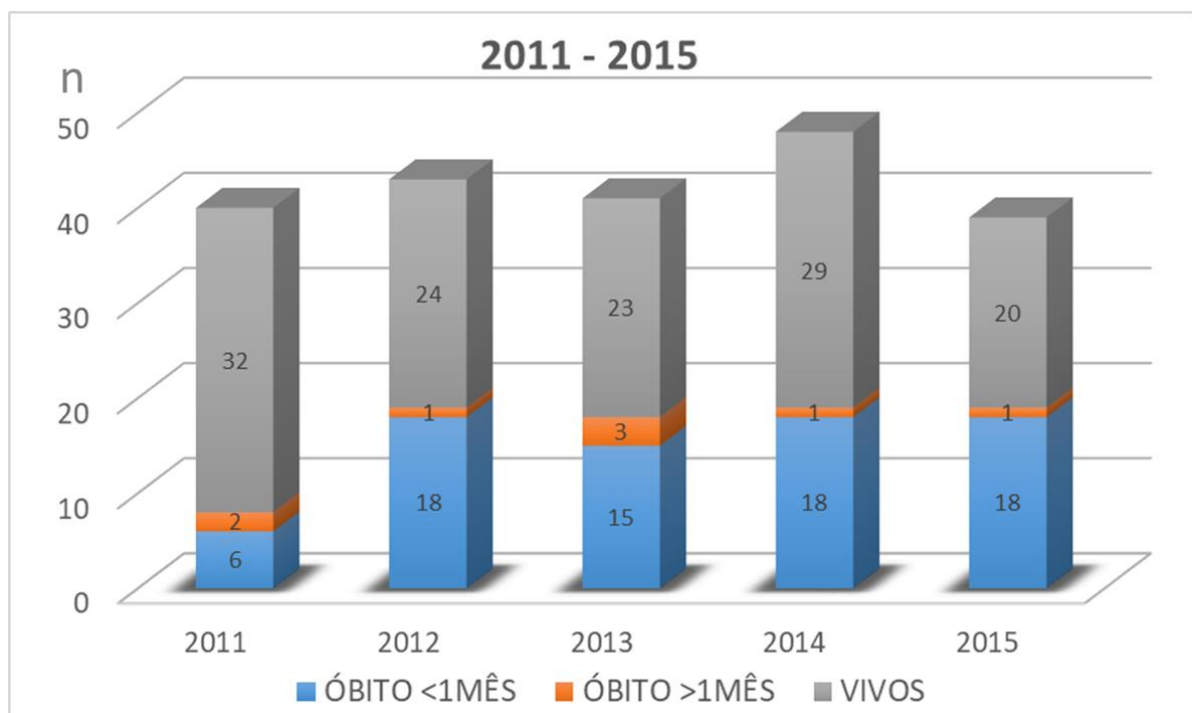
6. RESULTADOS

6.1 Parte I: Caracterização dos aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais da histoplasmose

Entre janeiro de 2011 e dezembro 2015, foram identificados 211 casos de histoplasmose em indivíduos HIV positivos, com média de 42,2 casos por ano (Figura 7). A taxa de letalidade observada nesses pacientes foi de 39,34% (83/211), sendo que 90,4% (75/83) dos óbitos ocorreram no primeiro mês de internação (Figura 7). A histoplasmose foi considerada a doença definidora de aids em 66,4% (140/211) dos indivíduos e cerca de 21,8% (46/211) fazia uso da terapia antirretroviral.

A população era composta, na sua maioria, por homens (77,3% - 163/211), enquanto que as mulheres representavam apenas 22,7% (48/211). Em relação à faixa etária, esta variou de 12 a 68 anos, com idade média de 35,5 anos para homens e 34,5 para mulheres. Os pacientes eram provenientes de Fortaleza (129/211), Região Metropolitana de Fortaleza (42/211) e interior do estado do Ceará (40/211).

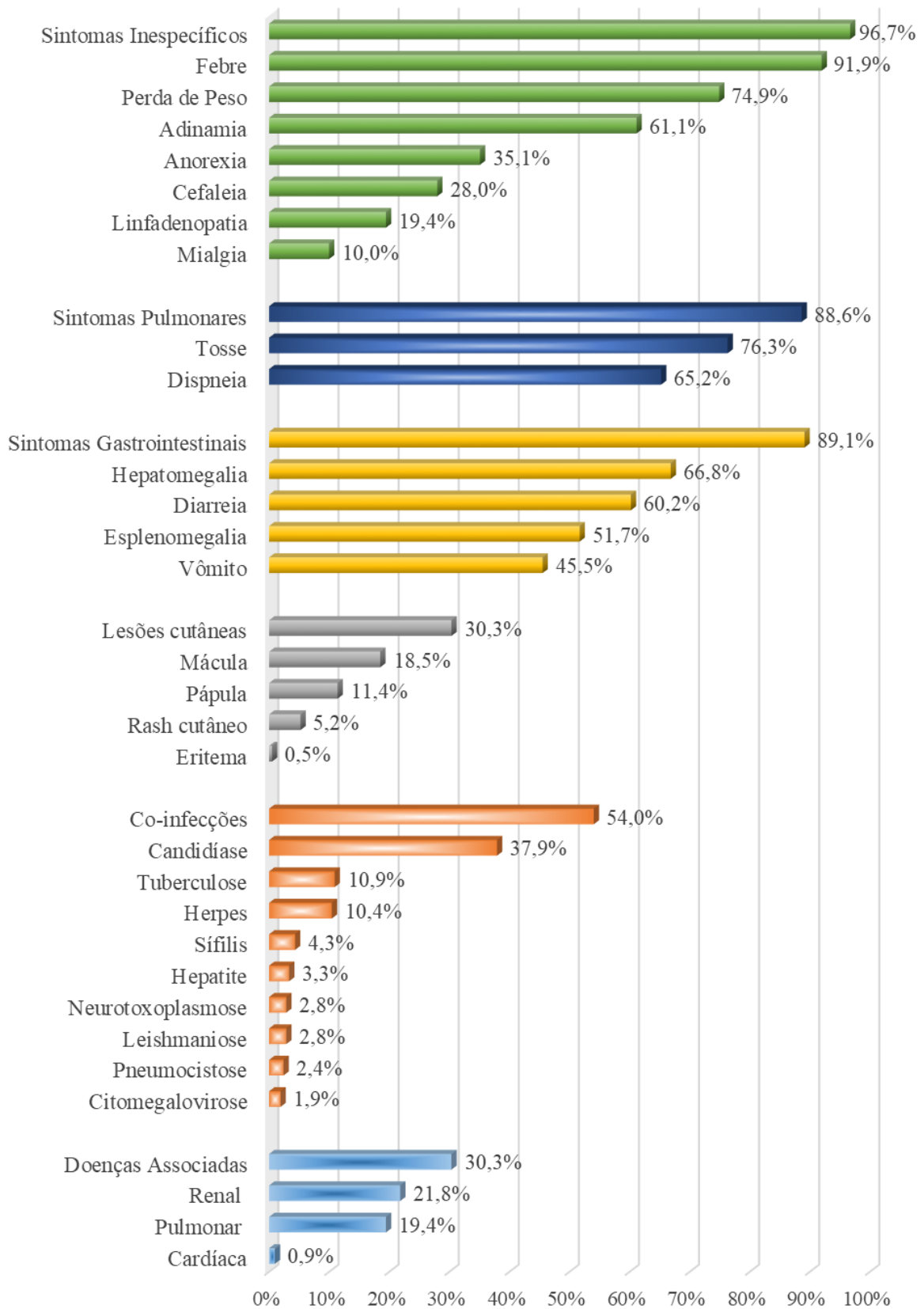
Figura 7. Número de casos e óbitos de pacientes com aids e histoplasmose no estado do Ceará de 2011 a 2015.



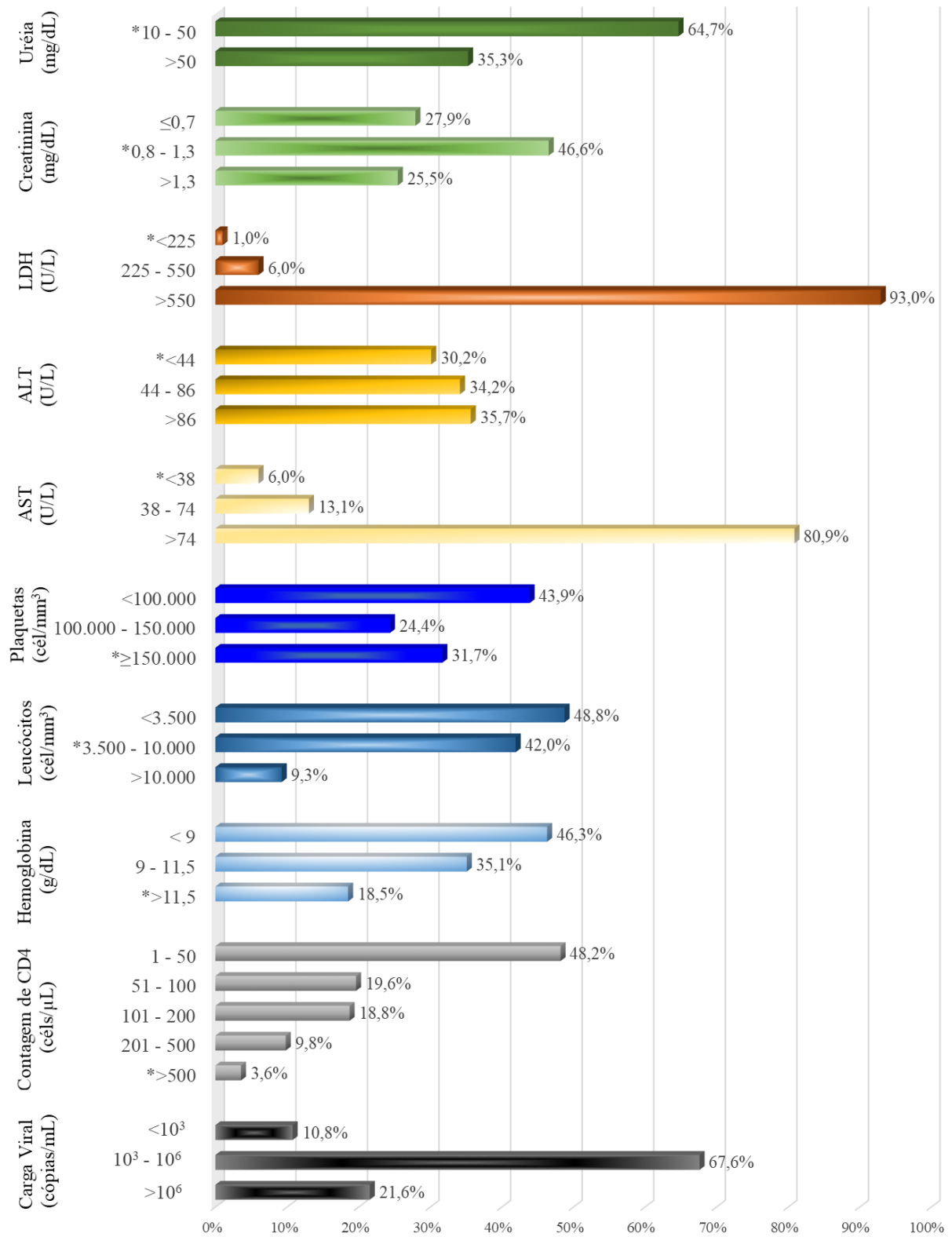
Quanto aos aspectos clínicos apresentados pelos pacientes na admissão, a maioria da população apresentava uma sintomatologia inespecífica com destaque para febre (91,9% - 194/211), perda de peso (74,9% - 158/211) e adinamia (61,1% - 129/211); seguidos ainda de sintomas gastrointestinais (89,1% - 188/211), pulmonares (88,6% - 187/211) e cutâneos (30,3% - 64/211). Quanto à presença de co-infecções com histoplasmose, 54% (114/211) dos indivíduos possuíam pelo menos uma coinfeção, com destaque para: candidíase (37,9% - 80/211), tuberculose (10,9% - 23/211), herpes (10,4% - 22/211). Trinta por cento apresentavam ainda doenças associadas, conforme demonstrado na Figura 8.

Em se tratando dos aspectos laboratoriais, as médias encontradas de CD4⁺ foram de 114,7 ±184,5 céls/μL; carga viral de 845.880,3 ± 2.409.498,7 cópias/mL; AST de 266,5 ±306,2 U/L; ALT de 82,4 ±69,1 U/L; hemoglobina de 9,2 ±2,7 g/dL; leucócitos de 4950,1 ±4628,7 céls/mm³; plaquetas de 144917,1 ±114797,8 céls/mm³; LDH de 3082,4 ±2960,8 U/L; creatinina de 1,3 ±1,6 mg/dL (Figura 9)

Figura 8. Aspectos clínicos dos pacientes com histoplasmose e aids.



Legenda: Características coletadas na admissão dos pacientes.

Figura 9. Aspectos laboratoriais dos pacientes com histoplasmose e aids.

Legenda:

*: Valores de referência adotados pelo hospital; AST: Aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase

Nos exames radiográficos, foi observado que os infiltrados intersticial (24,5% - 50/204), retículo-nodular (16,2% - 33/204) e derrame pleural (4,4% - 9/204) foram os achados mais frequentes, e 8,3% (17/204) dos indivíduos apresentaram radiografia normal.

O tempo médio de internamento foi cerca de 20 dias e utilizou-se para o diagnóstico apenas a pesquisa fúngica em 21,8% (33/151); apenas a cultura fúngica em 64,3% (135/210) e a pesquisa aliada à cultura em 28,7 % (43/150) dos casos. O tratamento foi administrado em 85,2% (178/209) dos indivíduos, sendo, a anfotericina B, a droga de primeira escolha. Em contrapartida, em 14,8% (31/209) dos pacientes, nenhuma terapia foi administrada.

Dos 211 pacientes do estudo, a recidiva da histoplasmose foi observada em 14,7% (31/211). Baseado na análise do *ODDS Ratio* algumas variáveis aumentaram a chance para o evento acontecer conforme demonstrado na Tabela 1. Os fatores mais relacionados com recidiva foram: a ocorrência da histoplasmose como definidora de aids ($p=0,013$), presença de hepatomegalia ($p=0,012$), esplenomegalia ($p=0,031$), doenças pulmonares associadas ($p=0,012$), presença de co-infecções ($p=0,019$) e azotemia ($p=0,027$ e $p=0,004$ para elevação nos níveis de creatinina e uréia, respectivamente).

A histoplasmose foi causa principal do óbito em 38,55% (32/83) dos casos. Na análise de *ODDS Ratio*, observaram-se vários fatores mais relacionados com óbito. As variáveis estatisticamente significativas foram: a ocorrência da histoplasmose como definidora de aids ($p=0,047$), dispneia ($p=0,03$), presença de doença renal ($p<0,0001$) e pulmonar ($p<0,0001$), anemia ($p=0,01$), azotemia ($p=0,02$ e $p=0,002$ para elevação nos níveis de creatinina e uréia, respectivamente), presença de infiltrado reticulo-nodular ($p=0,048$), pesquisa ($p=0,0071$) e cultura ($p=0,0056$) positivas (Tabela 1).

Tabela 1. Características clínico-laboratoriais mais relacionadas com recidiva e óbito da histoplasmose em pacientes com aids no estado do Ceará de 2011 a 2015.

Variáveis	Recidiva					Óbito				
	N	OR	P-valor	IC 95%		N	OR	P-valor	IC 95%	
				Min.	Máx.				Min.	Máx.
Epidemiologia do HIV										
Histoplasmose definidora de aids (140/205)	15/140	0,37	0,013	0,18	0,82	48/140	0,54	0,047	0,29	0,99
Dados clínicos										
Dispneia (137/210)	22/137	1,36	0,54	0,60	3,27	62/137	2,05	0,03	1,13	3,81
Hepatomegalia (141/211)	27/141	3,91	0,012	1,38	10,71	54/141	0,88	0,76	0,50	1,59
Esplenomegalia (109/211)	22/109	2,61	0,031	1,16	6,22	40/109	0,80	0,48	0,45	1,39
Doenças associadas										
Pulmonar (41/211)	1/41	0,12	0,012	0,01	0,66	29/41	5,19	<0,0001	2,49	10,88
Renal (46/211)	3/46	0,34	0,098	0,11	1,05	31/46	4,49	<0,0001	2,19	9,01
Infecções associadas										
Presença de co-infecção										
Herpes (22/211)	7/22	3,21	0,026	1,24	8,32	4/22	0,31	0,038	0,11	0,96
Achados laboratoriais										
Hemoglobina <9 (g/dL) (95/205)	10/95	0,50	0,18	0,23	1,10	47/95	2,19	0,01	1,22	3,85
Creatinina >1,3 (mg/dL) (52/204)	3/52	0,27	0,027	0,08	0,90	28/52	2,18	0,02	1,15	4,21
Ureia >50 (72/204)	4/72	0,23	0,004	0,08	0,65	39/72	2,62	0,002	1,46	4,83
Dados radiográficos										
Infiltrado retículo-nodular (33/95)	5/33	1,05	>0,99	0,36	3,56	18/33	2,52	0,048	1,06	5,66
Diagnóstico										
Pesquisa (+) (76/151)	8/76	0,56	0,25	0,22	1,38	37/76	2,61	0,0071	1,30	5,37
Cultura (+) (178/210)	30/178	6,28	0,055	1,08	66,48	63/178	0,33	0,0056	0,15	0,70

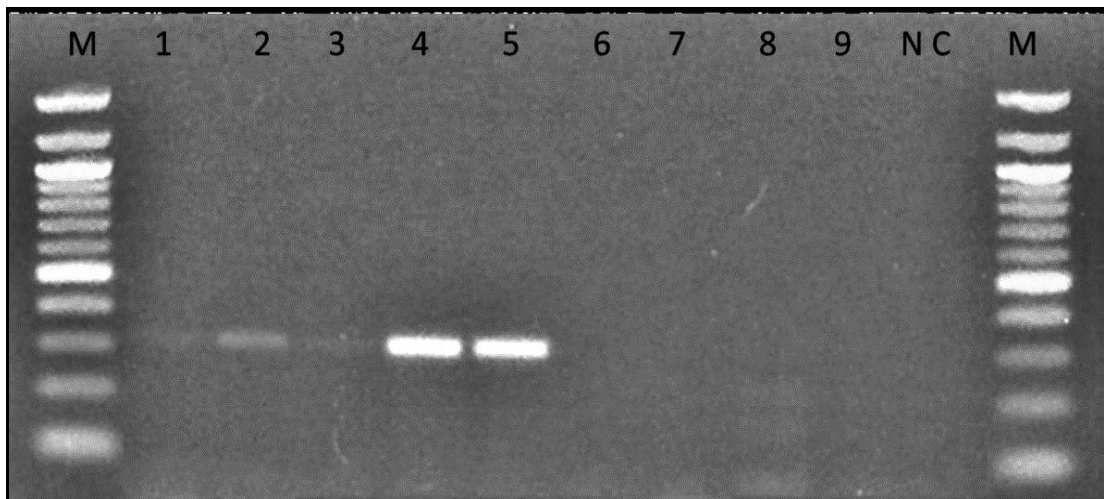
Legenda: AST: Aspartatoaminotransferase; ALT: Alanina aminotransferase; OR: Odds ratio; IC: Intervalo de confiança.

6.2 Parte II: Caracterização laboratorial de *Histoplasma capsulatum*

Identificação molecular de H. capsulatum em cultura e detecção fúngica em espécimes clínicos

A amplificação do gene *RYP1* ocorreu nas 18 cepas de *H. capsulatum* var. *capsulatum* e não houve nenhuma amplificação observada para as cepas utilizadas como controle negativo: *P. brasiliensis*, *S. schenckii*, *C. posadasii* e *C. albicans* (Figura 10).

Figura 10. Detecção do gene *RYP1* em *H. capsulatum* de cultura e espécimes clínicos.



Legenda: Eletroforese em gel em de agarose 1%, mostrando fragmentos de aproximadamente 300 pb. M: marcador de peso molecular 100 pb; 1-3: amplificação do gene *RYP1* diretamente do sangue total; 4-5: amplificação do gene *RYP1* em cepas de *H. capsulatum*; 6-9: ausência de amplificação de *RYP1* gene em cepas de *P. brasiliensis*, *C. posadasii*, *S. schenckii* e *C. albicans*, respectivamente, NC: controle negativo.

Com relação às 21 amostras de sangue analisadas, a amplificação do gene *RYP1* foi constatada em 13 dos 15 espécimes oriundos de pacientes com histoplasmose que apresentaram quantificação de DNA variando de 5,0 a 94,2 ng/ μ L (Tabela 2). Ademais, não se observou amplificação no controle negativo (sangue de 1 indivíduo com coccidioidomicose) e nas 5 amostras de sangue de voluntários saudáveis.

A região *ITS1-ITS4* foi detectada nas 13/15 amostras de sangue de pacientes com histoplasmose e não foi amplificada nas 2/15 amostras de sangue de pacientes com histoplasmose que foram negativas para o gene *RYP1*. Ademais não houve amplificação de *ITS1-ITS4* nas amostras de sangue de voluntários saudáveis, o que demonstrou a ausência de DNA fúngico.

Tabela 2. Detecção de gene *RYP1* em amostras de sangue de pacientes saudáveis ou com micoses sistêmicas.

Estado de saúde	N	Espécime clínico	Quantificação de DNA (ng/μL)	Detecção do gene <i>RYP1</i>	Detecção de <i>ITS1-ITS4</i>
Histoplasmose	15	Sangue	5,0	Detectado	Detectado
		Sangue	5,3	Detectado	Detectado
		Sangue	7,5	Detectado	Detectado
		Sangue	10,0	Detectado	Detectado
		Sangue	10,3	Detectado	Detectado
		Sangue	22,4	Detectado	Detectado
		Sangue	25,0	Detectado	Detectado
		Sangue	29,4	Detectado	Detectado
		Sangue	32,8	Detectado	Detectado
		Sangue	72,6	Detectado	Detectado
		Sangue	82,6	Detectado	Detectado
		Sangue	83,2	Detectado	Detectado
		Sangue	94,2	Detectado	Detectado
		Sangue	5,2	Não detectado	Não detectado
		Sangue	9,5	Não detectado	Não detectado
Coccidioidomicose	1	Sangue	59,6	Não detectado	Não detectado
Voluntário saudável	5	Sangue	7,9	Não detectado	Não detectado
		Sangue	9,4	Não detectado	Não detectado
		Sangue	9,6	Não detectado	Não detectado
		Sangue	16,2	Não detectado	Não detectado
		Sangue	23,2	Não detectado	Não detectado

Na análise do limite de detecção do gene *RYP1*, foram detectados *amplicons* no sangue e tampão contendo concentrações fúngicas de até $2,5 \times 10^2$ ufc/mL e 2,5 ufc/mL, respectivamente.

Sensibilidade a antifúngicos e determinação do ponto de corte epidemiológico antifúngico para *H. capsulatum*

Os valores de CIM para a fase leveduriforme variaram de 0,125 a 0,25 μg/mL para anfotericina B, 0,020 a 0,0156 μg/mL para itraconazol, 1 a 8 μg/mL para fluconazol, 0,0156 a 0,0625 μg/mL para voriconazol e de 2 a 8 μg/mL para caspofungina.

Para a fase filamentosa, os valores de CIM variaram de 0,0078 a 1 μg/mL para anfotericina B e voriconazol; de 0,0005 a 0,0625 μg/mL para itraconazol; de 2 a ≥ 256 μg/mL para fluconazol e de $\leq 0,0156$ a 16 μg/mL para caspofungina (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição de frequência da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 5 agentes antifúngicos contra *H. capsulatum* var. *capsulatum* na forma de levedura e filamentosa.

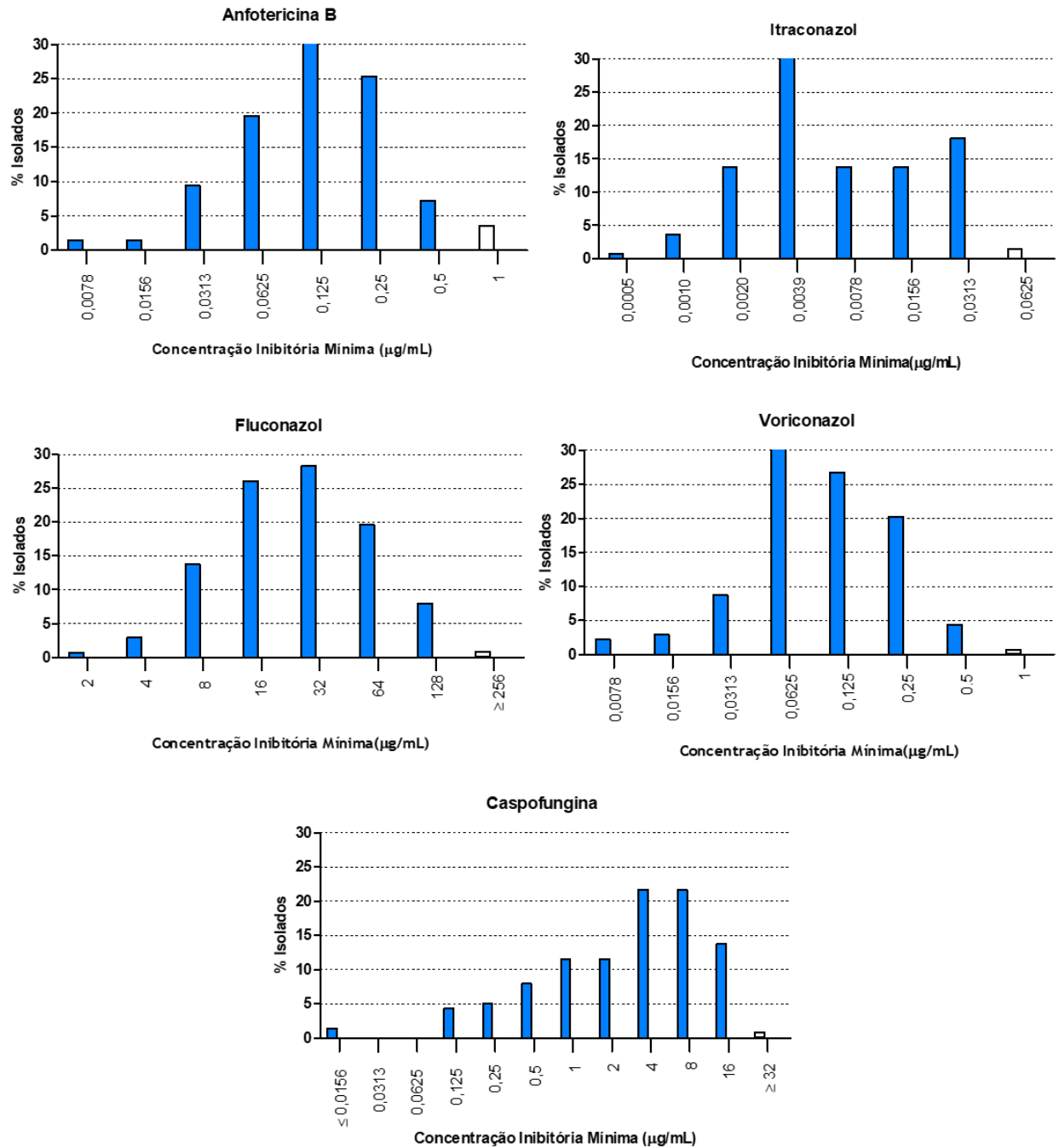
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Variáveis	Antifúngicos				
		AMB	ITC	FLC	VRC	CAS
Forma de levedura (n=7)	CIM	0,125 (5)	0,0020 (1)	1 (1)	0,0156 (2)	2 (4)
		0,25 (2)	0,0039 (1)	2 (3)	0,0313 (2)	4 (2)
			0,0078 (4)	8 (3)	0,0625 (3)	8 (1)
			0,0156 (1)			
	CIM 50	0,125	0,0078	2	0,0313	2
	CIM 90	0,25	0,0156	8	0,0625	8
Forma filamentosa (n=70)		0,0078 (1)	0,0005 (1)	2 (1)	0,0078 (1)	≤0,0156 (1)
		0,0156 (1)	0,0010 (1)	4 (3)	0,0156 (2)	0,125 (4)
		0,0313 (10)	0,0020 (11)	8 (18)	0,0313 (5)	0,25 (1)
		0,0625 (14)	0,0039 (29)	16 (22)	0,0625 (27)	0,5 (5)
		0,125 (14)	0,0078 (9)	32 (13)	0,125 (21)	1 (15)
		0,25 (17)	0,0156 (6)	64 (9)	0,25 (11)	2 (11)
		0,5 (8)	0,0313 (11)	128 (3)	0,5 (2)	4 (22)
		1 (5)	0,0625 (2)	≥256 (1)	1 (1)	8 (9)
						16 (2)
		CIM 50	0,125	0,0039	16	0,0938
	CIM 90	0,5	0,0313	64	0,25	8

Legenda: CIM: Concentração Inibitória Mínima; AMB: Anfotericina B; ITC: Itraconazol; FLC: Fluconazol; VRC: Voriconazol; CAS: Caspofungina.

Para determinação dos ECV, foram usados apenas os resultados da forma filamentosa. Adicionalmente, incluímos os resultados de sensibilidade de 68 cepas obtidos em estudo anterior, pois são necessários no mínimo 100 isolados para determinação do ECV.

Os valores de ECV obtidos foram 0,5; 0,0313; 128; 0,5 e 16 µg/mL para anfotericina B, itraconazol, fluconazol, voriconazol e caspofungina, respectivamente (Figura 11). O percentual de isolados classificados como selvagem foi superior a 96% para todos os fármacos testados. Um total de 5 (3,62%) isolados foram de tipo não selvagem para anfotericina B, 2 (1,45%) para itraconazol e 1 (0,72%) para fluconazol, voriconazol e caspofungina (Tabela 4).

Figura 11. Distribuição da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e valores de pontos de corte epidemiológico (ECV) para anfotericina B, itraconazol, fluconazol, voriconazol e caspofungina frente a isolados de *H. capsulatum* var. *capsulatum*.



Legenda: Barras azuis indicam isolados do tipo selvagem e barras brancas indicam isolados do tipo não selvagem.

Tabela 4. Valores de pontos de corte epidemiológico (ECV) para anfotericina B, itraconazol, fluconazol, voriconazol e caspofungina frente a isolados de *H. capsulatum* var. *capsulatum*.

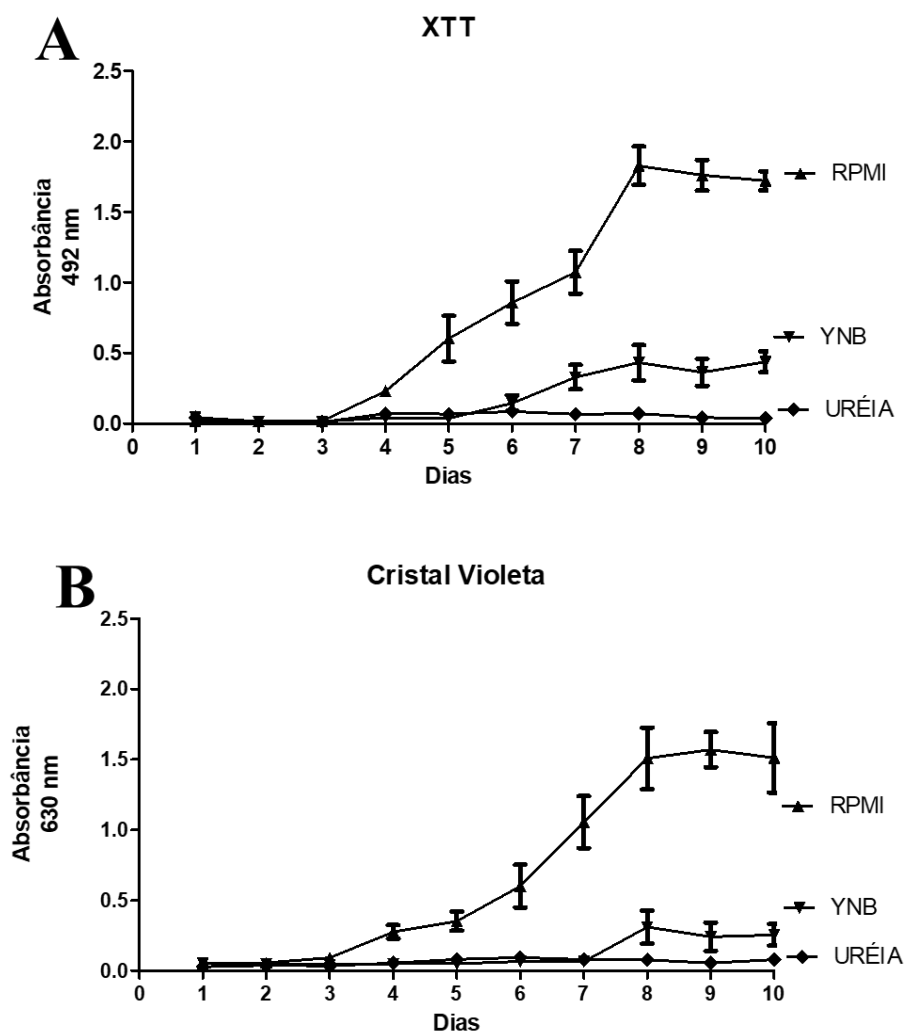
Antifúngicos	MG	CIM Modal (µg/mL)	ECV µg/mL (n isolados)	Tipo selvagem
Anfotericina B	0,1269	0,125	0,5 (138)	96,38%
Itraconazol	0,0067	0,0039	0,0313 (138)	98,55%
Fluconazol	26,4398	32	128 (138)	99,28%
Voriconazol	0,0963	0,0625	0,5 (138)	99,28%
Caspofungina	2,7231	4	16 (138)	99,28%

Legenda: ECV: valor do ponto de corte epidemiológico; CIM: Concentração Inibitória Mínima; MG: Média Geométrica.

Caracterização da formação do biofilme

Os resultados revelaram que *H. capsulatum* na forma filamentosa é capaz de formar biofilme *in vitro*. A cinética de formação de 4 cepas é apresentada na figura 12, e demonstra que o biofilme apresentou melhores resultados de atividade metabólica e biomassa quando formado no meio RPMI. Neste meio, a maturação máxima da atividade metabólica aconteceu ao oitavo dia. Quanto à avaliação feita com cristal violeta, os maiores valores de biomassa também foram observados no 8º dia. Portanto, adotamos o período de incubação de 8 dias, para caracterização dos demais isolados.

Figura 12. Cinética de formação do biofilme de *H. capsulatum* na forma filamentosa durante 10 dias.



Legenda: O biofilme foi formado em diferentes meios de cultura (RPMI, YNB e ureia) e avaliado com XTT a 492 nm (A) (atividade metabólica) e cristal violeta a 630 nm (B) (produção de biomassa). RPMI foi o melhor meio para formação, com maturação máxima ao oitavo dia.

Com relação à classificação da capacidade de formação, 43/46 cepas de *H. capsulatum* avaliadas neste estudo foram classificadas como fortes produtoras de biofilme, com média de DO variando de 0,55 a 2,02. Três cepas foram classificadas como produtoras moderadas, com DO de 0,40; 0,47; 0,31.

Após 8 dias de incubação, os conídios inoculados na placa proliferaram, produzindo hifas que se ramificavam em múltiplas direções, cercadas por matriz extracelular rica em polissacarídeos, que se apresentava rosada na coloração por vermelho Congo, indicando a presença de biofilme (Figura 13 A,B).

As imagens por microscopia confocal mostraram células coradas em verde

demonstrando que a atividade metabólica permanece alta no tempo de maturação máxima. Quando coradas por calcoflúor, as imagens observadas apresentavam menor nitidez (Figura 13 C,D). Na análise por microscopia confocal com *Live/Dead* e calcoflúor, as maiores diferenças observadas foram para biomassa, coeficiente de rugosidade e biovolume (Tabela 5)

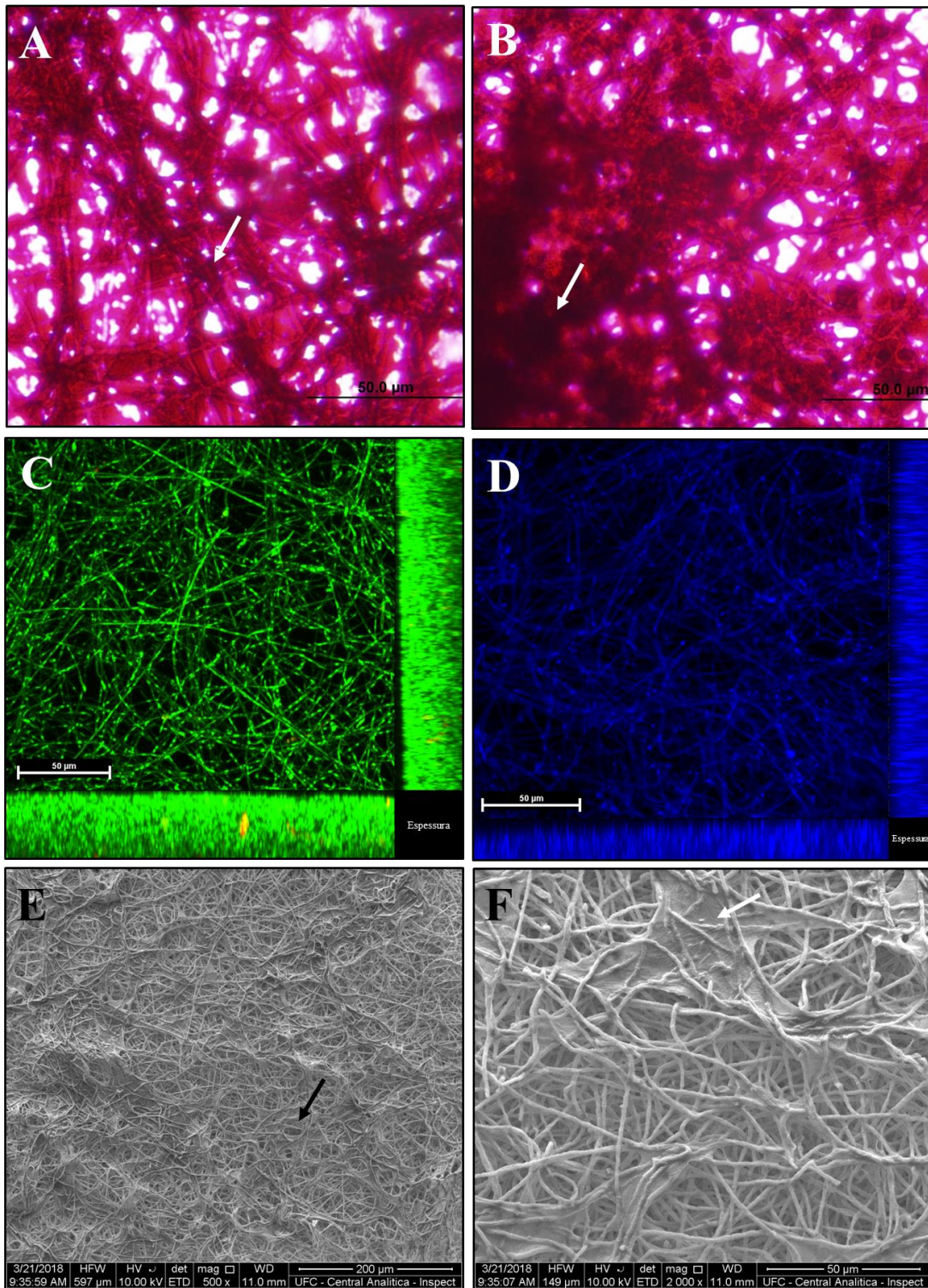
Tabela 5. Caracterização da formação de biofilme de *H. capsulatum*.

Parâmetros	Análise	
	Live/Dead	Calcoflúor
Biomassa total ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$)	2,5 \pm 2,9	9,3 \pm 3,2
Espessura média da biomassa (μm)	16,9 \pm 6,0	17,2 \pm 2,9
Espessura média da área total (μm)	7,5 \pm 8,0	14,8 \pm 4,6
Coeficiente de Rugosidade	1,3 \pm 0,6	0,3 \pm 0,3
Relação Superfície/Biovolume ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$)	1,4 \pm 0,1	0,8 \pm 0,2

Legenda: Os valores indicam médias \pm desvios-padrão.

Na Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), em sua análise tridimensional com maior riqueza de detalhes, observou-se um biofilme robusto com a presença das estruturas filamentosas envoltas por matriz e canais de água (Figura 13 E,F).

Figura 13. Biofilme de *H. capsulatum* na forma filamentosa.



Legenda: Em **A** e **B**, biofilme corado pela técnica de vermelho congo com a matriz extracelular de coloração rosada em volta das hifas (seta branca), visualizados por microscopia ótica (400X). Em **B** e **C**, biofilme visualizado por microscopia confocal demonstrando uma arquitetura robusta de hifas viáveis coradas de verde (400X) pelo *live/dead* (**C**) e em azul (400X) pelo calcoflúor (**D**). Em **E** e **F** imagens analisadas por MEV, demonstrando biofilme com a presença de canais de água (seta preta) (**E**) e matriz extracelular entre as hifas (seta branca) (**F**).

Discussão

7 DISCUSSÃO

O crescimento do número de indivíduos imunossuprimidos em consequência da infecção por HIV, do transplante de órgãos e tecidos e do uso de terapias imunossupressoras, fez com que algumas doenças infecciosas, antes pouco relatadas, passassem a ser descritas com mais frequência (WHEAT et al., 2016). Nesse contexto, passou a ser documentada uma maior ocorrência da histoplasmose, principalmente em pacientes com HIV/aids. Em estudo realizado em um hospital de referência para doenças infecciosas no estado do Ceará, 43,4% dos pacientes com HIV possuíam diagnóstico de histoplasmose disseminada (DAHER et al., 2007).

Nessa perspectiva, esse estudo objetivou avaliar casos de histoplasmose em pacientes com HIV/aids no estado do Ceará durante o período de 2011 a 2015 para acompanhar a evolução da doença na região. Segundo estudos realizados nos últimos 20 anos, esse estado tem se configurado como área endêmica para histoplasmose (DAHER et al., 2007; BRILHANTE et al., 2012b). A prevalência desta doença em pacientes com HIV/aids observada no Ceará foi cerca de 5,9% (SESA, 2017); valores próximos aos observados em outros estados brasileiros, tais como Espírito Santo – 2,1% (CASOTTI et al., 2006) e Goiás – 4,4% (SILVA et al., 2017b).

Com relação a esta pesquisa que compreendeu 5 anos (2011-2015), observou-se uma mesma frequência no número de casos de histoplasmose associada a aids quando comparados aos 41,6 casos/ano encontrados por Brilhante et al. (2012), em estudo realizado na mesma região em anos anteriores (2006-2010) (BRILHANTE et al., 2012b).

Ademais, a ocorrência anual dos casos de aids/histoplasmose no Ceará tem se mostrado superior ao observado em outras áreas endêmicas. Na América Latina, por exemplo, as médias variam de 28 a 32,8 (ADENIS et al., 2014c; BAHR et al., 2015; COLOMBO et al., 2011; NACHER et al., 2013); já nos EUA, um estudo epidemiológico que avaliou um período de 75 anos apresentou média de 38 casos de histoplasmose por ano (BENEDICT; DERADO; MODY, et al., 2016).

Quanto à caracterização da população do estudo, os resultados revelaram que a histoplasmose foi definidora de aids em 66,4% dos pacientes avaliados. As pesquisas de Brilhante et al. (2012b) e Damasceno et al. (2013) demonstram percentuais de 38,9% e 59% respectivamente. Segundo Damasceno et al. (2014), esse elevado número pode estar relacionado à baixa adesão a terapia antirretroviral. Além disso, muitas vezes o diagnóstico de infecção pelo HIV só é feito quando o paciente já apresenta os sinais clínicos da doença

oportunista (DAMASCENO et al., 2014).

A relação entre indivíduos do sexo masculino e feminino observada foi de 3,3 para 1. Trabalhos realizados no estado do Ceará também demonstram a predominância do sexo masculino, como em Daher et al. (2007) e Brilhante et al. (2012b), que observaram uma relação de 3,9:1 e 4,4:1, respectivamente. Outras pesquisas com pacientes com histoplasmose e aids apontam uma relação de 2 a 5 homens para cada uma mulher (ADENIS et al., 2014a; ARANGO et al., 2014; BOIGUES et al., 2018). Essa maior participação do sexo masculino pode ser explicada pelo fato de representarem a população mais afetada pelo HIV no Brasil (SESA, 2017), bem como ao fato de estarem mais expostos a atividades ocupacionais e recreativas de risco (ANDREU et al., 2011).

Na caracterização clínica, sinais como febre, perda de peso, adinamia, tosse, dispneia, hepatomegalia e diarreia foram os mais frequentes, assim como observadas em diferentes regiões (AZAR; HAGE, 2017b; BRILHANTE et al., 2012b). Ademais, observou-se a presença de lesões cutâneas em 30,3% dos pacientes. Esta alta proporção de manifestações cutâneas já foi relatada em estudos realizados no Brasil (43-66%) (CASOTTI et al., 2006; MORA et al., 2008) e em outros países da América Latina, como a Guiana Francesa (13%) e Panamá (17%) (GUTIERREZ et al., 2005; HUBER et al., 2008), em contraste com as taxas muito mais baixas relatadas entre os pacientes nos Estados Unidos (1-7%) (BENEDICT; DERADO; MODY, 2016). Outras pesquisas têm proposto uma associação entre as lesões cutâneas com as diferenças filogenéticas das cepas presentes em cada região (CACERES et al., 2016; KARIMI et al., 2002).

Em relação aos aspectos laboratoriais, as alterações mais encontradas foram pancitopenia, elevação das enzimas hepáticas (AST e ALT) e desidrogenase láctica (LDH) e a baixa contagem de células CD4, o que corrobora os achados da literatura (ADENIS et al., 2014a; MODAK et al., 2015; PUTOT et al., 2015). Segundo Lunardi et al. (2015) a pancitopenia é altamente prevalente nos pacientes com aids e histoplasmose disseminada devido ao envolvimento da medula óssea. Adicionalmente, níveis séricos de LDH maiores que 1000 UI/L são importantes marcadores da infecção oportunista (ZARLASHT et al., 2016). Uma vez que o diagnóstico da doença através da cultura fúngica pode ser um processo demorado, esses testes laboratoriais podem ser úteis na suspeição clínica da histoplasmose e tratamento precoce da doença.

Ademais, observamos um percentual de 14,7% para recidiva da histoplasmose. Em outras pesquisas no Ceará, Damasceno et al. (2013) obtiveram um percentual de 23,3% e Pontes et al. (2010) de 21,8%, observando assim uma queda no percentual de recidiva. Neste

estudo, foram identificadas algumas variáveis que apresentaram resultados estatisticamente significativos para recidiva da histoplasmose, dentre elas, podemos citar a presença de co-infecções oportunistas, que revela o grau de comprometimento imunológico dos pacientes.

Neste estudo, 54% dos indivíduos com histoplasmose apresentavam outras infecções oportunistas, com destaque para candidíase. Silva et al. (2017b), em um estudo realizado no Brasil, observaram que 58,1% dos pacientes estudados apresentaram alguma infecção oportunista, sendo a candidíase a mais comum delas. Em contrapartida, Caceres et al. (2018), em um estudo na Colômbia, observaram que a tuberculose foi a co-infecção mais comum, seguida por pneumocistose e criptococose.

Quanto à letalidade da doença, 39,3% dos indivíduos evoluíram ao óbito, confirmando a alta letalidade na região associada a histoplasmose. Dentre as infecções fúngicas, a histoplasmose é considerada a 3ª causa de morte relacionada à aids, após a pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* e a meningite por *Cryptococcus* spp. Com relação às demais doenças, destaca-se a tuberculose como a principal causa de morte nesses indivíduos (DENNING et al., 2016).

Estudos anteriores realizados no Brasil, têm demonstrado taxas de letalidade da histoplasmose que variam de 32% a 71,3% (BRILHANTE et al., 2012b; DAHER et al., 2007; PONTES et al., 2010; SILVA et al., 2017b). Adicionalmente, pesquisas na América Latina têm observado taxas de letalidade em pacientes com HIV/aids diagnosticados com histoplasmose de 30%; entretanto, nos EUA, estes valores variam de 4% a 8%. Estes dados podem inferir uma precocidade do diagnóstico, que pode ser reflexo da condição socioeconômica do país (BENEDICT; DERADO; MODY, 2016; LEDTKE et al., 2012; NACHER et al., 2013).

Identificamos ainda características clínico-laboratoriais mais relacionadas ao óbito em adultos hospitalizados infectados pelo HIV em um hospital de referência no estado do Ceará, das quais citam-se: a ocorrência da histoplasmose como definidora de aids, dispneia, presença de doença renal e pulmonar, anemia, azotemia, presença de infiltrado reticulo-nodular, pesquisa e cultura positivas.

Um número limitado de estudos correlacionando os fatores clínicos e laboratoriais de pacientes com HIV ao desfecho da histoplasmose foi realizado e esses trabalhos sugerem que a insuficiência renal, hipoalbuminemia, lactato desidrogenase (LDH) elevada e trombocitopenia estão independentemente associados a desfechos desfavoráveis como doença grave ou morte (COUPPIE et al., 2004; DAHER et al., 2006; HAJJEH et al., 2001; PONTES, 2010).

Ademais, Daher et al. (2006) identificaram fatores clínicos e laboratoriais associados a

um aumento no risco de morte que incluíam uma concentração sérica de uréia > 2x do que o limite superior normal, concentração sérica de creatinina > 1,5 mg/dL e níveis de AST > 2,5x superior ao limite normal. No nosso estudo, essas duas variáveis foram significativas tanto para recidiva quanto para mortalidade. Ressaltamos que esses padrões foram avaliados antes do início da terapia antifúngica, uma vez que o tratamento com anfotericina B pode estar associado à toxicidade renal (BADDLEY et al., 2008).

Alguns estudos têm demonstrado ainda associações significativas entre a infecção pelo HIV e a prevalência de anemia (CACERES et al., 2016; GEDEFAW et al., 2013). No entanto, uma vez que a anemia pode ser consequência de condições multifatoriais, existe uma dificuldade para se determinar o papel específico que este parâmetro desempenha na infecção pelo HIV. A literatura descreve ainda que a terapia antirretroviral precoce pode diminuir a ocorrência de anemia secundária à infecção pelo HIV (ALEM et al., 2013; GEDEFAW et al., 2013; SAAVEDRA et al., 2017). Entretanto, vale destacar que alguns esquemas antirretrovirais clássicos, como a zidovudina, também podem causar anemia (BRASIL, 2017a). Em suma, este e os demais fatores apontados como de maior risco para mortalidade dos pacientes devem ser monitorados e merecem maior atenção na rotina clínica.

Nos indivíduos HIV positivos o diagnóstico precoce é importante para a melhora no prognóstico. Nesse sentido, no segundo momento deste trabalho buscamos desenvolver uma ferramenta molecular que contribuísse com o rápido diagnóstico da histoplasmose. O gene *RPY1*, um fator transcricional da transição dimórfica, utilizado como região alvo mostrou-se específico para a identificação de *H. capsulatum* e sensível para a detecção deste fungo a partir de amostras de sangue de pacientes com histoplasmose.

Segundo Azar e Hage (2017b), diferentes regiões alvo como genes que codificam proteínas específicas, tais como antígenos H e M, Hcp-100 e algumas sequências do *Internal Transcribed Spacer* (ITS) do rDNA têm sido avaliadas, embora não sejam utilizadas rotineiramente para o diagnóstico molecular da histoplasmose (DANTAS et al., 2018; MURAOSA et al., 2016; RAMANAN; NANCY; WENGENACK., 2017). A detecção de *RYPI* baseada em PCR é um procedimento rápido e usa apenas a forma não infecciosa do *H. capsulatum*. Além disso, o uso da abordagem molecular é um aliado interessante quando o diagnóstico baseado na observação do estruturas fúngicas em amostras clínicas têm baixa sensibilidade ou quando sorologia e cultura são negativas (ALMEIDA et al., 2016; DANTAS et al., 2018; GAGO et al., 2014).

Sugerimos o uso do gene *RYPI* como alvo para a identificação molecular de *H. capsulatum*, bem como uma ferramenta adicional para o diagnóstico bem sucedido da

histoplasmose diretamente de amostras clínicas obtidas de pacientes com HIV/aids. Segundo Dantas et al. (2018) a associação de diferentes ferramentas diagnósticas aumenta a sensibilidade dos resultados, melhorando assim, o prognóstico da doença.

No terceiro momento, a sensibilidade antifúngica *in vitro* dos isolados foi determinada. As concentrações inibitórias mínimas das drogas obtidas corroboram os valores encontrados em estudo de anos anteriores na mesma região, indicando uma possível manutenção do perfil de sensibilidade dos isolados (BRILHANTE et al. 2012b; BRILHANTE et al., 2016b).

Ademais, os valores de CIM obtidos tanto para a forma filamentosa quanto para a leveduriforme estão dentro do intervalo observado nos testes de sensibilidade *in vitro* realizados por diferentes pesquisadores a nível mundial, sendo observados baixos valores de CIM para anfotericina B, itraconazol e voriconazol e valores mais altos para fluconazol e caspofungina (BRILHANTE et al. 2012a; GOUGHENOUR; RAPPLEYE, 2016; KATHURIA et al., 2014; WHEAT et al., 2006).

A fim de orientar as terapias antifúngicas contra infecções por alguns fungos, testes de sensibilidade *in vitro* foram padronizados e pontos de corte clínicos foram estabelecidos para a categorização de isolados em sensíveis ou resistentes (CLSI, 2017a). O estabelecimento de pontos de corte clínicos requer uma análise de distribuição de frequência dos valores de CIM; dados farmacocinéticos / farmacodinâmicos; acompanhamento do tratamento clínico e análise da resposta terapêutica. A escassez desses dados clínicos dificulta o estabelecimento de pontos de corte clínicos contra muitas espécies de fungos, o que provavelmente está associado à dificuldade de determinar o desfecho clínico e a letalidade associados às infecções fúngicas e aos altos custos de realização de ensaios clínicos (LOCKHART; GHANNOUM; ALEXANDER, 2017)

Esses fatos certamente contribuem para a falta de pontos de corte clínicos contra muitos patógenos fúngicos. Em contrapartida, a determinação dos valores de corte epidemiológicos (ECVs) requer apenas a análise da distribuição de frequência dos valores de CIM antifúngicos (LOCKHART; GHANNOUM; ALEXANDER, 2017), portanto, o estabelecimento de ECVs é um método promissor para a vigilância da resistência antifúngica (ESPINEL-INGROFF et al., 2017; LOCKHART; GHANNOUM; ALEXANDER, 2017).

Os ECVs já foram determinados contra diferentes espécies dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor* e *Rhizopus* (ESPINEL-INGROFF et al., 2011; ESPINEL-INGROFF et al., 2014; ESPINEL-INGROFF et al., 2015a,b; ESPINEL-INGROFF et al., 2016; LOCKHART; GHANNOUM; ALEXANDER, 2017).

Recentemente, ECVs frente ao fungo dimórfico *Sporothrix* spp. na forma filamentosa foram determinados (ALMEIDA-PAES et al., 2017; ESPINEL-INGROFF et al., 2017), o que encorajou nosso grupo na tentativa de estabelecer ECVs frente a *H. capsulatum* var. *capsulatum*.

Para o estabelecimento de ECVs, certos requisitos devem ser atendidos, como um número mínimo de 100 isolados, o uso da mesma metodologia para determinação de CIM, dados de CIM de pelo menos 3 laboratórios diferentes e a inclusão de cepas de controle de qualidade nos testes de sensibilidade (LOCKHART; GHANNOUM; ALEXANDER, 2017). Além disso, ao interpretar os dados, os valores modais de CIM não devem coincidir com as concentrações antifúngicas testadas mais baixas ou mais altas (LOCKHART; GHANNOUM; ALEXANDER, 2017). Para análise do ECV, foi utilizada uma base de dados gerada em nosso laboratório referente a sensibilidade realizada durante 10 anos, o que totalizou 138 cepas de *H. capsulatum* na forma filamentosa, que foram avaliadas pelo método de microdiluição em caldo, utilizando RPMI 1640 como meio de cultura.

Considerando que esta espécie fúngica não é rotineiramente testada para sensibilidade a antifúngicos, e não há padronização metodológica universal (interlaboratorial) com *H. capsulatum*, os dados de outros laboratórios não foram incluídos. No entanto, o Centro Especializado de Micologia Médica é um laboratório de referência para a realização de ensaios de sensibilidade antifúngica com *H. capsulatum* no Brasil (BRILHANTE et al., 2010; BRILHANTE et al., 2012a,b; BRILHANTE et al., 2016b) e os dados aqui relatados foram obtidos de testes realizados por diferentes pesquisadores, em diferentes momentos, seguindo a mesma metodologia, o que contribuiu para minimizar os vieses.

Uma alta porcentagem de isolados do tipo selvagem foi obtida para todos os fármacos testados, especialmente para fluconazol e voriconazol, que são usados para o tratamento da histoplasmose não disseminada (WHEAT et al., 2007). Embora não haja evidência clínica para o uso de caspofungina (WHEAT et al., 2007), apenas um isolado foi classificado como não selvagem para essa droga. Os ECVs levam em conta o comportamento epidemiológico dos isolados fúngicos após exposição a um determinado fármaco, sem considerar fatores relacionados ao hospedeiro, portanto, é essencial saber se um determinado agente antifúngico é aplicável para o tratamento de uma doença em particular, antes de usar o seu ECV na prática clínica (LOCKHART; GHANNOUM; ALEXANDER, 2017).

Neste estudo, cinco isolados de *H. capsulatum* foram classificados como não-selvagens para anfotericina B e dois para itraconazol. Considerando que estes são os fármacos mais frequentemente utilizados para o tratamento de histoplasmose disseminada e que os

isolados foram obtidos a partir de pacientes HIV-positivos com a doença fúngica disseminada, acredita-se que uma maior exposição dos fungos isolados a estas drogas antifúngicas possa levar à observação de maiores valores de CIM para essas drogas. Conceitualmente, com base na definição de ECVs, valores de CIM superiores aos ECVs antifúngicos indicam que o isolado é do tipo não-selvagem e pode estar expressando mecanismos de resistência antifúngica (ALMEIDA-PAES et al., 2017; ESPINEL-INGROFF et al., 2017; LOCKHART; GHANNOUM; ALEXANDER, 2017).

Vale ressaltar que os ECVs obtidos foram determinados contra isolados de *H. capsulatum* de pacientes com aids. Mesmo que isso possa ser uma limitação do estudo e os resultados possam não refletir a sensibilidade de isolados de *H. capsulatum* de indivíduos imunocompetentes e de outros hospedeiros, vale destacar que o ECV é uma característica epidemiológica das espécies de fungos, independente do hospedeiro (LOCKHART; GHANNOUM; ALEXANDER, 2017).

Neste contexto, a classificação baseada nos ECVs estabelecida neste estudo também pode ser usada para categorizar isolados de outros hospedeiros. Por exemplo, analisamos a sensibilidade antifúngica de dois isolados de *H. capsulatum* recuperados em 2017 de pacientes HIV-negativos transplantados e observamos que ambos os isolados eram do tipo selvagem para todas as drogas testadas. Além disso, esses ECV estabelecidos também podem ser usados para categorizar isolados de origem veterinária. Assim, utilizando os ECVs obtidos neste estudo, três isolados de *H. capsulatum* recuperados de gatos por Brilhante et al. (2012a) foram classificados como selvagens para anfotericina B, fluconazol, voriconazol e caspofungina, enquanto um isolado foi classificado como não-selvagem para itraconazol

Apesar de ser um passo importante na tentativa de estabelecer ECVs antifúngicos frente a *H. capsulatum*, esta análise apresenta algumas limitações que devem ser reconhecidas. Os presentes resultados não cobrem dados de todas as espécies filogenéticas de *H. capsulatum*, apenas das linhagens latino-americanas, e tem sido descrito que diferentes linhagens podem apresentar diferentes perfis de sensibilidade antifúngica (EDWARDS; ALORE, RAPPLEYE, 2011). No entanto, os resultados trazem informações importantes sobre as cepas do Brasil e, possivelmente, da América do Sul, onde a histoplasmose é uma importante doença endêmica.

Embora os ECVs não prevejam a resposta à terapia antifúngica, esses dados podem fornecer diretrizes para o tratamento da histoplasmose, especialmente para aqueles pacientes que usam drogas antifúngicas por longos períodos, pois esses valores são úteis para monitorar a expressão de mecanismos de resistência. Além disso, os ECVs também permitem comparar

a sensibilidade antifúngica de uma espécie fúngica ao longo do tempo, tornando possível entender o comportamento epidemiológico de micro-organismos, especialmente em resposta a pressões seletivas ambientais (ALMEIDA-PAES et al., 2017; LOCKHART; GHANNOUM; ALEXANDER, 2017).

Neste contexto, estudos *in vitro* mostraram aumento das CIMs de fluconazol contra isolados de pacientes com recidiva da histoplasmose, durante o tratamento e, alguns mecanismos de resistência antifúngica foram hipotetizados, como aumento da produção de ergosterol e síntese de melanina, que, por sua vez, se ligaria a moléculas antifúngicas (WHEAT et al., 2009).

Outro mecanismo que também tem sido associado à resistência é a formação de biofilme (DAVIS; COOK; COSTERTON, 2002). Pitangui et al. (2012) demonstraram a capacidade que as células leveduriformes de *H. capsulatum* têm para aderir a pneumócitos e formar biofilme *in vitro* e Brilhante et al. (2015) demonstraram a tolerância do biofilme leveduriforme frente a antifúngicos clássicos. O papel desses biofilmes também tem sido estudado com outros fungos dimórficos na fase de levedura como *Paracoccidioides brasiliensis* (CATTANA et al., 2017), *Coccidioides immitis* (DAVIS; COOK; COSTERTON, 2002) e complexo *Sporothrix schenckii* (SILVA, 2017a).

Os biofilmes apresentam tanto relevância na clínica quanto na manutenção dos fungos no ambiente. Segundo Kumar et al. (2017), essas comunidades microbianas sésseis são destinadas a proteger as células microbianas de fatores ambientais diversos, como por exemplo, desidratação e substâncias químicas (KUMAR et al., 2017). A literatura demonstra a capacidade de formação de biofilme do fungo dimórfico *Sporothrix* spp. na forma filamentosa (BRILHANTE et al., 2017a); entretanto, a caracterização do biofilme de *H. capsulatum* nesta forma ainda não havia sido descrita.

Com base nessas informações, este estudo buscou investigar a capacidade de *H. capsulatum* na forma filamentosa formar biofilme *in vitro*. A maioria (93,4%) das cepas de *H. capsulatum* foram fortes formadoras de biofilme assim como já demonstrado com o fungo dimórfico *Sporothrix* spp. (BRILHANTE et al., 2017a). Dessa forma, hipotetizamos que esta grande capacidade pode estar associada à necessidade de sobrevivência no ambiente, visto que pesquisas descrevem que este fungo pode permanecer no ambiente por até 10 anos (ADENIS et al., 2014c).

As análises das imagens revelam um biofilme robusto, com uma rede de hifas densas associadas a presença de matriz polimérica extracelular e canais de água, semelhantes ao observado com outros fungos como *Sporothrix* spp. (BRILHANTE et al., 2017a),

dermatófitos (BRILHANTE et al. 2017b) e *Aspergillus* spp. (GONZÁLEZ-RAMÍREZ, et al., 2016). Essa organização estrutural é importante para a manutenção da arquitetura do biofilme, enquanto os canais de água são essenciais no transporte de nutrientes para as células do biofilme e remoção de metabólitos celulares (COSTA-OLANDI et al., 2017).

A maioria dos estudos com biofilmes fúngicos têm utilizado algumas ferramentas de avaliação, tais como o XTT usado para determinar a atividade metabólica e a coloração com cristal violeta para quantificação de biomassa (BRILHANTE et al., 2017a; CORDEIRO et al., 2015). Ademais, microscopias especiais vêm sendo empregadas, como a eletrônica de varredura para a observação da arquitetura dos biofilmes (BRILHANTE et al., 2017a; BRILHANTE et al., 2017b; LAGREE et al., 2018) e a microscopia confocal, para avaliação de parâmetros como a espessura, coeficiente de rugosidade e biovolume (HEYDORN et al., 2000).

Na análise do biofilme por microscopia confocal utilizando Live/Dead, observamos que o biofilme filamentoso de *H. capsulatum*, quando maduro, possui aproximadamente 17 μm de espessura. Brilhante et al. (2018b) mostraram que o biofilme do complexo *Candida parapsilosis* apresenta valores semelhantes para biomassa (17,51 μm). Na análise do biofilme do fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus*, no sexto dia de formação, observou-se biomassa total de 12,9 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$; espessura média de 16,3 μm e coeficiente de rugosidade 0,32 (SINGHAL et al.; 2011), corroborando os resultados obtidos nesse estudo.

Quanto às análises dos outros parâmetros por microscopia confocal, observamos maiores valores de biomassa total e espessura média da área total e menores de coeficientes de rugosidade para calcoflúor quando comparados ao *live-dead*. Estes resultados podem estar associados ao fato das imagens com calcoflúor apresentarem-se com uma fluorescência de menor nitidez. Dessa forma, observamos uma massa fluorescente ao invés de estruturas fúngicas definidas na coloração com calcoflúor.

Nesse contexto, a espessura, que é definida como espessura máxima em um determinado local ignorando poros dentro do biofilme, tende a ser maior nesse método; e a rugosidade, que é um indicador da heterogeneidade do biofilme, tende a ser menor. Segundo Chandra (2001), este aspecto observado em biofilme de *Candida* spp. foi atribuído à coloração difusa do material extracelular com calcoflúor, que cora a quitina da parede celular fúngica, e implicou que o material extracelular poderia ser composto principalmente por polissacarídeos da parede celular (CHANDRA et al., 2001). *H. capsulatum* tem a parede formada por quitina, alfa e beta glucanos (ANDREU et al., 2011); entretanto, estudos adicionais precisam ser desenvolvidos para caracterizar a composição da matriz extracelular

desses biofilmes.

Em suma, *H. capsulatum* na forma filamentosa são fortes formadoras de biofilme, o que configura um importante fator de adaptação às adversidades ambientais por longos períodos, sendo importante fontes de manutenção no meio ambiente.

Conclusão

8 CONCLUSÃO

- Indivíduos com histoplasmose/aids apresentam características similares nos últimos 10 anos, nas quais se destacam a prevalência do sexo masculino, presença de sintomatologia inespecífica e lesões cutâneas, com achados laboratoriais demonstrando elevação dos níveis de LDH e trombocitopenia.
- A ocorrência da histoplasmose como doença definidora de aids, a presença de comorbidades pulmonares e a elevação dos níveis de ureia e creatinina corroboram para a recidiva e letalidade.
- O gene *RYP1* representa uma boa alternativa para a identificação molecular de *H. capsulatum* var. *capsulatum* e configura-se como um importante alvo molecular para o diagnóstico da histoplasmose.
- Cerca de 96% dos isolados de *H. capsulatum* são classificados, quanto ao ponto de corte epidemiológico, como do tipo selvagem;
- Isolados de *H. capsulatum* na forma filamentosa apresentam melhor formação de biofilme no meio RPMI, e são, na sua maioria (43/46), caracterizados como fortes produtores, sendo a análise por microscopia eletrônica com *live-dead* uma interessante ferramenta na avaliação de diferentes parâmetros do biofilme.

REFERÊNCIAS

- ADENIS, A.; NACHER, M.; HANF, M.; BASURKO, C.; DUFOUR, J.; HUBER, F.; AZNAR, C.; CARME, B.; COUPPIE, P. Tuberculosis and histoplasmosis among human immunodeficiency virus-infected patients: a comparative study. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, p. 216-223, 2014a.
- ADENIS, A.; NACHER, M.; HANF, M.; VANTILCKE, V.; BOUKHARI, R.; BLACHET, D.; DEMAR, M.; AZNAR, C.; CARME, B.; COUPPIE, P. HIV-Associated Histoplasmosis Early Mortality and Incidence Trends: From Neglect to Priority. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 21, p. 1-5, 2014b.
- ADENIS, A.A.; AZNAR, C.; COUPPIÉ, P. Histoplasmosis in HIV-Infected Patients: A Review of New Developments and Remaining Gaps. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 28, p. 119-128, 2014c.
- AGABA, P.A.; DIGIN, E.; MAKAI, R.; APENA, L.; AGBAJI, O.O.; IDOKO, J.A.; MURPHY, R.; KANKI, P. Clinical characteristics and predictors of mortality in hospitalized HIV-infected Nigerians. **Journal of Infection in Developing Countries**, v.22, p. 377-382, 2011.
- AIDÉ, M.A. Histoplasmosis. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, p. 1145-1151, 2009.
- AJESH, K.; SREEJITH, K. *Cryptococcus laurentii* biofilms: structure, development and antifungal drug resistance. **Mycopathologia**, v. 174, p. 409-419, 2012.
- AKRAM, S.M.; KOIRALA, J. Histoplasmosis. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448185/>. Acesso em 20 de dezembro de 2017.
- ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; MELHEM, M.S.; BONFIETTI, L.X.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. Susceptibility test for fungi: Clinical and laboratorial correlations in medical mycology. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 19, p. 57-64, 2015.
- ALEM, M.; ENAWGAW, B.; GELAW, A.; KENAW, T.; SEID, M.; OLKEBA, Y. Prevalence of anemia and associated risk factors among pregnant women attending antenatal care in Azezo Health Center Gondar town, Northwest Ethiopia. **Journal Interdisciplinary Histopathology**, v. 1, p. 137-144, 2013.
- ALENCAR, K.F.; AUGUSTO BORGES, C.S.; DIOGENES, M.J.N. Reações à histoplasmina e paracoccidioidina em Aracati (Estado do Ceará, Brasil). **Medicina Cutânea Ibero-Latino-Americana**, v. 6, p. 275-278, 1992.
- ALLEN, H.B.; GOYAL, K.; OGRICH, L.; JOSHI, S. Biofilm Formation by *Malassezia furfur/ovale* as a Possible Mechanism of Pathogenesis in Tinea Versicolor. **Journal of Clinical and Experimental Dermatology Research**, v. 6, p. 1-4, 2015.
- ALMEIDA, A.A.; CRISPIM B.A.; GRISOLIA, A.B.; SVIDZINSKI, T.I.; ORTOLANI, L.G.; OLIVEIRA, K.M. Genotype, antifungal susceptibility, and biofilm formation of *Trichosporon asahii* isolated from the urine of hospitalized patients. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 48, p. 62-66, 2016.

ALMEIDA, F.; LACAZ, C.S. Cogumelo do gênero *Histoplasma* isolado de lesões de cromomicose. Associação de fungos nas lesões. **Folia Clinica Biologica**, v. 9, p. 65-69, 1939.

ALMEIDA, F.; LACAZ, C.S. Considerações em torno de duas amostras de *Histoplasma capsulatum* isolados de dermatite verrucosa e de escarro. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, v. 17, p. 561-577, 1941.

ALMEIDA-PAES, R.; BRITO-SANTOS, F.; FIGUEIREDO-CARVALHO, M.H.G.; MACHADO, A.C.S.; OLIVEIRA, M.M.E.; PEREIRA, S.A.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M. Minimal inhibitory concentration distributions and epidemiological cutoff values of five antifungal agents against *Sporothrix brasiliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, p. 376-381, 2017.

ANDREU, C.M.F.; ZARAGOZÍ, M.T.I.; MACHÍN, G.M.; LANCHÁ, M.R.P.; VACA, E.M. Una actualización acerca de histoplasmosis. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 63, 189-205, 2011.

ARANGO, M.; CASTAÑEDA, E.; AGUDELO, C.I.; DE BEDOUT, C.; AGUDELO, C.A.; TOBÓN, A.; LINARES, M.; VALENCIA, Y.; RESTREPO, A.; COLOMBIAN HISTOPLASMOSIS STUDY GROUP. Histoplasmosis: results of the Colombian national survey, 1992-2008. **Biomedica**, v. 31, p. 344-356, 2011.

ARMSTRONG, P.A.; BEARD, J.D.; BONILLA, L.; ARBOLEDA, N.; LINDSLEY, M.D.; CHAE, S.; CASTILLO, D.; NUÑEZ, R.; CHILLER, T.; PERIO, M.A.; PIMENTEL, R.; VALLABHANENI, S. Outbreak of Severe Histoplasmosis Among Tunnel Workers - Dominican Republic, 2015. **Clinical Infectious Diseases**, v. 66, p. 1550-1557, 2017.

ASHBEE, H.R.; EVANS, E.G.; VIVIANI, M.A.; DUPONT, B.; CHRYSANTHOU, E.; SURMONT, I.; TOMSIKOVA, A.; VACHKOV, P.; ENERO, B.; ZALA, J.; TINTELNOT, K. Histoplasmosis in Europe: report on an epidemiological survey from the European Confederation of Medical Mycology Working Group. **Medical Mycology**, v. 46, p. 57-65, 2008.

AZAR, H.; HAGE, C.A. Laboratory Diagnostics for Histoplasmosis. **Journal Clinical Microbiology**, v. 55, p. 1612-1620, 2017a.

AZAR, M.M.; HAGE, C.A. Clinical Perspectives in the Diagnosis and Management of Histoplasmosis. **Clinics In Chest Medicine**, v. 38, p. 403-415, 2017b.

BADDLEY, J.W.; SANKARA, I.R.; RODRIQUEZ, J.M.; PAPPAS, P.G.; MANY JR., W.J. Histoplasmosis in HIV-infected patients in a southern regional medical center: poor prognosis in the era of highly active antiretroviral therapy. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 62, p. 151-156, 2008.

BAHR, N.C.; ANTINORI, S.; WHEAT, L.J.; SAROSI, G.A. Histoplasmosis infections worldwide: thinking outside of the Ohio River valley. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 2, p. 70-80, 2015.

BENEDICT, K.; DERADO, G.; MODY, R.K. Histoplasmosis-Associated Hospitalizations in the United States, 2001-2012. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 3, p. 1-4, 2016.

BEYHAN, S.; GUTIERREZ, M.; VOORHIES, M.; SIL, A. A temperature responsive network links cell shape and virulence traits in a primary fungal pathogen. **PLoS Biology**, v. 11, e1001614, 2013.

BOHSE, M.L.; WOODS, J.P. RNA interference-mediated silencing of the *YPS3* gene of *Histoplasma capsulatum* reveals virulence defects. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 2811–2817, 2007.

BOIGUES, B.C.S.; PANIAGO, A.M.M.; LIMA, G.M.E.; NUNES, M.O.; UEHARA, S.N.O. Clinical outcomes and risk factors for death from disseminated histoplasmosis in patients with AIDS who visited a high-complexity hospital in Campo Grande, MS, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, p. 155-161, 2018.

BOYCE, K.J.; ANDRIANOPOULOS, A. Fungal dimorphism: the switch from hyphae to yeast is a specialized morphogenetic adaptation allowing colonization of a host. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, p. 797-811, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Crterios de definio de casos de aids em adultos e crianas**. Braslia, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo Clnico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infeco pelo HIV em Adultos**. Braslia, 2017a.

BRILHANTE, R.S.; COELHO, C.G.; SIDRIM, J.J.; LIMA, R.A.; RIBEIRO, J.F.; CORDEIRO, R.A.; CASTELO-BRANCO, D.S.; GOMES, J.M.; SIMÕES-MATTOS, L.; MATTOS, M.R.; BESERRA, H.E.; NOGUEIRA, G.C.; PINHEIRO, A.Q.; ROCHA, M.F. Feline histoplasmosis in Brazil: clinical and laboratory aspects and a comparative approach of published reports. **Mycopathologia**, v. 173, p. 193-197, 2012a.

BRILHANTE, R.S.; FECHINE, M.A.; CORDEIRO, R.A.; ROCHA, M.F.; RIBEIRO, J.F.; MONTEIRO, A.J.; LIMA, R.A.; MESQUITA, J.R.; CAMARGO, Z.P.; SIDRIM, J.J. *In vitro* effect of sulfamethoxazole-trimethoprim against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p. 3978-3979, 2010.

BRILHANTE, R.S.N.; AGUIAR, F.R.M.; SILVA, M.L.Q.; OLIVEIRA, J.S.; CAMARGO, Z.P.; RODRIGUES, A.M.; PEREIRA, V.S.; SERPA, R.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; CORREIA, E.E.M.; PEREIRA-NETO, W.A.; CORDEIRO, R.A.; ROCHA, M.F.G.; SIDRIM, J.J.C. Antifungal susceptibility of *Sporothrix schenckii* complex biofilms. **Medical Mycology**, v. 56, p. 297-306, 2017a.

BRILHANTE, R.S.N.; BITTENCOURT, P.V.; LIMA, R.A.C.; CASTELO-BRANCO, D.S.; OLIVEIRA, J.S.; PINHEIRO, A.; CORDEIRO, R.; CAMARGO, Z.P.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Coccidioidomycosis and Histoplasmosis in Equines: An Overview to Support the Accurate Diagnosis. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 40, p. 62-73, 2016a.

BRILHANTE, R.S.N.; CAETANO, E.P.; RIELLO, G.B.; GUEDES, G.M.; CASTELO-BRANCO, D.S.; FECHINE, M.A.; OLIVEIRA, J.S.; CAMARGO, Z.P.; MESQUITA, J.R.; MONTEIRO, A.J.; CORDEIRO, R.A.; ROCHA, M.F.; SIDRIM, J.J. Antiretroviral drugs saquinavir and ritonavir reduce inhibitory concentration values of itraconazole against

Histoplasma capsulatum strains *in vitro*. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, p. 155-159, 2016b.

BRILHANTE, R.S.N.; CORREIA, E.E.M.; GUEDES, G.M.M.; PEREIRA, V.S.; OLIVEIRA, J.S.; BANDEIRA, S.P.; ALENCAR, L.P.; ANDRADE, A.R.C.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; CORDEIRO, R.A.; PINHEIRO, A.Q.; CHAVES, L.J.Q.; PEREIRA-NETO, W.A.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Quantitative and structural analyses of the *in vitro* and *ex vivo* biofilm-forming ability of dermatophytes. **Journal Medical Microbiology**, v. 66, p. 1045-1052, 2017b.

BRILHANTE, R.S.N.; FECHINE, M.A.B.; MESQUITA, J.R.L.; CORDEIRO, R.A.; ROCHA, M.F.G.; MONTEIRO, A.J.; LIMA, R.A.; CAETANO, E.P.; PEREIRA, J.F.; CASTELO-BRANCO, D.S.; CAMARGO, Z.P.; SIDRIM, J.J. Histoplasmosis in HIV-positive patients in Ceará, Brazil: clinical-laboratory aspects and *in vitro* antifungal susceptibility of *Histoplasma capsulatum* isolates. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, p. 484-488, 2012b.

BRILHANTE, R.S.N.; LIMA, R.A.; MARQUES, F.J.; SILVA, N.F.; CAETANO, É.P.; CASTELO-BRANCO, D.S.; BANDEIRA, T.J.; MOREIRA, J.L.; CORDEIRO, R.A.; MONTEIRO, A.J.; CAMARGO, Z.P.; SIDRIM, J.J.; ROCHA, M.F. *Histoplasma capsulatum* in planktonic and biofilm forms: *in vitro* susceptibility to amphotericin B, itraconazole and farnesol. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, p. 394-399, 2015.

BRILHANTE, R.S.N.; RIBEIRO, J.F.; LIMA, R.A.; CASTELO-BRANCO, D.S.; SOARES, R.M.; MESQUITA, J.R.; GRANGEIRO, T.B.; CAMARGO, Z.P.; CORDEIRO, R.A.; ROCHA, M.F.; SIDRIM, J.J. Evaluation of the genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* isolates from north-eastern Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, p. 1688-1695, 2012c.

BRILHANTE, R.S.N.; ROCHA, M.G.; GUEDES, G.M.M.; OLIVEIRA, J.S.; ARAÚJO, G.S.; ESPAÑA, J.D.A.; SALES, J.A.; AGUIAR, L.; PAIVA, M.A.N.; CORDEIRO, R.A.; PEREIRA-NETO, W.A.; PINHEIRO, A.Q.; SIDRIM, J.J.C.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; ROCHA, M.F.G. *Malassezia pachydermatis* from animals: planktonic and biofilm antifungal susceptibility and its virulence arsenal. **Veterinary Microbiology**, v.220, p. 47-52, 2018a.

BRILHANTE, R.S.N.; SALES, J.A.; SILVA, M.L.Q.; OLIVEIRA, J.S.; PEREIRA, L.A.; PEREIRA-NETO, W.A.; CORDEIRO, R.A.; SIDRIM, J.J.C.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; ROCHA, M.F.G. Antifungal susceptibility and virulence of *Candida parapsilosis* species complex: an overview of their pathogenic potential. **Journal of Medical Microbiology**, v. 67, p. 903-914, 2018b.

BUITRAGO, M.J.; CANTEROS, C.E.; LEÓN, G.F.; GONZÁLEZ, Á.; OLIVEIRA, M.M.E.; MUÑOZ, C.O.; RAMIREZ, J.A.; TORANZO, A.I.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.; CUENCA-ESTRELLA, M. Comparison of PCR protocols for detecting *Histoplasma capsulatum* DNA through a multicenter study. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 30, p. 256-260, 2013.

CACERES, D.H.; TOBÓN, Á.M.; RESTREPO, Á.; CHILLER, T.; GÓMEZ, B.L. The important role of co-infections in patients with AIDS and progressive disseminated histoplasmosis (PDH): A cohort from Colombia. **Medical Mycology Case Reports**, v. 19, p. 41-44, 2018.

CACERES, D.H.; TOBÓN. A.M.; CLEVELAND, A.A.; SCHEEL, C.M.; BERBESI, D.Y.; OCHOA, J.; RESTREPO, A.; BRANDT, M.E.; CHILLER, T.; GÓMEZ, B.L. Clinical and Laboratory Profile of Persons Living with Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immune Deficiency Syndrome and Histoplasmosis from a Colombian Hospital. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, p. 918-924, 2016.

CAFARCHIA, C.; IATTA, R.; IMMEDIATO, D.; PUTTILLI, M.R.; OTRANTO, D. Azole susceptibility of *Malassezia pachydermatis* and *Malassezia furfur* and tentative epidemiological cut-off values. **Medical Mycology**, v. 53, p. 743-748, 2015.

CASOTTI, J.A.; MOTTA, T.Q.; FERREIRA-JR., C.U.; CERUTTI-JR., C. Disseminated histoplasmosis in HIV positive patients in Espirito Santo state, Brazil: a clinical-laboratory study of 12 cases (1999–2001). **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, p. 327–330, 2006.

CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; RIELLO, G.B.; VASCONCELOS, D.C.; GUEDES, G.M.M.; SERPA, R.; BANDEIRA, T.J.P.G.; MONTEIRO, A.J.; CORDEIRO, R.A.; ROCHA, M.F.G.; SIDRIM, J.J.C.; BRILHANTE, R.S.N. Farnesol increases the susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* biofilm to antimicrobials used to treat melioidosis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 3, p. 600-606, 2016.

CATTANA, M.E.; TRACOGNA, M.F.; MARQUES, I.; ROJAS, F.; FERNÁNDEZ, M.; DE LOS ÁNGELES SOSA, M.; MUSSIN, J.; GIUSIANO, G. In vivo *Paracoccidioides* sp. biofilm on vascular prosthesis. **Mycopathologia**, v.182, p. 747-749, 2017.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Histoplasmosis outbreak associated with the renovation of an old house - Quebec, Canada. **Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)**, v. 62, p. 1041-1044, 2013.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Revision of the CDC surveillance case definition of acquired immunodeficiency syndrome. **Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)**, v. 36, p. 1S-15S, 1987.

CHANDRA, J.; KUHN, D.M.; MUKHERJEE, P.K.; HOYER, L.L.; MCCORMICK, T.; GHANNOUM, M.A. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 5385-5394, 2001.

CHANG, P.; RODAS, C. Skin lesions in histoplasmosis. **Clinics Dermatology**, v. 30, p. 592-598, 2012.

CLSI. *Epidemiological Cutoff Values for Antifungal Susceptibility Testing*. 1st ed. CLSI supplement M59. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016a.

CLSI. *Principles and procedures for the development of epidemiological cutoff values for antifungal susceptibility testing*. 1st ed. CLSI guideline M57. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016b.

CLSI. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts*; 4rd ed. CLSI standard M27. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017a.

CLSI. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi*; 3rd ed. CLSI standard M38. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017b.

CLSI. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi*; 2nd ed. CLSI standard M38. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008a.

CLSI. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts*; 3rd ed. CLSI standard M27. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008b.

COÊLHO, I.C.B.; GADELHA, J.B.; CÂMARA, L.M.C. Estudo sobre a paracoccidioidomicose no Estado do Ceará: análise preliminar da paracoccidioidomicose-infecção, utilizando reações intradérmicas com paracoccidioidina e histoplasmina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 19, p. 97-98, 1986.

COLLINS, T.J. ImageJ for microscopy. **Biotechniques**, v. 43, p. 25-30, 2007.

COLOMBO, A.L.; TOBÓN, A.; RESTREPO, A.; QUEIROZ-TELLES, F.; NUCCI, M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. **Medical Mycology**, v. 49; p. 785-798, 2011.

CONANT, N.F. Cultural study of the life-cycle of *histoplasma capsulatum* darling 1906. **Journal of Bacteriology**, v. 41, p. 563-579, 1941.

CORDEIRO, R.A.; MARQUES, F.J.; BRILHANTE, R.S.N.; SILVA, K.R.C.; MOURÃO, C.I.; CAETANO, E.P.; FECHINE, M.A.; RIBEIRO, J.F.; CASTELO-BRANCO, D.S.; LIMA, R.A.; MESQUITA, J.R.; MONTEIRO, A.J.; ROCHA, F.A.; ROCHA, M.F.; SIDRIM, J.J. Synergistic effect of antituberculosis drugs and azoles in vitro against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, p. 4482-4484, 2011.

CORDEIRO, R.A.; SERPA, R.; ALEXANDRE, F.U.C; MARQUES, F.J.F; MELO, C.V.S.; FRANCO, J.S.; EVANGELISTA, J.J.A; CAMARGO, Z.P.; BRILHANTE, R.S.N.; ROCHA, M.F.G; MOREIRA, J.L.B.; BANDEIRA, T.J.P.G; SIDRIM, J.J.C. *Trichosporon inkin* biofilms produce extracellular proteases and exhibit resistance to antifungals. **Journal Medical Microbiology**, v. 64, p. 1277-1286, 2015.

COSTA-ORLANDI, C.B.; SARDI, J.C.O.; PITANGUI, N.S.; OLIVEIRA, H.C.; SCORZONI, L.; GALEANE, M.C.; MEDINA-ALARCÓN, K.P.; MELO, W.C.M.A.; MARCELINO, M.Y.; BRAZ, J.D.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Fungal Biofilms and Polymicrobial Diseases. **Journal of Fungi**, v. 3, E22, 2017. doi: 10.3390/jof3020022.

COUPPIE, P.; SOBESKY, M.; AZNAR, C.; BICHAT, S.; CLYTI, E.; BISSUEL, F.; GUEDJ, M.; ALVAREZ, F.; DEMAR, M.; LUOVEL, D.; PRADINAUD, R.; CARME, B. Histoplasmosis and acquired immunodeficiency syndrome: a study of prognostic factors. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 134-138, 2004.

DAHER, E.F.; BARROS, F.A.S.; SILVA JÚNIOR, 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. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, p. 600-603, 2006.

DAHER, E.F.; SILVA-JR, 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. **Tropical Medicine & International Health**, v. 12, p. 1108-1115, 2007.

DAMASCENO, L.S.; LEITÃO, T.M.; TAYLOR, M.L.; MUNIZ, M.M.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M. The use of genetic markers in the molecular epidemiology of histoplasmosis: a systematic review. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious**, v. 35, p. 19-27, 2016.

DAMASCENO, L.S.; NOVAES JR, A.R.; ALENCAR, C.H.; LIMA, D.T.; SIDRIM, J.J.; GONÇALVES, M.V.; MESQUITA, J.R.; LEITÃO, T.M. Disseminated histoplasmosis and aids: relapse and late mortality in endemic area in North-Eastern Brazil. **Mycoses**, v. 56, p. 520-526, 2013.

DAMASCENO, L.S.; RAMOS, A.N.; ALENCAR, C.H.; GONÇALVES, M.V.; MESQUITA, J.R.; SOARES, A.T.; COUTINHO, A.G.; DANTAS, C.C.; LEITÃO, T.M. Disseminated histoplasmosis in HIV-infected patients: determinants of relapse and mortality in a north-eastern area of Brazil. **Mycoses**, v. 57, p. 406-413, 2014.

DANTAS, K.C.; FREITAS, R.S.; SILVA, M.V.; CRIADO, P.R.; LUIZ, O.D.C.; VICENTINI, A.P. Comparison of diagnostic methods to detect *Histoplasma capsulatum* in serum and blood samples from AIDS patients. **PLoS One**, v. 13, e0190408, 2018.

DARLING, S.T. A protozoön general infection producing pseudotubercles in the lung and focal necroses in the liver, spleen and lymphonodes. **Journal of the American Medical Association**, v. 46, p. 1283-1285, 1906.

DARLING, S.T. The morphology of the parasite (*Histoplasma capsulatum*) and the lesions of histoplasmosis, a fatal disease of tropical america. **Journal of Experimental Medicine**, v.11, p. 515-531, 1909.

DAVIS, L.E; COOK, G; COSTERTON, J.W. Biofilm on Ventriculo-Peritoneal Shunt Tubing as a Cause of Treatment Failure in Coccidioidal Meningitis. **Emerging Infectious Diseases journal**, v. 8, p. 376-379, 2002.

DENNING, D.W. Minimizing fungal disease deaths will allow the UNAIDS target of reducing annual AIDS deaths below 500 000 by 2020 to be realized. **Biological sciences Royal Society**, v. 371, p. 1-10, 2016.

DE MONBREUM, W.A. The Cultivation and cultural characteristics of darling's histoplasma capsulatum. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 14, p. 93-125, 1934.

DEUS FILHO, A.; WANKE, B.; CAVALCANTI, M.A.S.; MARTINS, L.M.S., CASTELO BRANCO, A.D. Histoplasmosis in the northeast of Brazil. Report of three cases. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v.15, p. 109-114, 2009.

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). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 32; p.116-120, 1990.

EDWARDS, J.A.; ALORE, E.A.; RAPPLEYE, C.A. The yeast-phase virulence requirement for α -glucan synthase differs among *Histoplasma capsulatum* chemotypes. **Eukaryot Cell**, v. 10, p. 87-97, 2011.

EDWARDS, P.Q.; BILLINGS, E.L. Worldwide pattern of skin sensitivity to histoplasmin. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 20, p. 288-319, 1971.

ELIÁS, N.A.; CUESTAS, M.L.; SANDOVAL, M.; POBLETE, G.; LOPEZ-DANERI, G.; JEWTOUCHOWICZ, V.; IOVANNITTI, C.; MUJICA, M.T. Rapid identification of *Histoplasma capsulatum* directly from cultures by multiplex PCR. **Mycopathologia**, v. 174, p. 451-456; 2012.

EMMONS, C. W. Histoplasmosis in animals. **Public Health Monograph**, v. 39, p.272-273, 1956.

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

ESPINEL-INGROFF, A.; ABREU, D.P.B.; ALMEIDA-PAES, R.; BRILHANTE, R.S.N.; CHAKRABARTI, A.; CHOWDHARY, A.; HAGEN, F.; CÓRDOBA, S.; GONZALEZ, G.M.; GOVENDER, N.P.; GUARRO, J.; JOHNSON, E.M.; KIDD, S.E.; PEREIRA, S.A.; RODRIGUES, A.M.; ROZENTAL, S.; SZESZS, M.W.; BALLESTÉ, R.; BONIFAZ, A.; BONFIETTI, L.X.; BORBA-SANTOS, L.P.; CAPILLA, J.; COLOMBO, A.L.; DOLANDE, M.; ISLA, M.G.; MELHEM, M.S.C.; MESA-ARANGO, A.C.; OLIVEIRA, M.M.E.; PANIZO, M.M.; CAMARGO, Z.P.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; MEIS, J.F.; TURNIDGE, J. Multicenter, International Study of MIC/MEC Distributions for Definition of Epidemiological Cutoff Values for *Sporothrix* Species Identified by Molecular Methods. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 61, p. e01057-17, 2017.

ESPINEL-INGROFF, A.; CHAKRABARTI, A.; CHOWDHARY, A.; CORDOBA, S.; DANNAOUI, E.; DUFRESNE, P.; FOTHERGILL, A.; GHANNOUM, M.; GONZALEZ, G.M.; GUARRO, J.; KIDD, S.; LASS-FLÖRL, C.; MEIS, J.F.; PELAEZ, T.; TORTORANO, A.M.; TURNIDGE, J. Multicenter evaluation of MIC distributions for epidemiologic cutoff value definition to detect amphotericin B, posaconazole, and itraconazole resistance among the most clinically relevant species of *Mucorales*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, p. 1745-1750, 2015a.

ESPINEL-INGROFF, A.; COLOMBO, A.L.; CORDOBA, S.; DUFRESNE, P.J.; FULLER, J.; GHANNOUM, M.; GONZALEZ, G.M.; GUARRO, J.; KIDD, S.E.; MEIS, J.F.; MELHEM, T.M.; PELAEZ, T.; PFALLER, M.A.; SZESZS, M.W.; TAKAHASCHI, J.P.; TORTORANO, A.M.; WIEDERHOLD, N.P.; TURNIDGE, J. International Evaluation of MIC Distributions and Epidemiological Cutoff Value (ECV) Definitions for *Fusarium* Species Identified by Molecular Methods for the CLSI Broth Microdilution Method. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 60, p. 1079-1084, 2015b.

ESPINEL-INGROFF, A.; CUENCA-ESTRELLA, M.; FOTHERGILL, A.; FULLER, J.; GHANNOUM, M.; JOHNSON, E.; PELAEZ, T.; PFALLER, M.A.; TURNIDGE, J. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, p. 5150-5154, 2011.

ESPINEL-INGROFF, A.; PFALLER, M.A.; BUSTAMANTE, B.; CANTON, E.; FOTHERGILL, A.; FULLER, J.; GONZALEZ, G.M.; LASS-FLÖRL, C.; LOCKHART, S.R.; MARTIN-MAZUELOS, E.; MEIS, J.F.; MELHEM, M.S.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PELAEZ, T.; SZESZS, M.W.; ST-GERMAIN, G.; BONFIETTI, L.X.; GUARRO, J.; TURNIDGE, J. Multilaboratory study of epidemiological cutoff values for detection of resistance in eight *Candida* species to fluconazole, posaconazole, and voriconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, p. 2006-2012, 2014.

ESPINEL-INGROFF, A.; TURNIDGE, J. The role of epidemiological cutoff values (ECVs/ECOFFs) in antifungal susceptibility testing and interpretation for uncommon yeasts and moulds. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 33, p. 63-75, 2016.

ESPINEL-INGROFF, A.; PFALLER, M.A. Susceptibility test methods: Yeast and filamentous fungi. In: MURRAY PR.; BARON EJ, JORGENSEN JH, PFATTER MA, YOLKEN RH. **Manual of Clinical Microbiology**. 9th edition, Washington, ASM Press. 2007.

EUCAST. EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. Disponível em <http://www.eucast.org/>. Acesso em 20 de dezembro de 2017.

FALCI, D.R.; HOFFMANN, E.R.; PASKULIN, D.D.; PASQUALOTTO, A.C. Progressive disseminated histoplasmosis: a systematic review on the performance of non-culture-based diagnostic tests. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, p. 7-11, 2017.

FERRARA, G.; PANIZO, M.M.; ALARCÓN, V.; GARCÍA, N.; DOLANDE, M. *Cryptococcus neoformans* Epidemiological Cutoff Values. **Current Fungal Infection Reports**, v. 11, p. 163-170, 2017.

FERREIRA, M.S.; BORGES, A.S. Histoplasmosose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42; p.192-198, 2009.

GAGO, S.; ESTEBAN, C.; VALERO, C.; ZARAGOZA, O.; BELLACASA, J.P.; BUITRAGO, M.J. A multiplex real-time PCR assay for identification of *Pneumocystis jirovecii*, *Histoplasma capsulatum*, and *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* in samples from AIDS patients with opportunistic pneumonia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, p.1168-1176, 2014.

GARFOOT, A.L.; RAPPLEYE, C.A. *Histoplasma capsulatum* surmounts obstacles to intracellular pathogenesis. **FEBS Journal**, v. 283, p. 619-633, 2016.

GEDEFU, L.; YEMANE, T.; SAHLEMARIAM, Z.; YILMA, D. Anemia and risk factors in HAART naive and HAART experienced HIV positive persons in south west Ethiopia: a comparative study. **PLoS One**, v. 8, p. 1-5, 2013.

GOMEZ, B.L. Histoplasmosis: Epidemiology in Latin America. **Current Fungal Infection**

Reports, v. 5, p. 199-205, 2011.

GOMEZ, B.L. Molecular diagnosis of endemic and invasive mycoses: advances and challenges. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, p. 35-41, 2014.

GONZÁLEZ-RAMÍREZ, A.I.; RAMÍREZ-GRANILLO, A.; MEDINA-CANALES, M.G.; RODRÍGUEZ-TOVAR, A.V.; MARTÍNEZ-RIVERA, M.A. Analysis and description of the stages of *Aspergillus fumigatus* biofilm formation using scanning electron microscopy. **BMC Microbiology**, v. 16, p. 243-256, 2016.

GÓRALSKA, K.; BLASZKOWSKA, J.; DZIKOWIEC, M. Neuroinfections caused by fungi. **Infection**, 2018. Doi: 10.1007/s15010-018-1152-2.

GOUGHENOUR, K.D.; BALADA-LLASAT, J.M.; RAPPLEYE, C.A. Quantitative Microplate-Based Growth Assay for Determination of Antifungal Susceptibility of *Histoplasma capsulatum* Yeasts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, p. 3286-3295, 2015.

GOUGHENOUR, K.D.; RAPPLEYE, C.A. Antifungal therapeutics for dimorphic fungal pathogens. **Virulence**, v. 19, p. 1-11, 2016.

GUIMARÃES, A.J.; CERQUEIRA, M.D.; NOSANCHUK, J.D. Surface architecture of *Histoplasma capsulatum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 1-14, 2011.

GULATI, M.; NOBILE, C.J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. **Microbes Infection**, v. 18, p. 310-321, 2016.

GUPTA, A.; GHOSH, A.; SINGH, G.; XESS, I. A Twenty-First-Century Perspective of Disseminated Histoplasmosis in India: Literature Review and Retrospective Analysis of Published and Unpublished Cases at a Tertiary Care Hospital in North India. **Mycopathologia**, v. 182, p. 1077-1093, 2017.

GUTIERREZ, M.E.; CANTON, A.; SOSA, N.; PUGA, E.; TALAVERA, L. Disseminated histoplasmosis in patients with AIDS in Panama: a review of 104 cases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, p. 1199–1202, 2005.

HAGE, C.A.; AZAR, M.M.; BAHR, N.; LOYD, J.; WHEAT, L.J. Histoplasmosis: up-to-date evidence-based approach to diagnosis and management. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v.36, p. 729-745, 2015.

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. Multicenter case-control study of risk factors for histoplasmosis in human immunodeficiency virus-infected persons. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, p. 1215-1220, 2001.

HEYDORN, A.; NIELSEN, A.T.; HENTZER, M.; STERNBERG, C.; GIVSKOV, M.; ERSBOLL, B.K.; MOLIN, S. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. **Microbiology**, v. 146, 2395-2407, 2000.

HUBER, F.; NACHER, M.; AZNAR, C.; PIERRE-DEMAR, M.; EL GUEDJ, M.; 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.

INOJOSA, W.; ROSSI, M.C.; LAURINO, L.; GIOBBIA, M.; FUSER, R.; CARNIATO, A.; FARINA, F.; DE PIERI, M.; BALDASSO, F.; FORNER, G.; SCOTTON, P. Progressive disseminated histoplasmosis among human immunodeficiency virus-infected patients from West-Africa: report of four imported cases in Italy. **Le Infezioni in Medicina**, v. 19, p. 49-55, 2011.

JOHNSON, E.M. Issues in antifungal susceptibility testing. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 1, p. 13-18, 2008.

KARIMI, K.; WHEAT, L.J.; CONNOLLY, P.; CLOUD, G.; HAJJEH, R.; WHEAT, E.; ALVES, K.; LACAZ, S.; KEATH, E. Differences in histoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome in the United States and Brazil. **Journal of Infectious Disease**, v. 186, p. 1655–1660, 2002.

KASUGA, T.; WHITE, T.J.; KOENIG, G.; MCEWEN, J.; RESTREPO, A.; CASTAÑEDA, E.; LACAZ, C.S.; HEINS-VACCARI, E.M.; FREITAS, R.S.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M.; QIN, Z.; NEGRONI, R.; CARTER, D.A.; MIKAMI, Y.; TAMURA, M.; TAYLOR, M.L.; MILLER, G.F.; POONWAN, N.; TAYLOR, J.W. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 3383-3401, 2003.

KATHURIA, S.; SINGH, P.K.; MEIS, J.F.; CHOWDHARY, A. *In vitro* antifungal susceptibility profile and correlation of mycelial and yeast forms of molecularly characterized *Histoplasma capsulatum* strains from India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.58, p. 5613-5616, 2014.

KAUR, S.; SINGH, S. Biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*. **Medical Mycology**, v. 52, p. 2-9, 2014.

KUMAR, A.; ALAM, A.; RANI, M.; EHTESHAM, N.Z.; HASNAIN, S.E. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 307, p. 481-489, 2017.

LAGREE, K.; DESAI, J.V.; FINKEL, J.S.; LANNI, F. Microscopy of fungal biofilms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 43, p. 100-107, 2018.

LEDTKE, C.; TOMFORD, J.W.; JAIN, A.; ISADA, C.M.; VAN-DUIN, D. Clinical presentation and management of histoplasmosis in older adults. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 60, p. 265-270, 2012.

LIMAYE, A.P.; CONNOLLY, P.A.; SAGAR, M.; FRITSCHKE, T.R.; COOKSON, B.T.; WHEAT, L.J.; STAMM, W.E. Transmission of *Histoplasma capsulatum* by organ transplantation. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, p. 1163-1166, 2000.

LIMPER, A.H.; ADENIS, A.; LE, T.; HARRISON, T.S. Fungal infections in HIV/AIDS. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, p. e334-e343, 2017.

LOCKHART, S.R.; GHANNOUM, M.A.; ALEXANDER, B.D. Establishment and use of epidemiological cutoff values for molds and yeasts by use of the Clinical and Laboratory Standards Institute M57 Standard. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, p. 1262-1268, 2017.

LÓPEZ, A.G.D.; ARECHAVALA, A.; IOVANNITTI, C.A.; MUJICA, M.T. Disseminated histoplasmosis in patients with AIDS. Buenos Aires, 2009-2014. **Medicina (B Aires)**, v. 76, p. 332-337, 2016.

LUNARDI, L.W.; WAGNER, R.; SANTOS, C.C.; SEVERO, A.T.; FERREIRA, J.A. Complete blood count alterations in disseminated histoplasmosis. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 37, p. 263-265, 2015.

MARTINEZ, L.R.; CASADEVALL, A. Biofilm Formation by *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology Spectrum**, v. 3, p. 1-11, 2015.

MODAK, D.; DUTTA, N.; DE, R.; GUHA, S.K. Clinico-pathological correlation and outcome analysis of disseminated histoplasmosis treated with conventional amphotericin B. **Journal of Infectious Diseases**, v. 5, p. 86-91, 2015.

MORA, D.J.; SANTOS, C.T.; SILVA-VERGARA, M.L. Disseminated histoplasmosis in acquired immunodeficiency syndrome patients in Uberaba, MG, Brazil. **Mycoses**, v. 51, p. 136-140, 2008.

MUNIZ, M.M.; TAVARES, P.M.S.; MEYER, W.; NOSANCHUK, J.D.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M. Comparison of different DNA-based methods for molecular typing of *Histoplasma capsulatum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 4438-4447, 2010.

MURAOSA, Y; TOYOTOME, T; YAHIRO, M; WATANABE, A; SHIKANAI-YASUDA, MA; KAMEI, K. Detection of *Histoplasma capsulatum* from clinical specimens by cycling probe-based real-time PCR and nested real-time PCR. **Medical Mycology**, v. 54, p. 433-438, 2016.

NACHER, M.; ADENIS, A.; DONALD, S.; GOMES, M.S.M.; SINGH, S.; LIMA, I.L.; LEITE, R.M.; HERMELIJN, S.; WONGSOKARIJO, M.; VAN-EER, M.; SILVA, S.M.; COSTA, M.M.; SILVA, M.; CALVACANTE, M.; LEITAO T.M.J.S.; GÓMEZ, B.L.; RESTREPO, A.; TOBON, A.; CANTEROS, C.E.; AZNAR, C.; BLANCHET, D.; VANTILCKE, V.; VAUTRIN, C.; BOUKHARI, R.; CHILLER, T.; SCHEEL, C.; AHLQUIST, A.; ROY, M.; LORTHOLARY, O.; CARME, B.; COUPPIÉ, P.; VREDEN, S. Disseminated histoplasmosis in HIV-infected patients in South America: a neglected killer continues on its rampage. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, e2319, 2013.

NCBI. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. *Histoplasma*. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/?term=hISTOPLASMA/>. Acesso em 03 de janeiro de 2018.

NGUYEN, V.Q.; SIL, A. Temperature-induced switch to the pathogenic yeast form of *Histoplasma capsulatum* requires *RYP1*, a conserved transcriptional regulator. **Proceedings of**

the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 105, p. 4880-4885, 2008.

OLADELE, R.O.; AYANLOWO, O.O; RICHARDSON, M.D; DENNING, D.W. Histoplasmosis in Africa: An emerging or a neglected disease? **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, e0006046, 2018.

PAIXÃO, G.C.; SIDRIM, J.J.C.; BRILHANTE, R.S.N. Elaboração de meios de cultura em micologia. In: SIDRIM JJC, ROCHA MFG. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p.336-348, 2004.

PAN, B.; CHEN, M.; PAN, W.; LIAO, W. Histoplasmosis: a new endemic fungal infection in China? Review and analysis of cases. **Mycoses**, v. 56, p. 212-221, 2013.

PAULA, A. Microepidemia de histoplasmose. **Revista do Serviço Nacional de Tuberculose**, v. 3, p. 11-20, 1959.

PITANGUI, N.S.; SARDI, J.C.; SILVA, J.F.; BENADUCCI, T., MORAES DA SILVA, R.A., RODRÍGUEZ-ARELLANES, G, TAYLOR, M.L., MENDES-GIANNINI, M.J., FUSCO-ALMEIDA, A.M. Adhesion of *Histoplasma capsulatum* to pneumocytes and biofilm formation on an abiotic surface. **Biofouling**, v. 28, p. 711-788, 2012.

PONTES, L.B.; LEITÃO, T.M.; LIMA, G.G.; GERHARD, E.S.; FERNANDES, T.A. Clinical and evolutionary characteristics of 134 patients with disseminated histoplasmosis associated with AIDS in the State of Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p. 27-31, 2010.

PUTOT, A.; PERRIN, S.; JOLIVET, A.; VANTILCKE, V. HIV-associated disseminated histoplasmosis in western French Guiana, 2002-2012. **Mycoses**, v. 58, p. 160-166, 2015.

RAMANAN, P.; WENGENACK, N.L.; THEEL, E.S. Laboratory diagnostics for fungal infections: a review of current and future diagnostic assays. **Clinics in Chest Medicine**, v. 38, p. 535-554, 2017.

REX, J.H., PFALLER M.A. Has antifungal susceptibility testing come of age? **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, p. 982-989, 2002.

SAAVEDRA, A.; CAMPINHA-BACOTE, N.; HAJJAR, M.; KENU, E.; GILLANI, F.S.; OBO-AKWA, A.; LARTEY, M.; KWARA, A. Causes of death and factors associated with early mortality of HIV-infected adults admitted to Korle-Bu Teaching Hospital. **Pan African Medical Journal**, v. 27, p. 1-7, 2017.

SAMAYOA, B.; ROY, M.; CLEVELAND, A.A.; MEDINA, N.; LAU-BONILLA, D.; SCHEEL, C.M.; GOMEZ, B.L.; CHILLER, T; ARATHOON, E. High Mortality and Coinfection in a Prospective Cohort of Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immune Deficiency Syndrome Patients with Histoplasmosis in Guatemala. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, p. 42-48, 2017.

SANTOS, B.; LANGONI, H.; SILVA, R.C.; MENOZZI, B.D.; BOSCO, S.M.G.; PAIZ, L.M.; AUGUSTO, L.C.R.; RICHINI-PEREIRA, V.B. Molecular detection of *Histoplasma*

capsulatum in insectivorous and frugivorous bats in Southeastern Brazil. **Medical Mycology**, 2017. Doi: 10.1093/mmy/myx138.

SARDI, J.C.; PITANGUI, N.S.; RODRÍGUEZ-ARELLANES, G.; TAYLOR, M.L.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; MENDES-GIANNINI, M.J. Highlights in pathogenic fungal biofilms. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, p.22-29, 2014.

SARDI, J.C.; PITANGUI, N.S.; VOLTAN, A.R.; BRAZ, J.D.; MACHADO, M.P.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; MENDES-GIANNINI, M.J. In vitro *Paracoccidioides brasiliensis* biofilm and gene expression of adhesins and hydrolytic enzymes. **Virulence**, v. 6, p. 642-651, 2015.

SAV, H.; RAFATI, H.; ÖZ, Y.; DALYAN-CILO, B.; ENER, B.; MOHAMMADI, F.; ILKIT, M.; DIEPENINGEN, A.D.; SEYEDMOUSAVI, S. Biofilm Formation and Resistance to Fungicides in Clinically Relevant Members of the Fungal Genus *Fusarium*. **Journal of Fungi**, v. 23, p. E16, 2018. Doi: 10.3390/jof4010016.

SEPÚLVEDA, V.E.; MÁRQUEZ, R.; TURISSINI, D.A.; GOLDMAN, W.E.; MATUTE, D.R. Genome Sequences Reveal Cryptic Speciation in the Human Pathogen *Histoplasma capsulatum*. **MBio**, v. 8, e01339-17, 2017.

SESA. Secretaria de Saúde do Estado do Ceará. **Boletim Epidemiológico HIV/AIDS**. Ceará: Secretaria da Saúde do Estado do Ceará, Núcleo de Vigilância Epidemiológica, Ano 2017.

SHEN, Q.; RAPPLEYE, C.A. Differentiation of the fungus *Histoplasma capsulatum* into a pathogen of phagocytes. **Current Opinion in Microbiolog**, v. 40, p. 1-7, 2017.

SHERRY, L.; RAMAGE, G.; KEAN, R.; BORMAN, A.; JOHNSON, E.M.; RICHARDSON, M.D.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R. Biofilm-Forming Capability of Highly Virulent, Multidrug-Resistant *Candida auris*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, p. 328-331, 2017.

SILVA, M.L.Q. Efeito inibitório, *in vitro*, do iodeto de potássio e da miltefosina frente a cepas do complexo *Sporothrix schenckii* em biofilme nas formas filamentosa e leveduriforme. Fortaleza, Ceará: Universidade Federal do Ceará, 2017a.

SILVA, T.C.; TREMÉA, C.M.; ZARA, A.L.; MENDONÇA, A.F.; GODOY, C.S.; COSTA, C.R.; SOUZA, L.K.; SILVA, M.R. Prevalence and lethality among patients with histoplasmosis and AIDS in the Midwest Region of Brazil. **Mycoses**, v. 60, p. 59-65, 2017b.

SINGHAL, D.; BAKER, L.; WORMALD, P.J.; TAN, L. *Aspergillus fumigatus* biofilm on primary human sinonasal epithelial culture. **American Journal of Rhinology & Allergy**, v. 25, p. 219-225, 2011.

SOLDINI, S.; POSTERARO, B.; VELLA, A.; CAROLIS, E.; BORGHI, E.; FALLENI, M.; LOSITO, A.R.; MAIURO, G.; TRECARCHI, E.M.; SANGUINETTI, M.; TUMBARELLO, M. Microbiologic and clinical characteristics of biofilm-forming *Candida parapsilosis* isolates associated with fungaemia and their impact on mortality. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 743, p. 771-777, 2017.

TALBOT, N.J. Nucleic acid isolation and analysis. In: TALBOT, N. **Molecular and Cellular Biology of Filamentous Fungi**. New York, Oxford University Press, 2001, p.23-31.

TEIXEIRA, M.M.; PATANÉ, J.S.; TAYLOR, M.L.; GÓMEZ, B.L.; THEODORO, R.C.; DE HOOG, S.; ENGELHALER, D.M.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; FELIPE, M.S.; BARKER, B.M. Worldwide phylogenetic distributions and population dynamics of the genus *Histoplasma*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, p.1-20, 2016.

VILLELA, E.; PARA, M. Histoplasmose em criança no Estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Biologia.**, v.1, p. 449-456, 1941.

VILLENA, G.K.; GUTIÉRREZ-CORREA, M. Morphological patterns of *Aspergillus niger* biofilms and pellets related to lignocellulolytic enzyme productivities. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 231-237, 2007.

VITE-GARÍN, T.; ESTRADA-BÁRCENAS, D.A.; CIFUENTES, J.; TAYLOR, M.L. The importance of molecular analyses for understanding the genetic diversity of *Histoplasma capsulatum*: an overview. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, p. 11-15, 2014.

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, L.J.; AZAR, M.M.; BAHR, N.C.; SPEC, A.; RELICH, R.F.; HAGE, C. Histoplasmosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, p. 207-227, 2016.

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. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, p. 1235-1239, 2006.

WHEAT, L.J.; CONNOLLY, P.; SMEDEMA, M.; ROGERS, P.D. Antifungal drug resistance in histoplasmosis. **Antimicrobial Drug Resistance**, p. 987-992, 2009.

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. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, p. 807-825, 2007.

WOODS, J.P. Revisiting old friends: Developments in understanding *Histoplasma capsulatum* pathogenesis. **Journal of Microbiology**, v. 54, p. 265-276, 2016.

ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; TAVARES, P.M.S.; MUNIZ, M.M. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains in Brazil. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 45, p. 443-449, 2005.

ZARLASHTA, F.; RAMADANA, M.; ALMOADHENA, M.; LINA, K.; KHAJAA, M.; BASIRA, R. Lactate Dehydrogenase and Ferritin Levels: A Clinical Clue for Early Diagnosis of Disseminated Histoplasmosis in HIV Patients. **Journal of Medical Cases**, v. 7, p. 81-83, 2016.

APÊNDICE A - MEIOS DE CULTURA

Yeast Nitrogen Base (Difco)

Composição	Gramas/litro
Sulfato de amônia	5,0
L-Histidina HCl	0,01
LD-Metionina	0,02
LD-tryptofano	0,02
Biotina	0,000002
Pantotenato de cálcio	0,0004
Ácido fólico	0,000002
Niacina	0,0004
Ácido p-aminobenzóico	0,0002
Piridoxina HCl	0,0004
Riboflavina	0,0002
Tiamina HCl	0,0004
Inositol	0,002
Ácido bórico	0,0005
Sulfato de cobre	0,00004
Iodeto de potássio	0,0001
Cloreto férrico	0,0002
Sulfato de manganês	0,0004
Molibdato de sódio	0,0002
Sulfato de zinco	0,0004
Fosfato de potássio monobásico	1,0
Sulfato de magnésio	0,5
Cloreto de sódio	0,1
Cloreto de cálcio	0,1
Glicose	2,0

Uréia rápida em caldo

Composição	Gramas/litro
Extrato de levedura	0,1
Fosfato monopotássico	0,091
Fosfato disódico	0,095
Uréia	20
Vermelho fenol	0,01
Glicose	2,0

RPMI 1640 com glutamina e sem bicarbonato de sódio

Composição	Gramas/litro
L-arginina	0.2
L-asparagina	0.05
Ácido L-Aspártico	0.02
L-cistina • 2HCl	0.0652
Ácido L-Glutâmico	0.02
L-Glutamina	0.3
Glicina	0.01
L-Histidina	0.015
Hidroxi-L-prolina	0.02
L-isoleucina	0.05
L-Leucina	0.05
L-Lisina • HCl	0.04
L-metionina	0.015
L-fenilalanina	0.015
L-prolina	0.02
L-Serine	0.03
L-Treonina	0.02
L-triptofano	0.005
L-tirosina • 2Na • 2H ₂ O	0.02883
L-valina	0.02
Biotina	0.0002
Cloreto de Colina	0.003
Ácido fólico	0.001
mio-inositol	0.035
Niacinamida	0.001
Ácido D-Pantothenic Hemicalcium	0.00025
PABA	0.001
Piridoxina • HCl	0.001
Riboflavina	0.0002
Tiamina • HCl	0.001
Vitamina B12	0.000005
Nitrato de cálcio • 4 H ₂ O	0.1
Sulfato de Magnésio	0.04884
Cloreto de potássio	0.4
Cloreto de Sódio	6.0
Fosfato de sódio dibásico	0.8
Glicose	2.0
Glutathiona Reduzida	0.001
Vermelho de fenol	0.0053

APÊNDICE B – FICHA PARA COLETA DE DADOS

Questionário n°:	Óbito () Data: ___/___/___	
Prontuário n°:		
Nome:		Iniciais:
Data do nascimento: ___/___/___	Idade:	Sexo: F () M ()
Procedência:	Ocupação:	Escolaridade:
DADOS SIDA:		
Diagnóstico de HIV ___/___/___	Antes da HM () Durante HM ()	
Diagnóstico de SIDA ___/___/___	Antes da HM () Durante HM ()	
Uso da TARV	Sim: () Regular () Irregular	Não ()
DADOS HISTOPLASMOSE		
Data do internamento ___/___/___	Data da alta ___/___/___	Período de internação:
Diagnóstico de HM ___/___/___		
Internações anteriores por HM ()		
Em UTI ()		
SINAIS E SINTOMAS:		
Adinamia ()	Dor torácica ()	Vômitos ()
Anorexia ()	Febre ()	Esplenomegalia* ()
Cefaleia ()	Mialgia ()	Septicemia ()
Dispneia ()	Perda de peso ()	Linfadenopatia* ()
Diarreia ()	Tosse () Produtiva ()	Hepatomegalia* ()
Lesões de pele ()	Sintomas meníngeos* ()	Sintomas respiratórios* Roncos ()
Tipo:	Qual(is):	Estertores () Sibilos () Sopro Tubário ()
		Outro:
Pesquisa para Histoplasma:		
Positiva () Negativa ()	Outros sinais e sintomas:	
Material:	Doenças Associadas:	
Creme leucocitário ()	Infecções Associadas:	
Aspirado medular ()		
Sangue ()		
Outro () Qual:		
Cultura para Histoplasma:		
Positiva () Negativa ()	Raio -x de Tórax:	
Material:	Normal ()	
Creme leuc. ()	Infiltrado intersticial ()	
Aspirado medula ()	Infiltrado alveolar ()	
Sangue ()	Infiltrado reticulo-nodular ()	
Outros () Qual:	Infiltrado misto ()	
	Derrame pleural ()	
	Infiltrado focal ()	
	Infiltrado difuso ()	
	Alterações mediastinais ()	
	Granuloma calcificado ()	
	Linfoadenopatia mediastinal ()	
	Outro () Qual:	
	Alterações Cardíacas ()	
	Qual(is):	

EXAMES LABORATORIAIS

	Valor	Data
Hemoglobina		
Hematócrito		
Leucócitos		
Plaquetas		
TGO/AST		
TGP/ALT		
LDH		
Uréia		
Creatinina		
FAL		
CD4 (cels/ug)		
Carga viral		

Outros Exames Alterados:**Internações posteriores por HM () Quantas:****Data:** ____ / ____ / ____

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

ESTADO DO CEARÁ
SECRETARIA DA SAÚDEHOSPITAL SÃO JOSÉ DE
DOENÇAS INFECCIOSAS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP-HSJ)

Referente ao Protocolo nº. 029/2007

Folha de Rosto: 155460

Título do Projeto: “Diagnóstico, teste de sensibilidade antifúngica e análise gênica de cepas de *Histoplasma capsulatum* isoladas de quadros primários e recidivante de histoplasmose em pacientes HIV+ no Estado do Ceará”

Instituições envolvidas: Hospital São José de Doenças Infecciosas (HSJ)
Hospital Universitário Walter Cantídio

Pesquisadora responsável: Maria Auxiliadora Bezerra Fachine

PARECER CONSUBSTANCIADO

Analisamos o Adendo do projeto em questão, na reunião ordinária de 08 de maio de 2015 cujo objetivo é a extensão do projeto referente ao período de 2011 a 2015. Trata-se de um estudo que tem como objetivo conhecer o perfil genético e fenotípico de cepas de *H. capsulatum* em pacientes em HIV+ no Estado do Ceará e verificar se as cepas podem exibir o fenômeno de microevolução in vitro, correlacionando essa característica in vivo, nos pacientes com recidivas. Para tal, será realizado estudo prospectivo em pacientes com AIDS que tiver diagnóstico ou suspeita clínica e laboratorial de AIDS ou histoplasmose disseminada internados no Hospital São José e Hospital Universitário Walter Cantídio. Para coleta dos dados será utilizado questionário com perguntas fechadas coletadas em prontuário e ao paciente referente a dados sociodemográficos, epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. Após a identificação dos pacientes serão colhidos espécimes, (medula óssea, creme leucocitário e soro) e encaminhado para Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) da Universidade Federal do Ceará. O questionário e o Consentimento Livre e Esclarecido encontram-se em anexo.

Trata-se de um estudo relevante no sentido de caracterizar o perfil fenotípico e gênico das cepas de *H. capsulatum* isolados em pacientes com AIDS no Ceará, fenômeno desconhecido, tratando-se de uma doença endêmica no Estado do Ceará. Será conduzido por profissionais com vasta experiência em pesquisa e na temática. Entretanto.

Diante do exposto, o Adendo do projeto foi considerado **APROVADO**. Lembramos a necessidade de enviar relatório ao término da pesquisa.

Fortaleza, 26 de maio de 2015.


Dra. Melissa Soares Medeiros
Coordenadora do CEP/HSJ

DRª MELISSA SOARES MEDEIROS
INFECTOLOGISTA
CRM - 7098

ANEXO B – PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS ORIGINADAS A PARTIR DO TRABALHO

“RYP1 gene as a target for molecular diagnosis of histoplasmosis”.

Brilhante RS, Guedes GM, Riello GB, Ribeiro JF, Alencar LP, Bandeira SP, Castelo-Branco DS, Oliveira JS, Freire JM, Mesquita JR, Camargo ZP, Cordeiro RA, Rocha MF, Sidrim JJ.

Journal of Microbiological Methods

“A proposal for antifungal epidemiological cut-off values against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* based on the susceptibility of isolates from HIV-infected patients with disseminated histoplasmosis in Northeast Brazil”.

Brilhante RSN, Guedes GMM, Silva MLQD, Castelo-Branco DSCM, Cordeiro RA, Sidrim JJC, Rocha MFG.

International Journal of Antimicrobial Agents



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmicmeth

Note

RYP1 gene as a target for molecular diagnosis of histoplasmosis

Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante^{a,*}, Gláucia Morgana de Melo Guedes^a, Giovanna Barbosa Riello^a, Joyce Fonteles Ribeiro^a, Lucas Pereira Alencar^a, Silviane Praciano Bandeira^a, Débora Souza Collares Maia Castelo-Branco^a, Jonathas Sales Oliveira^a, Janaína Maria Maia Freire^a, Jacó Ricarte Lima de Mesquita^b, Zoilo Pires de Camargo^c, Rossana de Aguiar Cordeiro^a, Marcos Fábio Gadelha Rocha^{a,d}, José Júlio Costa Sidrim^a

^a Specialized Medical Mycology Center, Postgraduate Program in Medical Microbiology, Department of Pathology and Legal Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^b São José Hospital, Fortaleza, Ceará, Brazil

^c Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^d College of Veterinary Medicine, Postgraduate Program in Veterinary Sciences, State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 June 2016

Received in revised form 8 September 2016

Accepted 9 September 2016

Available online 13 September 2016

Keywords:

Histoplasmosis

Molecular diagnosis

RYP1

ABSTRACT

This study analyzed the *RYP1* gene as a target for the molecular diagnosis of histoplasmosis. This assay detected fungal DNA in 13/13 blood samples from HIV/AIDS-patients with histoplasmosis. Therefore, the detection of *RYP1* gene in whole blood sample is a quick and sensitive test to diagnose histoplasmosis.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Histoplasma capsulatum is a dimorphic fungus with a worldwide distribution that causes histoplasmosis. The gold standard for the diagnosis of this disease is the isolation of the fungus from clinical specimens. However, the recovery of this microorganism is time consuming, requiring approximately 15 days for the growth of the fungal colony (Almeida et al., 2016; Buitrago et al., 2013). Moreover, the culture-based diagnosis is a risk for laboratory workers and requires facilities with biosafety level 3 (Brilhante et al., 2012a; Guimarães et al., 2008). Molecular methods based on PCR techniques for the detection of fungal DNA have been developed for the rapid diagnosis of histoplasmosis (Highland et al., 2011; Muraosa et al., 2015).

However, target sequences must be carefully selected to enhance diagnostic sensitivity and specificity. Schumacher et al. (2013), for instance, detected fungal DNA from formalin-fixed paraffin embedded tissue samples, using a newly described pair of primers, and Guedes et al. (2003) confirmed the identification of *H. capsulatum* cultures, using primers for the antigen M encoding gene. Both methodologies presented high sensitivity and specificity. In this study, a different approach was proposed by applying a PCR assay for the detection of the transcriptional regulator gene *RYP1* for the molecular identification of *H. capsulatum* cultures and rapid detection of fungal DNA from blood samples, which

are the clinical specimen of choice for the diagnosis of disseminated histoplasmosis.

Eighteen clinical strains of *H. capsulatum* var. *capsulatum* (2 from feline cases and 16 from human cases) from the fungal collection of the Specialized Medical Mycology Center of the Federal University of Ceará, Brazil, were evaluated, and other microorganisms were included in the analysis as controls (Table 1). *H. capsulatum* var. *duboisii* and *H. capsulatum* var. *farciminosum* have not been reported in the region of study, therefore, these varieties were not included in this research. All procedures involving fungal manipulation were performed in a biosafety level 3 laboratory. Additionally, 15 whole blood specimens from HIV/AIDS-patients with confirmed histoplasmosis by mycological diagnosis were included in this study. A blood sample from a patient with mycological diagnosis of coccidioidomycosis and five blood samples from healthy volunteers were used as negative control. The study was approved by the ethics committee of the São José Hospital (Protocol 029/2007).

DNA was extracted as described by Talbot (2001), using cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and sonication in Precellys® (Bertin Technologies, France) for cell lysis. For *RYP1* gene amplification, the primers OAS1057 (5'-ACCCTTGCAGCTTACAACCT-3') and OAS1058 (5'-TCCGTCCATCGCTTAATACC-3') were used (Nguyen and Sil, 2008), and PCR mix was prepared according to Brilhante et al. (2012b). DNA-free controls were included. PCR cycles were performed, as follows: initial denaturation at 95 °C for 2 min, followed by 10 cycles at 95 °C for

* Corresponding author at: Rua Barão de Canindé, 210, Montese, CEP: 60.425-540, Fortaleza, CE, Brazil.

E-mail address: brilhante@ufc.br (R.S.N. Brilhante).



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijantimicag

Short Communication

A proposal for antifungal epidemiological cut-off values against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* based on the susceptibility of isolates from HIV-infected patients with disseminated histoplasmosis in Northeast Brazil

Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante^{a,*}, Glaucia Morgana de Melo Guedes^a,
 Maria Lucilene Queiroz da Silva^a, Débora Souza Collares Maia Castelo-Branco^a,
 Rossana de Aguiar Cordeiro^a, José Júlio Costa Sidrim^a, Marcos Fábio Gadelha Rocha^{a,b}

^a Specialized Medical Mycology Center, Postgraduate Program in Medical Microbiology, Department of Pathology and Legal Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^b College of Veterinary Medicine, Postgraduate Program in Veterinary Sciences, State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 December 2017

Accepted 21 March 2018

Available online xxx

Keywords:

Histoplasma capsulatum

Antifungal drugs

Susceptibility

Epidemiological cut-off values

ABSTRACT

Epidemiological cut-off values (ECVs) have been used as a tool to detect the acquisition of resistance mechanisms to antifungal drugs. In this context, the objective of this study was to determine the ECVs for classic antifungals against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients with a diagnosis of disseminated histoplasmosis. First, minimum inhibitory concentrations (MICs) for amphotericin B (AmB), itraconazole (ITR), fluconazole (FLU), voriconazole (VCZ) and caspofungin (CAS) were determined against 138 *H. capsulatum* isolates in the filamentous form by the broth microdilution method; antifungal ECVs were then calculated. MIC ranges were 0.0078–1 µg/mL for AmB, 0.0005–0.0625 µg/mL for ITR, 2 to ≥256 µg/mL for FLU, 0.0078–1 µg/mL for VCZ and ≤0.0156 to ≥32 µg/mL for CAS. The obtained ECVs were 0.5, 0.0313, 128, 0.5 and 16 µg/mL for AmB, ITR, FLU, VCZ and CAS, respectively. The percentage of wild-type isolates was 96.4% for AmB, 98.6% for ITR and 99.3% for FLU, VCZ and CAS. Although these results do not cover all phylogenetic species of *H. capsulatum*, they bring important information on strains from Brazil. In addition, the assessed isolates were from HIV-positive patients, which may not reflect the antifungal ECVs against isolates from immunocompetent individuals or from other sources. Finally, this study pioneers the initiative of establishing ECVs for five antifungal agents against *H. capsulatum* var. *capsulatum*, providing a criterion for the interpretation of susceptibility results as well as a monitoring strategy for the emergence of antifungal resistance.

© 2018 Elsevier B.V. and International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

Histoplasmosis is a systemic mycosis caused by the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum* that is endemic in Africa, Asia and in some areas of North, Central and South America [1]. In Latin America, this disease has been considered one of the most common opportunistic fungal infections in human immunodeficiency virus (HIV)-positive individuals, presenting a high case fatality rate [2]. In the state of Ceará, Northeast Brazil, histoplasmosis has been described as the first manifestation of acquired immune deficiency syndrome (AIDS) in ca. 40% of HIV-positive patients, causing dis-

seminated infection [3,4]. Despite its nephrotoxic potential, amphotericin B (AmB) is the drug of choice for individuals with disseminated histoplasmosis, whilst the use of itraconazole (ITR) is recommended during the maintenance phase of the treatment and in less severe cases of the disease [5].

In order to guide antifungal therapies against infections by some fungi, in vitro susceptibility tests have been standardised and clinical breakpoints have been established for the categorisation of isolates into susceptible or resistant [6]. Susceptibility tests have been performed with *H. capsulatum* [3,7,8], but clinical breakpoints have not been determined yet.

The establishment of clinical breakpoints requires a frequency distribution analysis of minimum inhibitory concentration (MIC) values; pharmacokinetic/pharmacodynamic data; and clinical treatment follow-up and analysis of the therapeutic response. However,

* Corresponding author. Present address: Rua Barão de Canindé 210, Montese, CEP: 60.425-540, Fortaleza, CE, Brazil. Fax: +55 85 3366 8303.

E-mail address: samiabrilhante@gmail.com (R.S.N. Brilhante).

<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.03.017>

0924-8579/© 2018 Elsevier B.V. and International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

Please cite this article as: R.S.N. Brilhante et al., A proposal for antifungal epidemiological cut-off values against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* based on the susceptibility of isolates from HIV-infected patients with disseminated histoplasmosis in Northeast Brazil, *International Journal of Antimicrobial Agents* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.03.017>