



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

JOYCE FONTELES RIBEIRO

***Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*: TAXA DE
CONVERSÃO *IN VITRO*, DETECÇÃO DO GENE *ryp1* E
ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE CEPAS
BRASILEIRAS**

Fortaleza/Ce

2012

Joyce Fonteles Ribeiro

***Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*: TAXA DE
CONVERSÃO *IN VITRO*, DETECÇÃO DO GENE *ryp1* E
ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE CEPAS
BRASILEIRAS**

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim

Fortaleza/Ce

2012

Joyce Fonteles Ribeiro

***Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*: TAXA DE CONVERSÃO *IN VITRO*,
DETECÇÃO DO GENE *ryp1* E ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE
CEPAS BRASILEIRAS**

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

Aprovada em: 13/12/2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim
Universidade Federal do Ceará

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

Profa. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira
Universidade Estadual do Ceará

Profa. Dra. Tereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira
Faculdade Christus

Profa. Dra. Maria Auxiliadora Bezerra Fechine
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (Unilab)

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus queridos pais,
Francisco e Terezinha, pelo amor incondicional e por
uma vida inteira de dedicação e carinho.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me concedeu a vida e por saber que nada nos é possível se não for da Sua vontade.

À Banca Examinadora, Prof.^a Dr.^a Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, Prof.^a Dr.^a Maria Auxiliadora Bezerra Fachine, Prof.^a Dr.^a Maria Fátima da Silva Teixeira, Prof.^a Dr.^a Tereza de Jesus Pinehiro Gomes Bandeira, por terem aceitado gentilmente participar da avaliação desse trabalho.

Ao Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, meu orientador, pela oportunidade concedida, pela confiança, por toda sua competência e conhecimentos admiráveis e pelas críticas que muito contribuíram para a minha formação profissional.

De modo especial, à Prof.^a Dr.^a Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, minha co-orientadora, agradeço pela confiança, dedicação, orientação e incentivos constantes, por cada um de seus ensinamentos brilhantes e pelo agradável convívio ao longo desses anos.

Ao Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, exemplo de profissionalismo, agradeço por sua imensa dedicação e orientação durante a correção dos artigos científicos.

À Prof.^a Dr.^a Rossana de Aguiar Cordeiro, pelas críticas e sugestões em algumas etapas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro, pela parceria realizada entre o Laboratório de Genética da UFC e o CEMM, possibilitando a execução de parte desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. André Jalles Monteiro, professor Adjunto do Departamento de Matemática e Estatística Aplicada da Universidade Federal do Ceará, pelo estudo estatístico realizado neste trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Tereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira pelo apoio e incentivo nos momentos difíceis.

À todos os professores do Doutorado em Microbiologia Médica – UFC, que contribuíram para minha formação.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de doutorado.

À todos os integrantes do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos técnicos, Terezinha de Jesus dos Santos Rodrigues e Daniel Teixeira Lima, pela amizade e auxílio concedido para a realização dos procedimentos.

Aos meus amigos, João Jaime Giffoni Leite, Juliana Fernandes Pereira, Livia Gurgel do Amaral Valente, Ana Karoline Freire da Costa e Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia, por dividirem os momentos de alegrias, tristezas, preocupações e angústias, pelo apoio e companheirismo ao longo desses anos.

À minha grande amiga Rita Amanda Chaves de Lima, pela amizade, conselhos dados, idéias, dedicação e ajuda em todas as etapas deste trabalho.

À minha família, pela torcida, carinho e apoio em todos os momentos.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas, nos auxiliam muito”.

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

A histoplasmose, causada pelo fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum*, é a mais prevalente das micoses sistêmicas nas Américas, sendo frequentemente observada em pacientes com AIDS. Desde o início da epidemia de HIV, na década de 80, existe um aumento significativo no número de casos de histoplasmose no Estado do Ceará, Nordeste do Brasil. A escassez de dados epidemiológicos dos genótipos que circulam na região Nordeste ressalta a importância de estudos mais detalhados sobre a epidemiologia molecular de *H. capsulatum* nessa região. Diferentes técnicas moleculares têm sido utilizadas para melhor caracterizar o padrão genético de cepas de *H. capsulatum* circulantes no mundo. Vale ressaltar que, grande parte dos estudos de *H. capsulatum* é realizada na sua fase leveduriforme, quando expressa as suas características parasitárias. Assim, o uso de técnicas laboratoriais para a conversão *in vitro* para a fase leveduriforme e sua manutenção é extremamente importante. Diante do exposto, o presente estudo objetivou averiguar a taxa de conversão *in vitro* dos isolados de *H. capsulatum* em seis meios de cultura diferentes, bem como detectar, através da técnica de PCR, a presença do gene *ryp1*, um importante regulador transcricional da conversão da fase filamentosa para leveduriforme. Além disso, visou conhecer o perfil molecular de cepas de *H. capsulatum*, de origem humana e veterinária, oriundas do Estado do Ceará e da região Sudeste do Brasil, através da técnica de RAPD-PCR e avaliar a diversidade genética da região ITS1-5.8S-ITS2 desses isolados comparados com isolados de outros países, através do sequenciamento do DNA ribossômico nuclear. No estudo de conversão *in vitro*, todos os meios testados foram capazes de possibilitar a conversão de fases, contudo, o meio ágar Sabouraud suplementado com 10% de sangue de carneiro mostrou a maior capacidade de conversão em relação aos outros meios testados. O gene *ryp1* foi detectado em 18 cepas de *H. capsulatum* (de origem humana e animal) e em três espécimes clínicos positivos para *H. capsulatum* (sangue total) testados, não sendo detectado, contudo, em isolados de *Candida albicans*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporothrix schenckii* e *Coccidioides posadasii*. A análise da variabilidade genética dos isolados de *H. capsulatum*, pela técnica de RAPD-PCR, permitiu a detecção de dois *clusters* que circulam no Estado do Ceará. O *cluster* 1 incluiu cepas das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil, sendo observado dentro desse *cluster* a separação dos isolados em três subgrupos distintos (subgrupos 1a, 1b e 1c). O *cluster* 2, por sua vez, incluiu somente cepas da região Nordeste do Brasil. Não foram observadas diferenças nas características clínicas e epidemiológicas dos indivíduos cujas cepas pertenciam aos diferentes agrupamentos, obtidos pela técnica de RAPD-PCR. O sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 possibilitou a detecção de dois cladogramas principais. O clado 1 foi constituído da maioria das cepas analisadas, inclusive as cepas da região Nordeste e incluiu isolados de localizações geográficas distintas. O clado 2, por sua vez, foi constituído exclusivamente de isolados oriundos do Estado do Rio de Janeiro. Portanto, pode-se concluir que o ágar Sabouraud suplementado com 10% de sangue de carneiro apresentou maior capacidade de conversão das cepas de *H. capsulatum* em relação aos outros meios testados, podendo ser considerado o meio de escolha para conversão de cepas de *H. capsulatum*. Ademais, o gene *ryp1* pode ser utilizado para identificar isolados de *H. capsulatum*, bem como, detectar a presença do fungo em amostras clínicas, podendo ser utilizado para diagnóstico de histoplasmose. Por fim, os isolados de *H. capsulatum* oriundos do Estado do Ceará podem ser agrupados em dois *clusters* principais, detectados através da técnica de RAPD-PCR. Além disso, a análise filogenética da região ITS1-5.8S-ITS2 revelou que as cepas da região Nordeste apresentaram diferenças genéticas quando comparadas com as cepas de outras regiões brasileiras, ficando agrupadas em um *cluster* diferente das mesmas.

Palavras-chave: epidemiologia molecular, *Histoplasma capsulatum*, conversão *in vitro*

ABSTRACT

Histoplasmosis, caused by the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*, is the most prevalent systemic mycosis in the Americas and it is frequently observed in AIDS patients. Since the beginning of the HIV epidemic, there has been a significant increase in the number of histoplasmosis cases in the Ceará state, Northeast Brazil. The lack of epidemiological data of the genotypes circulating in the Northeast region shows the importance of more detailed studies on the molecular epidemiology of *H. capsulatum* in this region. Different molecular techniques have been used to better characterize the genetic profile of *H. capsulatum* strains. It is noteworthy that, most studies of *H. capsulatum* are performed in the yeast phase due to its parasitic characteristics. Thus, the use of laboratory techniques for *in vitro* conversion and maintenance is extremely important. Given the above, this study aimed to determine the *in vitro* conversion rate of *H. capsulatum* isolates in six different culture media, as well as to detect by PCR the presence of *ryp1* gene, an important transcriptional regulator of the conversion from filamentous to yeast phase. In addition, it aimed to establish the molecular profile of *H. capsulatum* strains, from human and veterinary source, from Ceará and Southeast region of Brazil through RAPD-PCR assay and to assess the genetic diversity of the ITS1-5.8S-ITS2 region of these isolates compared with isolates from other countries, through the sequencing of nuclear ribosomal DNA. In the study of *in vitro* conversion, all tested media allowed the conversion, however, the Sabouraud agar media supplemented with 10% sheep blood showed the highest conversion capacity in relation to the other tested media. The *ryp1* gene was detected in 18 *H. capsulatum* strains (from human and animal source) and in three tested clinical specimens (whole blood), not being detected, however, in isolates of *Candida albicans*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporothrix schenckii* and *Coccidioides posadasii*. The analysis of the genetic variability of the *H. capsulatum* isolates, by RAPD-PCR assay, allowed the detection of two clusters circulating in the state of Ceará. The first cluster included strains from Southeast and Northeast regions of Brazil, being observed, within this cluster, the separation of isolates into three distinct subgroups (subgroups 1a, 1b and 1c). The second cluster included only strains from Northeast region of Brazil. There were no differences in clinical and epidemiological characteristics of individuals whose isolates belonged to different groups, obtained by RAPD-PCR. The sequencing of the ITS1-5, 8S-ITS2 region allowed the detection of two major clades. The clade 1 comprised the majority of the isolates tested, including strains from the Northeast, and included isolates from different geographical locations. The clade 2 was composed exclusively of isolates from the state of Rio de Janeiro. Therefore, it can be concluded that the Sabouraud agar supplemented with 10% sheep blood showed higher conversion capacity of *H. capsulatum* strains compared to the other tested media, and may be considered the medium of choice for converting of *H. capsulatum* strains. Furthermore, the *ryp1* gene can be used to identify and detect *H. capsulatum* from clinical specimens, may be used for diagnosis of histoplasmosis. Finally, the *H. capsulatum* isolates from the state of Ceará can be grouped into two main clusters, detected by RAPD-PCR. In addition, phylogenetic analysis of the ITS1-5.8S-ITS2 region revealed that strains from the Northeast presented genetic differences compared with strains from other Brazilian regions, being grouped in a different cluster of them.

Key words: molecular epidemiology, *Histoplasma capsulatum*, *in vitro* conversion

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ciclo biológico do fungo <i>Histoplasma capsulatum</i>	22
Figura 2. Aspecto microscópico de <i>Histoplasma capsulatum</i> corado ao Giemsa a partir de creme leucocitário. Visualização de células leveduriformes intracelulares	28
Figura 3. <i>Histoplasma capsulatum</i> a) aspecto macromorfológico em ágar batata dextrose, demonstrando colônia algodonosa branca; b) aspecto micromorfológico em lactofenol azul de algodão, mostrando os macroconídios tuberculados (estalagmosporos); c) forma leveduriforme a 35°C em ágar-BHI suplementado com 5% de sangue de carneiro demonstrando colônias de aspecto úmido, coloração branco-amarelada e à microscopia, estrutura leveduriforme com brotamento.	30
Figura 4. Aspecto histopatológico de amostra da medula óssea, mostrando o <i>Histoplasma capsulatum</i> na forma leveduriforme (prata-metenamina)	31
Figura 5. Esquema representativo da organização do <i>cluster</i> de genes do DNA ribossômico nuclear, evidenciando as regiões ITS e as subunidades 18S, 5,8S e 28S.	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição epidemiológica da histoplasmose no Brasil – padrão de reatividade intradérmica utilizando histoplasmina.....	26
Tabela 2. Procedência dos 18 isolados clínicos de origem veterinária e humana de <i>Histoplasma capsulatum</i> incluídos no estudo (Etapa 1).....	77
Tabela 3. Procedência dos 31 isolados clínicos de origem veterinária e humana de <i>Histoplasma capsulatum</i> incluídos no estudo (Etapa 2).....	78
Tabela 4. Sequências dos iniciadores de 10 nucleotídeos, utilizados na técnica de RAPD-PCR.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CBP	Proteína de ligação ao cálcio
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
HE	Hematoxilina-Eosina
IL	Interleucina
IMDF	Imunodifusão
INF- γ	Interferon-gama
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
KOH	Hidróxido de Potássio
MP	Máxima Parcimônia
NB3	Nível de Biossegurança 3
PAS	<i>Periodic acid-Schiff</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
rDNA	Ácido Desoxirribonucléico ribossômico
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>
Th-1	<i>T-helper1</i>
Th-2	<i>T-helper2</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
UFC	Universidade Federal do Ceará
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean</i>

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA	15
1.1 Aspectos históricos da histoplasmose	15
1.2 Características gerais do fungo <i>H. capsulatum</i>	17
1.2.1 Classificação taxonômica	17
1.2.2 Morfologia do <i>H. capsulatum</i>	17
1.2.3 Fatores de virulência.....	18
1.3 Patogenia da histoplasmose.....	21
1.4 Aspectos ecológicos e distribuição geográfica da histoplasmose	24
1.5 Apresentações clínicas da histoplasmose	26
1.6 Diagnóstico laboratorial da histoplasmose	28
1.6.1 Diagnóstico micológico.....	28
1.6.2 Diagnóstico histopatológico	30
1.6.3 Diagnóstico sorológico	32
1.6.4 Diagnóstico molecular.....	33
1.7 Tratamento, prevenção e controle	34
1.8 Marcadores moleculares	35
1.9 Epidemiologia molecular da histoplasmose	37
2. OBEJTIVOS	40
2.1 Objetivo Geral	40
2.2 Objetivos Específicos	40
3. ARTIGOS CIENTÍFICOS	41
3.1 Capítulo 1 Conversão de cepas de <i>H. capsulatum</i> de origem humana e veterinária: Eficácia do meio de cultura suplementado com 10% de sangue de carneiro para a realização de testes de sensibilidade <i>in vitro</i>	41
3.2 Capítulo 2 Gene <i>ryp1</i> como região alvo para o diagnóstico molecular da histoplasmose	51
3.3 Capítulo 3 Avaliação da diversidade genética de isolados de <i>H. capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i> da região Nordeste do Brasil	58
4. CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
APÊNDICES	87
Apêndice I. Procedência dos isolados clínicos de <i>H. capsulatum</i> incluídos no estudo.....	88
Apêndice II. Número de acesso e descrição das amostras utilizadas para comparação e	

realização das análises filogenéticas.....	90
Apêndice III. Materiais e Métodos	93
ANEXOS	101
Anexo I. Meios de cultura e soluções.....	102
Anexo II. Protocolo para extração de DNA genômico.....	107
Anexo III. Protocolo para purificação de DNA (produtos de PCR).....	108
Anexo IV. Protocolo para precipitação de DNA em placa de sequenciamento	109

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Aspectos históricos da histoplasmose

A histoplasmose, também conhecida como doença de Darling ou doença das cavernas, foi primeiramente descrita pelo patologista americano Samuel Taylor Darling no início do século XX. No dia 07 de dezembro de 1905, enquanto examinava material de necropsia de um paciente negro, com 27 anos de idade, carpinteiro, nativo da Martinica, que residia há três meses na Zona do Canal no Panamá e que apresentava quadros de leucopenia, febre irregular, anemia e hepatoesplenomegalia, Darling encontrou, no interior de macrófagos alveolares, numerosos corpos ovais e arredondados, morfológicamente semelhantes a protozoários do gênero *Leishmania*, de aproximadamente 3 µm de diâmetro. Esse novo parasita encontrado foi denominado de *Histoplasma capsulatum*. O nome foi baseado na presença do parasita no interior de histiócitos, na sua semelhança a um protozoário e na presença aparente de uma cápsula circundante (DARLING, 1906). Três anos depois, em 1908, Darling relatou mais dois casos fatais da nova doença, envolvendo um paciente chinês que morava há 15 anos no Panamá e um negro martinicano (DARLING, 1909).

Em Berlim, no ano de 1912, o brasileiro Henrique da Rocha Lima, médico patologista e infectologista, estudando as lâminas dos casos de Darling, chegou à conclusão que o processo era micótico demonstrando assim a natureza fúngica da histoplasmose. Somente 22 anos depois, De Monbreun realizou o primeiro cultivo desse fungo sob a forma filamentosa e produziu infecções experimentais em animais de laboratório observando a reversão do fungo para a forma leveduriforme, comprovando assim, seu caráter dimórfico (De MONBREUN, 1934).

No Brasil, em 1939, Almeida e Lacaz isolaram, pela primeira vez, o fungo *H. capsulatum* a partir do cultivo de um fragmento de biópsia de uma lesão de um paciente com cromoblastomicose (ALMEIDA, LACAZ, 1939). Poucos anos depois, em 1941, o segundo isolamento desse fungo foi realizado, pelos mesmos autores, a partir do escarro de um paciente que apresentava lesões pulmonares (ALMEIDA, LACAZ, 1941). No mesmo ano, Vilela e Pará, relataram o primeiro caso fatal de histoplasmose disseminada no Brasil, em uma criança de três anos de idade, que residia no Estado de Minas Gerais. (VILELA, PARÁ, 1941).

Até o ano de 1945, a histoplasmose era tida como uma doença rara, de transmissão desconhecida e quase sempre fatal. Porém, o estudo de Christie e Peterson (1945) modificou este conceito. Estes autores observaram que muitos indivíduos com calcificações pulmonares eram tuberculino-negativos e histoplasmina-positivos. Esse estudo demonstrou que a histoplasmose era uma infecção essencialmente benigna, cosmopolita e contraída principalmente pela via respiratória.

Em 1949, Emmons realizou o primeiro isolamento de *H. capsulatum* a partir de amostras de solo, coletadas de tocas de ratos com histoplasmose (EMMONS, 1949). No ano de 1952, Zeidberg e colaboradores relataram o crescimento de *H. capsulatum* em solos contendo elevado teor de matéria orgânica. Nesse estudo, as amostras de solo foram coletadas de diferentes locais de residências, cujos moradores apresentaram positividade para o teste de histoplasmina. As maiores porcentagens de isolamento do fungo *H. capsulatum* foram obtidas a partir de solos intimamente associados com o habitat de aves (ZEIDBERG et al., 1952).

No Brasil, diversas microepidemias foram relatadas desde 1958. Os principais fatores predisponentes foram visitas a grutas com fezes de morcego, seguidas por visitas a minas abandonadas e contato com fezes de galinheiros (OLIVEIRA et al., 2006). O Estado do Rio de Janeiro é responsável pelo maior número de casos de microepidemias relatadas, sendo descritas mais de 18 microepidemias (AIDÉ, 2009).

No Estado do Ceará, estudos utilizando a histoplasmina em intradermoreação foram realizados com o intuito de conhecer a frequência de histoplasmose em nosso meio. O primeiro inquérito foi realizado em 1986 por Coêlho e colaboradores, no qual utilizaram pacientes internados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Ceará, todos procedentes do interior do estado, obtendo 23,6% de positividade (COÊLHO et al., 1986). Quatro anos depois, em 1990, Diógenes e colaboradores realizaram inquérito utilizando 138 indivíduos do município de Pereiro, Ceará, obtendo 61,5% de positividade (DIÓGENES et al., 1990). Em 1992, Alencar e colaboradores utilizando 316 participantes oriundos da cidade de Aracati, Ceará, obtiveram uma taxa de positividade para histoplasmina de 87,34% (ALENCAR et al., 1992).

Com o advento da AIDS, nas décadas de 80 e 90, centenas de casos de histoplasmose foram observados entre os portadores dessa síndrome, passando ter esta micose um lugar de destaque entre as doenças fúngicas vistas em nosso meio. Atualmente, em áreas endêmicas, tem sido a micose sistêmica mais comum entre indivíduos infectados pelo HIV (DAHER et al, 2006). Desde o início da epidemia de HIV

no Ceará, a histoplasmose disseminada tem sido detectada com frequência em pacientes com AIDS. Na última década, foi registrado um aumento na incidência da histoplasmose entre os pacientes com AIDS no Estado do Ceará. Foram 164 casos de histoplasmose, no período compreendido entre os anos de 1995 a 2004 (DAHER et al., 2006). Em 2012, Brilhante e colaboradores realizaram uma análise descritiva dos casos de histoplasmose em pacientes com AIDS no Estado do Ceará, no período compreendido entre 2006 a 2010 obtendo 208 casos de indivíduos com histoplasmose (BRILHANTE et al., 2012). O número de casos de histoplasmose no Estado do Ceará são maiores que aqueles observados em microepidemias na região Sul e Sudeste do Brasil, bem como em outros países da América do Sul.

1.2 Características gerais do fungo *H. capsulatum*

1.2.1 Classificação taxonômica

Taxonomicamente, o fungo *H. capsulatum* é um eucarioto pertencente ao Reino Fungi, e encontra-se na divisão (filo) Ascomycota, Classe Eurotiomycetes, Ordem Onygenales, Família Ajellomycetaceae, Gênero *Histoplasma*, Espécie *Histoplasma capsulatum*, cuja forma teleomórfica denomina-se *Ajellomyces capsulatus* (LACAZ et al., 2002; KASUGA et al., 2003).

Baseada na morfologia e patogenicidade, a espécie *H. capsulatum* tem sido dividida em três variedades: *H. capsulatum* var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii* e *H. capsulatum* var. *farciminosum*. A primeira variante, *H. capsulatum* var. *capsulatum*, é considerada o agente etiológico da histoplasmose clássica, de distribuição universal. A segunda variante, *H. capsulatum* var. *duboisii*, causa a histoplasmose africana e está restrita a uma parte do continente africano. A terceira variante, *H. capsulatum* var. *farciminosum*, não foi encontrada parasitando o homem, tendo sido descrita apenas como patógeno de cavalos e mulas, causando linfangite epizoótica (LACAZ et al., 2002). Neste trabalho será realizada abordagem teórica de *H. capsulatum* var. *capsulatum* utilizando a nomenclatura *H. capsulatum*, sem fazer menção à variedade deste ponto em diante.

1.2.2 Morfologia do *H. capsulatum*

Considerado um fungo dimórfico, *H. capsulatum* apresenta-se sob a forma miceliana ou filamentosa na natureza ou quando cultivado em meios de cultura artificiais, a uma temperatura que varia entre 25°C a 30°C. Como estrutura de propagação assexuada, dois tipos de conídios são formados: os macroconídios, estruturas redondas ou piriformes, que possuem parede espessa, cobertos por projeções espiculadas e medem em torno de 8µm a 15µm; e os microconídios, estruturas ovaladas, com paredes lisas, que constituem a forma infectante, medindo em torno de 2 µm a 4 µm (FERREIRA e BORGES, 2009).

Na temperatura corpórea ou quando cultivado *in vitro* entre 35°C a 37°C, o fungo converte-se para a fase leveduriforme, com morfologia oval e pequena, caracterizando a fase parasitária do *H. capsulatum* (AIDÉ, 2009). Vale ressaltar que, a transição entre a fase miceliana saprofítica e a fase leveduriforme parasitária é completamente reversível e regulada pela temperatura, embora outros fatores, como a presença de certos fatores nutricionais tais como aminoácidos, vitaminas e condições apropriadas de oxigênio e dióxido de carbono, também sejam necessários para que essa transição ocorra (WOODS, 2002). A conversão *in vitro* é um processo difícil e laborioso, sendo extremamente importante o uso de meios de cultura apropriados para a realização desse processo. Diversos meios de cultura têm sido descritos para induzir a conversão *in vitro* de cepas de *H. capsulatum*, contudo, a maioria deles apresenta composição complexa, enriquecidos com diversos nutrientes como aminoácidos e vitaminas (CASTELUCCI et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2006; SUARÉZ-ALVAREZ et al., 2010). A fase sexuada denomina-se *Ajellomyces capsulatus*, sendo pouco comum seu isolamento no laboratório clínico (LACAZ et al., 2002).

1.2.3 Fatores de virulência

O fungo *H. capsulatum* apresenta diversos mecanismos de virulência que permitem seu crescimento em condições adversas oferecidas pelo hospedeiro, propiciando o estabelecimento da relação parasitária e contribuindo para o processo de doença. Esses fatores de virulência favorecem a adesão fúngica, colonização, disseminação e a habilidade do fungo para sobreviver em ambientes hostis e escapar dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro (KUROKAWA et al., 1998).

O dimorfismo é considerado um dos fatores de virulência mais importantes para a patogenicidade dos fungos dimórficos. O sucesso do fungo *H. capsulatum* como

patógeno intracelular depende da sua conversão da fase filamentosa para a fase parasitária leveduriforme. Essa conversão resulta não apenas em uma mudança na forma da célula, mas também na composição da parede celular, a presença de moléculas antigênicas e a expressão de genes de virulência (KLEIN, TEBBETS, 2007).

Em resposta a altas temperaturas e outras condições adversas que o fungo encontra no ambiente do hospedeiro, *H. capsulatum* expressa vários genes específicos da fase leveduriforme como *yps-3* e *CBPI* que facilitam a sobrevivência do fungo. Estudos têm mostrado que a transição morfológica de *H. capsulatum* bem como a expressão de genes de virulência é governada por dois reguladores transcricionais: os genes histidina quinase (*DRK1*) e *ryp1*. O papel desses genes está relacionado ao controle da transição morfológica da fase filamentosa para a fase leveduriforme sendo necessários para a conversão, para a expressão de genes de virulência e patogenicidade (HOLBROOK, RAPPLEYE, 2008). Nguyen, Sil (2008) demonstraram que um mutante no qual o gene *ryp1* foi bloqueado não mostrou crescimento leveduriforme mesmo quando submetido à temperatura de 37°C.

A termotolerância, outro fator de virulência observado no fungo *H. capsulatum*, consiste na sua habilidade de sobreviver e replicar-se a uma temperatura de 35-37°C. Estudos têm mostrado que cepas de *H. capsulatum* pouco virulentas necessitam de mais tempo para realizar a conversão da forma micelial para leveduriforme, na temperatura de 37°C, enquanto as cepas mais virulentas realizam essa conversão de maneira mais rápida, além de serem mais resistentes a variações drásticas de temperatura (MEDOFF et al., 1986). A resistência às mudanças de temperatura também está relacionada à síntese de proteínas de choque térmico. A produção dessas proteínas desempenha um papel importante tanto na adaptação do fungo como na transição da fase filamentosa para a fase leveduriforme (HOLBROOK, RAPPLEYE, 2008).

A parede celular do *H. capsulatum*, por sua vez, exibe uma estrutura polissacarídica complexa, composta por galactomananas, α - 1,3- glucano, β - 1,3- glucano, quitina, proteínas e lipídios. A fase de transição induzida pela temperatura pode modificar a biossíntese de glucanos, isto é, a síntese do α - 1,3 glucano é um atributo especial da fase leveduriforme de *H. capsulatum*. A presença do α -1,3 glucano em *H. capsulatum* tem sido relacionada à patogenicidade e está diretamente ligada à virulência da cepa. Para evitar sua detecção pelas células do sistema imune, o fungo *H. capsulatum* produz uma camada de α -1,3 glucano que interfere na ativação das células do sistema imune, permitindo sua permanência dentro dos fagolisossomos (RAPPLEYE et al.,

2007). Já o β -1,3 glucano, predominante na fase filamentosa, participa no recrutamento de leucócitos e na regulação de mediadores inflamatórios tais como os leucotrienos e citocinas pró-inflamatórias como TNF- α . (KUROKAWA et al., 1998). O galactomanano está situado na parte externa da parede celular, sendo considerado o principal polissacarídeo antigênico de *H. capsulatum* (HOLBROOK, RAPPLEYE, 2008). A melanina, presente na parede celular de algumas cepas de *H. capsulatum*, é um pigmento fúngico capaz de atuar como fator de virulência, uma vez que auxilia na proteção do fungo contra fatores ambientais como extremos de temperatura, mecanismos de defesa do sistema imune do hospedeiro e terapias antimicrobianas. De acordo com Duin et al. (2002), esse pigmento interfere com a ação de drogas antifúngicas, reduzindo a sensibilidade do *H. capsulatum* à anfotericina B e à caspofungina (DUIN et al., 2002).

O gene *yps-3* é encontrado especificamente na fase leveduriforme. A proteína codificada (YPS3p) é encontrada tanto como constituinte da parede da célula fúngica como uma molécula secretada. Apesar da função exata dessa proteína ainda permanecer desconhecida, ela tem sido associada com a virulência, uma vez que o silenciamento deste gene atenua a virulência *in vitro* e durante a infecção murina. De acordo com Holbrook e Rappleye (2008), a proteína YPS3p não está envolvida na entrada do *H. capsulatum* em macrófagos ou sobrevivência no ambiente dentro do macrófago, mas participa na disseminação do fungo aos sítios extrapulmonares. Embora o gene *yps-3* esteja presente na maioria das cepas de *H. capsulatum*, a expressão significativa da proteína ocorre apenas em cepas norte-americanas classe 2 (Nam2). Considerando o papel desse gene na disseminação do fungo, estudos sugerem que as cepas pertencentes a esse grupo (Nam2) são mais virulentas que as cepas que não expressam o gene *yps-3*, pois apresentam uma capacidade maior de causar histoplasmose disseminada (BOHSE, WOODS, 2007).

A adesão dos microrganismos ao tecido do hospedeiro tem sido considerada a primeira e principal etapa na colonização e disseminação do patógeno (KUROKAWA et al., 1998). Moléculas de adesão, que são expressas essencialmente na superfície da célula fúngica, medeiam a interação entre o fungo e as células do sistema imune do hospedeiro, permitindo ao patógeno escapar da destruição pelas células do sistema imune inato e facilitar a replicação da levedura nesse novo ambiente (MIHU, NOSANCHUK, 2012). A proteína de choque térmico 60 (HSP60) é uma molécula de adesão, presente na superfície da célula fúngica, que promove o reconhecimento e a fagocitose das leveduras pelos macrófagos. Essa proteína atua como um ligante para o receptor CR3 (CD11/CD18),

presente na superfície dos macrófagos. A interação entre *H. capsulatum* e macrófagos mediante a ligação entre HSP60 e CR3 resulta na ingestão rápida da levedura permitindo que o microrganismo sobreviva e replique-se dentro das células hospedeiras (MIHU, NOSANCHUK, 2012). Outra molécula de adesão descrita é a proteína de choque térmico 82 (HSP82), cuja presença em altas concentrações é essencial para o crescimento e adaptação celular a temperaturas elevadas (BORKOVICH et al., 1989). Recentemente, Edwards et al. 2011 demonstraram que a redução dos níveis da HSP82 diminui a virulência de *H. capsulatum* em macrófagos e prejudica a habilidade do fungo de infectar pulmões em modelo de infecção em murinos.

Para sobreviver e proliferar no ambiente do hospedeiro, com concentrações de ferro limitadas, *H. capsulatum* apresenta diversos mecanismos de aquisição de ferro para permitir seu crescimento dentro desse ambiente. Esses mecanismos são considerados determinantes de virulência e pelo menos três deles têm sido descritos: 1) produção de sideróforos; 2) redução do ferro e 3) liberação do ferro ligado a transferrina a partir de um pH ácido (WOODS et al., 2002). O primeiro consiste na produção de sideróforos (compostos que apresentam alta afinidade pelo ferro) pelo fungo *H. capsulatum*, o que tem sido considerado um importante fator de virulência. Os sideróforos são capazes de retirar o ferro das proteínas carreadoras (hemoglobina, transferrina e lactoferrina) e transportar para o citoplasma. Foi demonstrado que o gene *SIDI* tem um importante papel na aquisição de ferro mediado por sideróforos (HILTY et al., 2011). Um segundo mecanismo de aquisição de ferro envolve a redução do ferro através da enzima redutase férrica e o terceiro mecanismo descrito é a liberação de ferro da transferrina a partir de um pH ácido. A acidificação promove a liberação do ferro da transferrina e o disponibiliza para o fungo. No entanto, a acidificação também aumenta a atividade de enzimas hidrolíticas que atuam para degradar o fungo. Assim, *H. capsulatum* desenvolveu um mecanismo no qual adquire ferro com uma faixa de pH baixa o suficiente para liberar o ferro da transferrina sem, no entanto, ativar as enzimas hidrolíticas (WOODS et al., 2003; LÓPEZ et al., 2006).

1.3 Patogenia da histoplasmose

A histoplasmose é adquirida através da inalação de microconídios infectantes, presentes em solo contaminado com o fungo *H. capsulatum* (Figura 1).

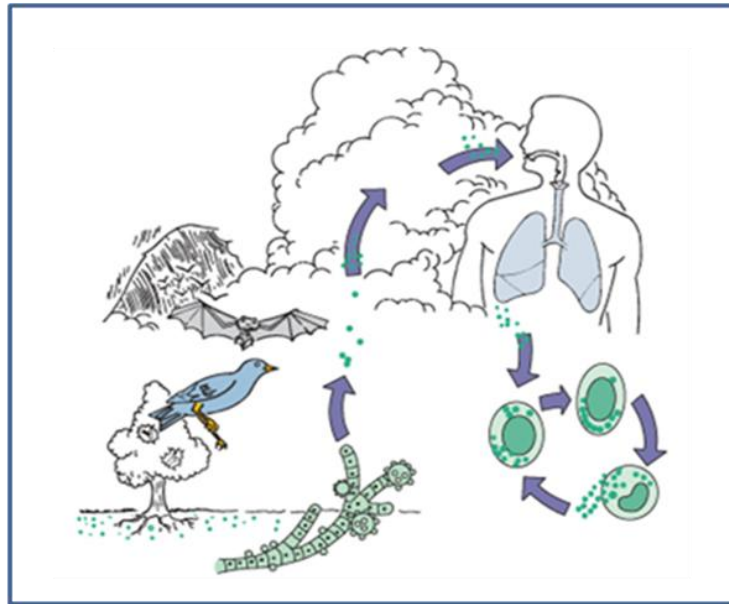


Figura 1 - Ciclo biológico do fungo *Histoplasma capsulatum*. Fonte: MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006.

Os conídios inalados chegam até os alvéolos pulmonares estimulando uma resposta inflamatória no hospedeiro, composta de células mononucleares e macrófagos. A conversão para a fase leveduriforme ocorre no parênquima pulmonar onde uma série de mudanças genéticas, bioquímicas e físicas são sofridas pelo microrganismo devido à mudança de temperatura (DEEPE, SEDER, 1998). Após a conversão, as células leveduriformes ligam-se avidamente aos receptores CD11/CD18 (pertencentes à família das adesinas) presentes na superfície dos macrófagos alveolares residentes e são fagocitadas dentro de aproximadamente uma hora. A consequência imediata da fagocitose das leveduras por macrófagos é a fusão dos lisossomos com o vacúolo fagocítico. Uma vez internalizadas, as leveduras sobrevivem e multiplicam-se dentro dos fagolisossomos. O microambiente desta organela está associado com a redução de pH, a presença de enzimas hidrolíticas, defensinas, bem como outros peptídeos antimicrobianos e a geração de compostos oxidativos tóxicos (NEWMAN, 1999).

Diversas estratégias têm sido utilizadas pelo *H. capsulatum* para evitar ou sobreviver ao ataque dos fagócitos e para persistir dentro desse ambiente intracelular. Os patógenos fúngicos abrigam uma variedade de estruturas conservadas chamadas padrões

moleculares associados aos patógenos (PAMPs), que podem ser secretadas ou estar presentes na superfície do fungo. No fungo *H. capsulatum*, a β -glucana é uma PAMP, que ao ser reconhecido pelos receptores padrão de reconhecimento (PRR), promovem a ativação da resposta imune inata. Uma das estratégias desenvolvidas pelo *H. capsulatum* para evitar sua detecção pelas células do sistema imune inclui a produção de uma camada de α -1,3-glucana, interferindo, desse modo, no reconhecimento antigênico de β -glucana e a subsequente ativação do sistema imune (RAPPEYE et al., 2007; SEIDER et al., 2010). Quando o fungo não consegue evitar a fagocitose, outras estratégias para permitir a sobrevivência dentro dos fagócitos são utilizadas. Essas estratégias incluem: a alteração no processo de maturação dos fagolisossomos, a limpeza dos componentes tóxicos, o escape dos fagolisossomos, a adaptação e sobrevivência dentro do ambiente hostil do fagócito (SEIDER et al., 2010).

As células fúngicas fagocitadas têm a capacidade de “sentir” o ambiente ao redor e modificar apropriadamente seu padrão transcricional. O estresse oxidativo que os patógenos fúngicos são submetidos dentro do fagossomo é devido a um conjunto de componentes tóxicos, como espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio geradas pelos fagócitos, que danificam o DNA, proteínas e lipídios, contribuindo para a morte da célula fúngica. Assim, para sobreviver à fagocitose, uma resposta rápida e a indução de mecanismos de proteção pelos fungos patógenos são necessárias (NEWMAN, 1999). Um dos mecanismos pelo qual o *H. capsulatum* sobrevive à ação das enzimas proteolíticas dentro deste ambiente é através da alcalinização do meio. O fungo modula o pH do ambiente (uma faixa que varia entre 6 e 6,5), o qual inativa as hidrolases ácidas dos lisossomos. Nessa faixa de pH, os íons ferro apresentam-se livres, podendo então ser capturados pelas leveduras para serem utilizados durante a sua replicação (DEEPE, SEDER, 1998). Além disso, a proteína CBP, expressa somente na fase leveduriforme, pode ter um papel chave na alteração do ambiente fagolisossômico.

Embora estratégias de sobrevivência intracelular microbianas permitam a persistência dentro dos fagócitos, os patógenos eventualmente escapam para se espalhar e se disseminar. A partir dos pulmões, o fungo invade os linfonodos hilo-mediastinais e dissemina-se para a corrente sanguínea permitindo que o agente parasite outros órgãos como o fígado, o baço e a medula óssea. A partir daí, é a resposta imunológica do hospedeiro contra a infecção que vai determinar a extensão da doença (FERREIRA, BORGES, 2009).

Após a segunda ou terceira semana do início da infecção desenvolve-se uma resposta imune celular do tipo T “helper” 1 (Th1), que irá produzir IFN- γ e outras citocinas. O IFN- γ tem a capacidade de aumentar o poder oxidativo dos fagócitos, estimulando a fagocitose. Essas citocinas ativam os macrófagos, os quais adquirem a capacidade de lisar as leveduras intracelulares. Essa resposta promove a formação dos granulomas epitelióides, os quais isolam a inflamação, protegem o tecido circundante, controlam o crescimento dos patógenos, além de prevenirem a disseminação sistêmica. Esse tipo de resposta imune leva à cura da infecção primária, tornando os indivíduos resistentes às novas reinfecções (HENINGER et al., 2006; FERREIRA, BORGES, 2009).

Em pacientes imunossuprimidos, seja devido à quimioterapia contra o câncer, desnutrição ou infecção pelo vírus HIV, a histoplasmose pode evoluir para formas pulmonares graves ou infecções sistêmicas, em muitos casos levando o paciente a óbito. Nesses indivíduos, que apresentam a forma disseminada da doença, não há uma reação inflamatória eficiente nem formação de granulomas compactos, que impedem a disseminação do fungo. O tipo de resposta imune exibida pelos mesmos, caracteriza-se como uma resposta do tipo T “helper” 2 (Th2), na qual há produção de citocinas do tipo IL-4, IL-5 e IL-10, que são inibidoras da resposta protetora Th1. Portanto, a forma clínica apresentada pelos indivíduos que se infectam depende principalmente da resposta imune do hospedeiro, embora a quantidade de inóculo inalado e a virulência fúngica também tenham sua importância (FERREIRA, BORGES, 2009).

1.4 Aspectos ecológicos de *H. capsulatum* e distribuição geográfica da histoplasmose

O *H. capsulatum* é um fungo saprófita e o solo contaminado com excrementos de aves e morcegos atua como reservatório desse fungo. As fezes desses animais são ricas em compostos nitrogenados, que são nutrientes necessários para o crescimento fúngico. O fungo pode ser isolado, portanto, de quaisquer locais onde o solo possa estar enriquecido com excretas desses animais como: cavernas, minas, parques públicos, ocos de árvores, galinheiros, forros de casas e edificações antigas (AIDÉ, 2009; FERREIRA, BORGES, 2009). Atividades como paisagismo, limpeza de sótãos ou celeiros, demolição de prédios antigos e revolvimento de solos estão associadas à histoplasmose e contribuem para a disseminação das partículas infectantes (KAUFFMAN, 2009). Correntes de ar carregam os conídios por quilômetros de distância, expondo indivíduos que não estavam próximos de áreas contaminadas (DEUS FILHO et al., 2009).

Alguns fatores ambientais que favorecem e influenciam o crescimento de *H. capsulatum* são solos com pH ácido (o que pode inibir microrganismos competidores), umidade elevada, baixa luminosidade e temperatura entre 20 e 30 °C (DEUS FILHO et al., 2009). A umidade é importante para que os microconídios se soltem das hifas e se dispersem no ambiente (NORMAN et al., 2009).

Muitas espécies de mamíferos como cães, roedores, gatos, cavalos, marsupiais e quirópteros são suscetíveis à histoplasmose. Os morcegos são suscetíveis à infecção e participam ativamente da epidemiologia da histoplasmose. Devido a sua capacidade migratória, esses animais podem disseminar o fungo de um local a outro, eliminando fungos viáveis em suas fezes por um longo período de tempo (ALLTON et al., 2010; WANKE; LAZÉRA, 2004). Um estudo realizado por Julg et al., (2008) relatou a possibilidade de infecção por *H. capsulatum* na entrada de cavernas, mesmo na ausência de morcegos. As aves não se infectam devido à alta temperatura corpórea, em torno de 41°C, porém podem carrear o microrganismo em suas asas, penas e bico.

Atualmente, a histoplasmose apresenta distribuição mundial tendo sido descrita em mais de 50 países, com maior prevalência em zonas tropicais e temperadas. Essa micose está amplamente distribuída no continente americano, havendo uma predominância de casos em algumas áreas dos Estados Unidos como as regiões centrais e sul do país, ao longo dos vales dos rios Mississipi e Ohio. Países da América Central (México, Honduras, Guatemala, Nicarágua, Panamá) e América do Sul (Venezuela, Colômbia, Peru, Brasil, Argentina e Uruguai) também apresentam alta prevalência dessa micose. A doença tem sido também relatada na África, Ásia e na Europa, onde foram diagnosticados casos esporádicos e autóctones (ROSSINI, GOULART, 2006; FERREIRA, BORGES, 2009).

No Brasil, a ocorrência da histoplasmose é relativamente comum e se dá através da observação de casos clínicos autóctones, seja em casos isolados ou sob a forma de microepidemias (CHANG et al., 2007). Epidemias de histoplasmose no Brasil têm ocorrido em áreas endêmicas e não-endêmicas, após exposição a ambientes contaminados com o fungo. Os relatos de microepidemias de histoplasmose estão associados a grupos de indivíduos que foram infectados após visitarem grutas habitadas por morcegos ou que tiveram contato com galinheiros, pombais ou casas desabitadas (ROSSINI, GOULART, 2006). Já foram registradas 26 microepidemias em oito estados brasileiros: Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, São Paulo, Distrito Federal, Minas Gerais, Paraíba, Amazonas e Bahia (AIDÉ, 2009).

Inquéritos epidemiológicos realizados em diferentes regiões do Brasil, usando como referência o teste cutâneo com a histoplasmina, detectaram diferentes índices de positividade. As regiões Centro-Oeste e Sudeste são consideradas áreas endêmicas com uma prevalência atingindo níveis de 4-63% e 3-93%, respectivamente. Nesse estudo, os índices de prevalência na região Nordeste variaram entre 2-29% (tabela 1) (GUIMARÃES et al., 2006).

Tabela 1. Distribuição epidemiológica da histoplasmose no Brasil – padrão de reatividade intradérmica utilizando histoplasmina.

Regiões brasileiras	Porcentagem de reação positiva
Norte	12,8-43,4%
Nordeste	2,6-29,8%
Centro-oeste	4,4-63,1%
Sudeste	3-93,2%
Sul	6,3-16%

Fonte: GUIMARÃES et al., 2006.

Estudos mais recentes também revelaram a ocorrência de histoplasmose em outras áreas do Brasil, como nos Estados do Maranhão e Piauí, remetendo a existência de microfocos nessas regiões (DEUS FILHO et al., 2009). No Ceará, em um estudo retrospectivo, no período compreendido entre 1995 a 2004, conduzido com 378 pacientes HIV positivos, a histoplasmose disseminada foi detectada em quase 44% dos pacientes e apresentou alta taxa de mortalidade (DAHER et al., 2007). Ainda no Estado do Ceará, um estudo realizado por Brilhante et al., 2012, no período compreendido entre 2006 a 2010, encontraram 208 casos de histoplasmose associada à pacientes HIV positivos, atendidos em um hospital de referência de Fortaleza.

1.5 Apresentações clínicas da histoplasmose

A histoplasmose apresenta um amplo espectro de apresentações clínicas, variando desde uma infecção assintomática até uma doença disseminada que envolve vários órgãos e sistemas. A gravidade e evolução da doença são determinadas pela quantidade de partículas inaladas, estado imunológico do hospedeiro e virulência da cepa infectante. (AIDÉ, 2009).

Dentre as três manifestações principais da histoplasmose - doença assintomática, respiratória e disseminada, a forma assintomática é considerada a mais comum. Os casos de histoplasmose subaguda resultam da infecção por uma pequena quantidade de inóculo observando-se quadro clínico semelhante a um estado gripal com tosse seca, febre e adinamia. Cerca de 90% das pessoas infectadas por *H. capsulatum* não apresentam nenhuma sintomatologia clínica, como demonstrado por testes cutâneos, realizados nas regiões consideradas endêmicas (ROSSINI, GOULART, 2006; KAUFFMAN, 2007).

A doença pulmonar aguda causada pelo *H. capsulatum* é na maioria das vezes regressiva e subclínica, sendo observada em 85-100% dos pacientes. Os casos sintomáticos manifestam-se como infecções autolimitadas do trato respiratório. A sintomatologia mais comum consiste em febre, calafrios, cefaléia, mialgias, hiporexia, tosse, dispnéia e dor torácica. Cerca de 10% dos pacientes desenvolvem artrite ou artralguas associadas a quadros de eritema nodoso. No entanto, uma aspiração maciça de conídios do fungo pode provocar uma manifestação pulmonar aguda mais grave. Os sintomas desaparecem em duas a quatro semanas sem tratamento específico (ROSSINI; GOULART, 2006; FERREIRA; BORGES, 2009).

A histoplasmose pulmonar crônica acomete especialmente indivíduos tabagistas, com mais de 50 anos de idade e portadores de doença pulmonar crônica obstrutiva (FERREIRA; BORGES, 2009). Quanto à sintomatologia clínica, inclui febre baixa, perda de peso, sudorese noturna, dor torácica e tosse com expectoração hemoptóica, quadro bastante semelhante ao observado na tuberculose pulmonar crônica, entretanto com menor gravidade do que esta (MUKHERJEE et al., 2010).

A partir do trato respiratório, a infecção pode ser disseminada pelas vias linfática e hematogena. A histoplasmose disseminada ocorre em indivíduos imunocomprometidos, especialmente em pacientes HIV positivos. É considerada a forma clínica mais grave, em que ocorre intensa multiplicação dos fungos nos pulmões e em órgãos extrapulmonares. A disseminação comumente resulta em infiltração de linfonodos, fígado, baço, medula óssea, glândulas adrenais, tegumento e sistema esquelético. A doença disseminada afeta predominantemente o fígado, baço, trato gastrintestinal, mucosa, orofaringe, pele e suprarenal. Os sinais clínicos são observados de acordo com os órgãos e sistemas envolvidos (WHEAT et al., 2000; FERREIRA; BORGES, 2009).

1.6 Diagnóstico laboratorial da histoplasmose

O diagnóstico da histoplasmose é clínico-epidemiológico e laboratorial. Embora as manifestações clínicas da histoplasmose sejam bem descritas, o diagnóstico dessa doença não pode ser realizado apenas com base em informações clínicas, uma vez que existe uma sobreposição significativa da histoplasmose com outras doenças. Assim, o diagnóstico definitivo da histoplasmose deve ser confirmado através de técnicas laboratoriais como as técnicas micológicas, histopatológicas, sorológicas e moleculares (GUIMARÃES et al., 2006; ROSSINI; GOULART, 2006).

1.6.1 Diagnóstico micológico

O diagnóstico definitivo da histoplasmose requer o isolamento do fungo *H. capsulatum* em meios de cultura específicos ou a visualização de formas leveduriformes do fungo em materiais biológicos (GUIMARÃES et al., 2006).

Para o exame direto, as amostras biológicas mais utilizadas são: escarro, lavado brônquico, líquido, medula óssea e biópsias. Nos esfregaços corados pelas técnicas de Giemsa e Grocott, o fungo *H. capsulatum* é visualizado na forma de leveduras como elementos arredondados ou ovalados, dentro de macrófagos (Figura 2). No entanto, a visualização das leveduras de *H. capsulatum* é bastante difícil, devido às suas pequenas dimensões, sendo o exame considerado de baixa sensibilidade (ROSSINI; GOULART, 2006).

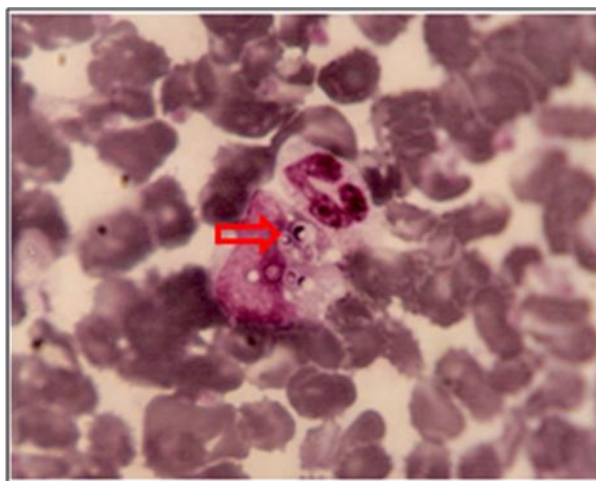


Figura 2 - Aspecto microscópico de *H. capsulatum* corado ao Giemsa a partir de creme leucocitário. Visualização de células leveduriformes intracelulares. Fonte: CEMM, 2007.

O cultivo do *H. capsulatum* é considerado o método “padrão ouro” para o diagnóstico da histoplasmose. Podem ser utilizados meios como ágar batata, ágar-Sabouraud dextrose, acrescido ou não de cloranfenicol e cicloeximida ou ágar BHI (ágar-infusão cérebro-coração). Quando cultivado a 22-28°C, as colônias do fungo são inicialmente velutasas, que com o tempo tornam-se filamentosas, algodonosas, de coloração branca, com micélio aéreo que tende a escurecer com o tempo (Figura 3a) (GUMARÃES et al., 2006). Microscopicamente, observam-se delicadas hifas hialinas, septadas e ramificadas, apresentando microconídios pequenos, de aproximadamente 2 a 4 µm, com paredes lisas, além de uma grande quantidade de macroconídios tuberculados (ou mamilonados) conhecidos como estalagmosporos, medindo de 8 a 15 µm (Figura 3b) (ROSSINI; GOULART, 2006; KAUFFMAN, 2007). Essas estruturas podem ser confundidas com as estruturas de fungos saprófitas dos gêneros *Chrysosporium* e *Sepedonium*, necessitando da confirmação do diagnóstico por meio da conversão da forma filamentosa para forma leveduriforme (WANKE; LAZÉRA, 2004).

A conversão *in vitro* para a forma leveduriforme pode ocorrer quando a cultura é incubada a 35-37°C em meios ricos em nutrientes como o ágar Sabouraud e ágar BHI suplementados com sangue, formando colônias de coloração branca a marrom, textura cremosa e superfície lisa ou rugosa (Figura 3c). Contudo, a conversão não ocorre facilmente, dependendo de nutrientes especiais, temperatura e das características fisiológicas das cepas. Microscopicamente, observam-se células leveduriformes pequenas, redondas ou ovais, com tamanho variando de 1 a 4 µm (Figura 3d) (ROSSINI; GOULART, 2006; GUIMARÃES et al., 2006).

Uma desvantagem do cultivo do fungo como método diagnóstico, consiste no tempo prolongado necessário para a identificação do agente etiológico, fato que pode ocasionar atraso na introdução da medida terapêutica específica. Além disso, a maioria dos pacientes que apresentam a forma assintomática ou uma forma leve da doença apresenta cultura negativa (GUIMARÃES et al., 2006). É importante ressaltar que, todos os procedimentos envolvendo a manipulação das culturas de *H. capsulatum* são considerados de risco para os laboratoristas e devem ser realizados em laboratórios com nível de biossegurança 3.

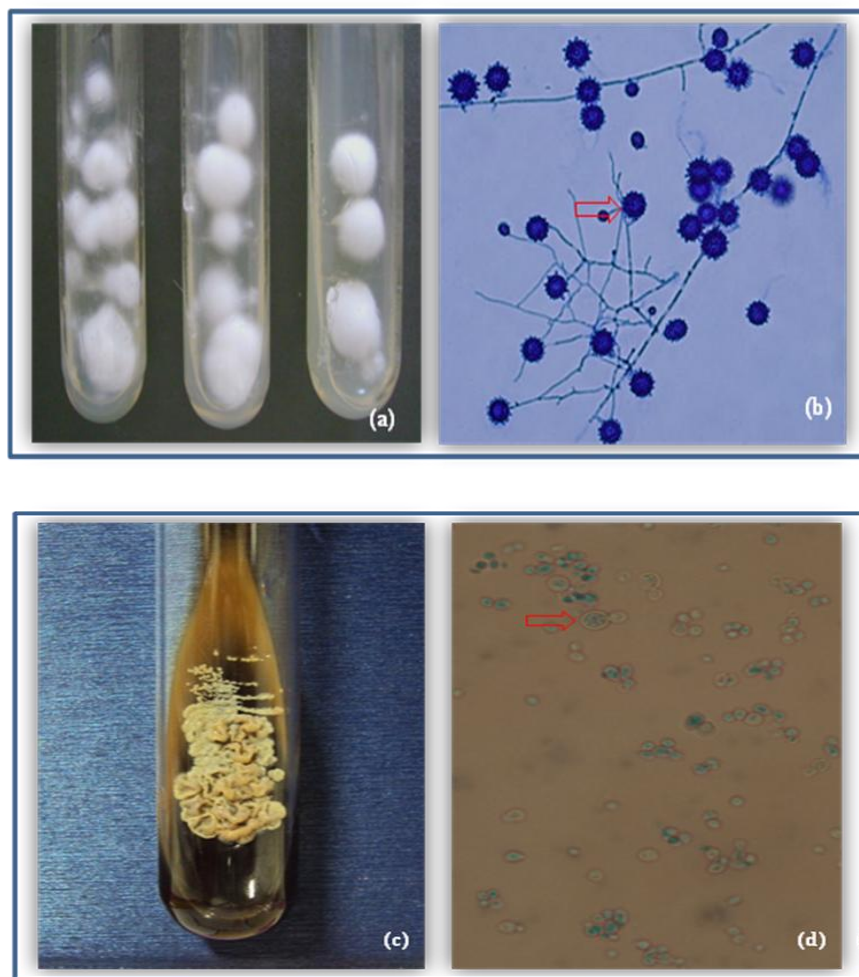


Figura 3 - *Histoplasma capsulatum*: a) aspecto macromorfológico em ágar batata dextrose, demonstrando colônia algodoadosa branca; b) aspecto micromorfológico em lactofenol azul de algodão, mostrando os macroconídios tuberculados (estalagmosporos); c) forma leveduriforme a 35°C em ágar-BHI suplementado com 5% de sangue de carneiro demonstrando colônias de aspecto úmido, coloração branco-amarelada; d) aspecto micromorfológico em lactofenol azul de algodão, mostrando estrutura leveduriforme com brotamento. Fonte: CEMM, 2011.

1.6.2 Diagnóstico histopatológico

O diagnóstico histopatológico pode ser realizado através da visualização de leveduras dentro das células do sistema mononuclear fagocítico, como macrófagos e monócitos, ou também fora dessas células. As leveduras aparecem como corpúsculos levemente basofílicos, esféricos ou ovalados, rodeados por um halo claro delimitado por uma parede celular muito fina e hialina (ROSSINI; GOULART, 2006).

O *H. capsulatum* pode ser visualizado pelo Giemsa e por colorações especiais, tais como prata metenamina Gomori e ácido periódico de Schiff (PAS). A técnica de hematoxilina-eosina (HE), comumente utilizada na rotina, não permite a visualização das leveduras minúsculas. Assim, a utilização de colorações especiais como prata metenamina Gomori e PAS são necessárias para a visualização adequada do fungo (Figura 4) (KAUFFMAN, 2009). De acordo com Leimann et al. (2005), a prata metenamina Gomori é considerada a melhor técnica porque oferece um melhor contraste e frequentemente cora células fúngicas que são refratárias ao PAS.

O exame histopatológico de vários tecidos (pulmão, linfonodo, fígado e medula óssea) revela a presença de granulomas com ou sem necrose de caseificação, em indivíduos imunocompetentes, enquanto que nos indivíduos imunocomprometidos, é frequente a presença de granuloma frouxo, agregados linfo-histiocitários ou apenas infiltrado mononuclear difuso (AIDÉ, 2009).

A estrutura das leveduras de *H. capsulatum* é muito similar a outros patógenos, podendo levar a dificuldades de interpretação. É necessário, então, realizar o diagnóstico diferencial das leveduras de *H. capsulatum* com *Candida glabrata*, *Penicillium marneffei*, *Pneumocystis jirovecii*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania donovani* e *Cryptococcus neoformans*. Deste modo, é importante estar familiarizado com a morfologia destes patógenos e com suas características de coloração por diferentes métodos (GUIMARÃES et al., 2006; AIDÉ, 2009).

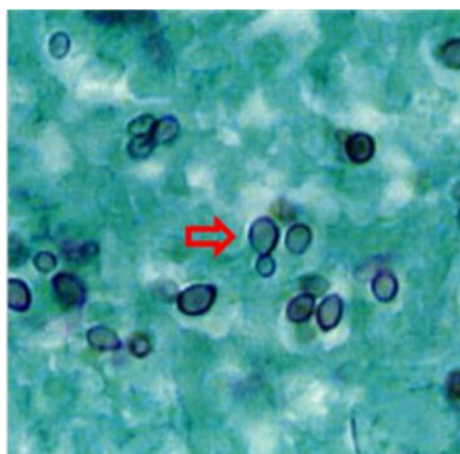


Figura 4 – Aspecto histopatológico de amostra da medula óssea, mostrando o *H. capsulatum* na forma leveduriforme (prata-metenamina). Fonte: KAUFFMAN, 2009.

1.6.3 Diagnóstico sorológico

Os testes sorológicos complementam o diagnóstico da histoplasmose e propiciam a obtenção de resultados em menor tempo, o que é extremamente útil já que o cultivo fúngico é bastante demorado no caso do *H. capsulatum*. Os ensaios sorológicos são fundamentais para o diagnóstico de infecções agudas, recentes ou doenças infecciosas crônicas. Dentre as principais técnicas sorológicas utilizadas para o diagnóstico da histoplasmose podemos destacar a reação de fixação do complemento, a imunodifusão dupla e o radioimunoensaio. Contudo, esses métodos apresentam algumas limitações como, por exemplo, a ocorrência de reações cruzadas com outros fungos causadores de micoses sistêmicas como a blastomicose, coccidioidomicose, paracoccidioidomicose e aspergilose (KAUFFMAN, 2007; AIDÉ, 2009).

Na histoplasmose, o diagnóstico sorológico baseia-se na identificação de anticorpos anti-H e anti-M. Esses anticorpos podem ser detectados utilizando a histoplasmina, que consiste em um extrato antigênico obtido da fase leveduriforme ou filamentosa do fungo. Os principais componentes da histoplasmina em que há resposta de anticorpos são os antígenos C, M e H. O antígeno C é um carboidrato (galactomanana), responsável por reações cruzadas com outras espécies fúngicas. O antígeno M é uma catalase e o antígeno H é uma beta-glicosidase envolvida no remodelamento da parede celular e aquisição de nutrientes. Os antígenos M e H são os constituintes padrão utilizados nos testes de imunodifusão dupla e fixação do complemento. A presença das precipitinas M e H é considerada conclusiva para o diagnóstico da histoplasmose (GUIMARÃES et al., 2006; KAUFFMAN, 2007).

Os métodos de detecção de antígenos também têm sido utilizados, especialmente quando a detecção de anticorpos é improvável. Isto ocorre em pacientes imunocomprometidos com infecção disseminada que apresentam uma falha na resposta imune. A detecção de antígenos de *H. capsulatum* pode ser realizada através da técnica de radioimunoensaio ou ELISA, sendo bastante utilizada em pacientes com histoplasmose aguda e aqueles com histoplasmose disseminada grave. As vantagens da utilização desses testes são a identificação de casos no início da infecção, antes que a soroconversão possa ser detectada (FERREIRA, BORGES, 2009).

Os testes cutâneos com injeções intradérmicas de histoplasmina são amplamente utilizados em inquéritos epidemiológicos, mas não para o diagnóstico da histoplasmose.

O teste é positivo, com uma induração de 5 mm ou mais, após 48-72 h da intradermoreação com 0,1 mL do antígeno de *Histoplasma* (GUIMARÃES et al., 2006).

1.6.4 Diagnóstico molecular

Diferentes técnicas moleculares têm sido utilizadas como alternativa para um diagnóstico rápido da histoplasmose. A vantagem das técnicas moleculares, principalmente ao se utilizar diretamente a amostra clínica, é o menor tempo requerido para a identificação do microrganismo e a redução de exposição do laboratorista ao microrganismo, considerado o seu nível de biossegurança 3 (MUÑOZ et al., 2010).

Diferentes alvos têm sido utilizados nas reações de PCR para identificação de *H. capsulatum*. Dentre os mais utilizados podemos citar o DNA ribossomal (DNAr). A unidade de DNAr é uma série repetitiva de três regiões gênicas (18S, 5.8S e 28S) e duas regiões espaçadoras intergênicas (ITS). A região ITS, localizada entre o 18S e 28S inclui dois espaços ITS1 e ITS2 separados por uma região conservada, a 5.8S (Figura 5). Essa região apresenta um nível intermediário de variação, o que a torna apropriada para a identificação de gênero e/ou de espécie, principalmente na evidenciação de polimorfismos em *H. capsulatum* (JIANG et al., 2000).



Figura 5. Esquema representativo da organização do *cluster* de genes do DNA ribossômico nuclear, evidenciando as regiões ITS e as subunidades 18S, 5,8S e 28S. Fonte: LIMA, 2010.

O DNAr tem sido utilizado para identificação de *H. capsulatum* por apresentar alta sensibilidade, uma vez que várias cópias estão presentes no genoma. Contudo, Bialek et al. (2002) encontraram altas taxas de resultados falso-positivos ao utilizar a região 18S do RNAr como alvo. Isto sugere a necessidade de se utilizar uma região alvo adicional para obter uma técnica de PCR com alta especificidade. Assim, diversos estudos têm utilizado técnicas de *Nested PCR*, *Seminested PCR* ou *Multiplex PCR* para a detecção de

H. capsulatum, utilizando não só a região do DNAr como alvo, mas também regiões específicas como o gene que codifica para a proteína Hc100, uma proteína de 100 kDa essencial para a sobrevivência de *H. capsulatum* na célula humana e o gene que codifica para o antígeno M do *H. capsulatum*, uma glicoproteína fúngica que ativa a resposta imune humoral e celular (BIALEK et al., 2002; ELÍAS et al., 2012). Assim, a busca de novas sequências alvo a fim de se obter uma técnica de alta especificidade e sensibilidade é de fundamental importância para o diagnóstico rápido da histoplasmose.

Um método de diagnóstico molecular que vem se destacando é a PCR em tempo real. A técnica de PCR em tempo real oferece vantagens significativas em termos de tempo para a análise e contaminação cruzada. Neste método, a amostra é analisada sem a abertura dos tubos, o que diminui significativamente os riscos de contaminação. Além disso, os resultados podem ser visualizados e quantificados por meio de um *software* acoplado ao termociclador, sem a necessidade de realização de um gel de agarose ou poliacrilamida. Os resultados são obtidos em cerca de 3 horas, sendo extremamente útil para um diagnóstico rápido da doença (SIMON et al., 2010). Recentemente, Koepsell et al. (2012) demonstrou a aplicabilidade da técnica de PCR em tempo real para identificação direta de *H. capsulatum* usando amostras de tecido humano fixado em formalina. Esse estudo conseguiu detectar até 6 pg/ μ L de DNA de *H. capsulatum* nessas amostras, demonstrando alta sensibilidade da técnica.

1.7 Tratamento, prevenção e controle

A escolha do tratamento depende do grau de gravidade da doença e do estado imune do paciente. Geralmente, os casos de regressão espontânea não necessitam de tratamento específico, sendo repouso e observação clínica as medidas mais eficazes (AIDÉ, 2009).

Dentre as opções terapêuticas disponíveis, a anfotericina B continua sendo a droga de escolha para a terapêutica da histoplasmose principalmente nos quadros clínicos mais graves (KAUFFMAN, 2009). Entretanto, com a disponibilidade dos derivados azólicos a partir da década de 1980, muitos estudos demonstraram a eficiência desses medicamentos contra essa micose, inclusive nas formas disseminadas (KAUFFMAN, 2007; FERREIRA; BORGES, 2009).

O itraconazol constitui o tratamento utilizado para pacientes com histoplasmose leve a moderada, e também como terapia de manutenção após tratamento inicial com

anfotericina B. No entanto, alguns pacientes podem apresentar intolerância ao itraconazol, necessitando do uso de terapias alternativas, como o voriconazol e posaconazol.

Não há vacina disponível contra o *H. capsulatum*. Medidas de prevenção podem ser adotadas a fim de evitar a exposição a áreas potencialmente contaminadas com o fungo, tais como, locais com fezes de morcegos como grutas, furnas, porões ou com fezes de aves como galinheiros e ainda locais de construção ou escavação em que haja revolvimento de terra. É fundamental o uso de máscaras apropriadas para indivíduos com risco de exposição a locais suspeitos ou contaminados (KAUFFMAN, 2009).

1.8 Marcadores moleculares

Diversas técnicas de biologia molecular estão disponíveis atualmente para a detecção da variabilidade na sequência de DNA, ou seja, para detecção de polimorfismos genéticos. Estas técnicas permitem a obtenção de diferentes marcadores moleculares que cobrem todo o genoma do organismo (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995). Os marcadores moleculares revelam polimorfismos de DNA entre indivíduos geneticamente relacionados, podendo ser utilizados em estudos de genética de populações, mapeamento, como DNA *fingerprinting*, ou para complementar estudo de sistemática, entre outros.

Um grande número de diferentes marcadores moleculares tem sido desenvolvido para o estudo da epidemiologia e diversidade genética de *H. capsulatum*. Esses diferentes marcadores têm revelado que cepas de *H. capsulatum* pertencem a grupos genéticos distintos, os quais frequentemente estão correlacionados à origem geográfica (KASUGA et al., 2003; ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2005; MUNIZ et al., 2010).

Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los 1) técnicas não baseadas em PCR ou técnicas de hibridização; 2) técnicas baseadas em PCR ou seja, na amplificação de DNA (AGARWAL et al., 2008).

Entre as técnicas não baseadas em PCR, podemos destacar os marcadores RFLP “*Restriction Fragment Length Polymorphism*” e Minissatélites ou locos VNTR “*Variable Number of Tandem Repeats*”. Na técnica de RFLP, o polimorfismo no DNA é evidenciado pela fragmentação do DNA através do uso de enzimas de restrição e observado por hibridização destes fragmentos com sequências homólogas de DNA, marcadas com radioatividade ou compostos que desencadeiam uma reação de

luminescência (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995; AGARWAL et al., 2008). Já os minissatélites ou locos VNTR são sequências adjacentes que se repetem em número variável. Estas sequências repetitivas são encontradas agrupadas ou dispersas ao longo do genoma formando sítios altamente polimórficos. Na análise de VNTR, da mesma maneira que na técnica de RFLP, o DNA dos indivíduos analisados é clivado com enzimas de restrição, separado eletroforicamente, imobilizado em membrana e a detecção feita através da hibridização com sondas. A diferença básica entre os marcadores RFLP e VNTR reside no tipo de sonda utilizada na etapa de detecção do polimorfismo de DNA. Na técnica de RFLP, sondas homólogas a sequências únicas no genoma são utilizadas, detectando um ou poucos *loci* de cada vez. Por outro lado, na detecção de polimorfismo VNTR, as sondas são constituídas de sequências homólogas às sequências repetidas dos minissatélites, de maneira que todos os *loci* hipervariáveis são detectados simultaneamente. Assim, os marcadores minissatélites tornam-se importantes ferramentas para análise genética, pois oferecem a possibilidade de detectar simultaneamente um grande número de *loci* genéticos polimórficos no genoma (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995).

Dentre as técnicas baseadas em PCR, podemos destacar os marcadores AFLP “*Amplified Fragment Length Polymorphism*” e RAPD “*Random Amplified Polymorphic DNA*”. A técnica de AFLP baseia-se na digestão de DNA genômico seguida de ligação de adaptadores de sequência conhecida nas extremidades coesivas dos fragmentos gerados. Uma vez que as sequências dos adaptadores e dos sítios de restrição são conhecidas, pode-se construir *primers* específicos a partir dessas sequências para serem usados na amplificação seletiva dos fragmentos resultantes do processo de digestão (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995). A técnica de RAPD-PCR foi desenvolvida por Williams et al., (1990) e consiste na amplificação de DNA genômico através de PCR utilizando *primers* curtos e de sequência arbitrária, com aproximadamente 10 nucleotídeos. Diferentemente de uma PCR convencional, na técnica de RAPD-PCR, tipicamente, utiliza-se apenas um único *primer* em cada reação ao invés de um par de *primers*. Além disso, esse *primer* único tem sequência arbitrária e, portanto, sua sequência alvo é desconhecida. Cada *primer* arbitrário utilizado dirige a síntese de vários segmentos de DNA simultaneamente em diversos pontos do genoma, resultando assim em várias bandas no gel. A quantidade de fragmentos a serem produzidos para uma análise é virtualmente ilimitada, dependendo apenas do número de *primers* utilizados. Um perfil RAPD-PCR será formado pelo conjunto dos produtos de amplificação de diversos *primers* diferentes. Dentre as

vantagens da técnica de RAPD-PCR pode-se destacar: simplicidade, rapidez, baixo custo, demanda de quantidades mínimas de DNA para realização das análises (cerca de 10 a 25 ng) e a possibilidade de estudo de espécies sobre as quais não se tem nenhum tipo de informação genética. Em relação às desvantagens, podemos citar a baixa reprodutibilidade e baixa consistência de resultados entre laboratórios, o que dificulta a comparação de dados obtidos em diferentes locais. Contudo, a escolha de *primers* adequados, além de uma boa padronização da técnica, através do estabelecimento de concentrações ótimas dos reagentes, reduz a possibilidade de se obter bandas de baixa reprodutibilidade (LACERDA et al., 2002).

1.9 Epidemiologia molecular da histoplasmose

Estudos têm mostrado diversidades importantes na virulência, infectividade e patogênese entre as cepas de diferentes espécies filogenéticas. Durkin et al. (2004), em infecções experimentais com camundongos, demonstraram diferenças de patogenicidade entre cepas norte-americanas e latino-americanas. Envolvimento pulmonar e mortalidade foram mais comuns em cepas brasileiras. As cepas norte-americanas, por sua vez, apresentaram maior capacidade de causar doença crônica. Outro estudo, realizado em 2006, demonstrou que apresentações cutâneas são mais comuns em pacientes da América do Sul que em pacientes da América do Norte. Além disso, foi demonstrado que as cepas sul-americanas são mais virulentas que as cepas norte-americanas (COUPPIÉ et al., 2006). Karimi et al., 2002, ao comparar cepas isoladas de pacientes HIV positivos do Brasil e dos Estados Unidos, verificaram que as cepas brasileiras apresentaram maior envolvimento gastrointestinal, pulmonar e cutâneo, além de taxa de mortalidade maior (39%), enquanto que pacientes dos EUA apresentaram taxa de mortalidade de 5-13%. Esses dados demonstram, portanto, que diferenças genéticas entre as cepas de *H. capsulatum* podem alterar a patogênese e manifestações clínicas da histoplasmose.

Devido ao aumento de casos de histoplasmose no mundo, diversos estudos tentam traçar o perfil epidemiológico e molecular de cepas de *H. capsulatum*, através de técnicas moleculares, para melhor entendimento da distribuição e patogenicidade dessa doença. Diferentes técnicas moleculares têm sido utilizadas para caracterizar o padrão genético das cepas de *H. capsulatum*. Em 1986, Vicent et al., utilizando marcadores de RFLP, dividiu os isolados de *H. capsulatum* em três classes distintas. A classe 1 foi constituída de um único membro formado por uma cepa de *H. capsulatum* da América do Norte,

tendo sido isolada da vagina de uma paciente com uma apresentação clínica incomum (cepa Down). A maioria dos isolados pertenceram à classe 2. Esse grupo incluiu cepas norte-americanas e cepas africanas, pertencentes à variedade *H. capsulatum* var. *duboisii*. A classe 3, por sua vez, foi composta de cepas de *H. capsulatum* isoladas da América Central e América do Sul.

Através da técnica de RFLP, Keath et al. (1992) utilizaram uma sonda específica para o gene *yps3* de *H. capsulatum* para realizar a tipagem dos isolados clínicos de *H. capsulatum*. Os isolados foram classificados em 6 classes distintas. A maioria dos isolados norte-americanos foram classificados na classe 2, embora quatro isolados clínicos dessa região foram classificados na classe 1 juntamente com a cepa Down. A classe 3, por sua vez, compreendeu duas cepas *American Type Culture Collection* (ATCC) oriundas do Panamá. A classe 4 inclui um isolado de origem ambiental oriundo da Florida. Um grupo composto por 5 isolados obtidos de pacientes com AIDS na cidade de Nova York foram classificados dentro da classe 5 juntamente com dois isolados do Panamá. A classe 6 foi composta por uma cepa obtida de um paciente com AIDS no Panamá.

Em 2003, Kasuga e colaboradores utilizando as variações na sequência de DNA de 4 genes codificantes de proteínas independentes, analisaram a relação filogenética entre 137 amostras representativas das 3 variedades de *H. capsulatum*, provenientes dos 5 continentes e observaram a existência de populações geográficas geneticamente distintas ou espécies filogenéticas. Esse estudo citado mostrou a existência de oito clados distintos: (i) clado norte americano classe 1; (ii) clado norte americano classe 2 (iii) clado latino americano grupo A (Lam A); (iv) clado latino americano grupo B (Lam B); (v) clado australiano; (vi) clado holandês; (vii) clado eurasiático, e (viii) clado africano. Sete dos oito clados representaram grupos geneticamente isolados, reconhecidos como espécies filogenéticas. A única exceção foi o clado da Eurásia que se originou dentro do clado da América Latina grupo A. Os clados Lam A e da África abrigaram diversos genótipos, enquanto que o restante dos clados apresentou pouca variação genética. Segundo Kasuga et al., (2003), a baixa variação genética encontrada nas populações das regiões temperadas e a alta variação genética encontrada nas populações das regiões tropicais podem ser explicadas pelo refúgio das mesmas durante o período glacial. Durante o Pleistoceno, período de frio intenso, as zonas temperadas estavam sujeitas a repetidas glaciações resultando no refúgio da comunidade biótica. Acredita-se que a radiação de *Histoplasma* teve início na América Latina, entre 3 a 13 milhões de anos atrás. Assim, os

clados da África, Austrália, Eurásia e da América do Norte são resultados da dispersão (KASUGA et al., 2003).

No Brasil, estudos têm demonstrado o perfil molecular de cepas de *H. capsulatum* circulantes nas regiões Sul e Sudeste (ZANCOPE et al., 2005; MUNIZ et al., 2010). Segundo Zancopé et al., (2005), cepas de *H. capsulatum* de diferentes regiões brasileiras foram agrupadas de acordo com a origem geográfica, através da técnica de RAPD-PCR. Nesse estudo citado, foram observados três *clusters*, que foram classificados em: *cluster* I (cepas de *H. capsulatum* pertencentes à região Nordeste), *cluster* II (cepas de *H. capsulatum* pertencentes à região Sul e Sudeste) e *cluster* III (cepas de *H. capsulatum* pertencentes à região Centro-Oeste).

Apesar do perfil molecular das cepas de *H. capsulatum* que circulam nas regiões Sul e Sudeste está bem caracterizado, existe uma escassez de dados nos genótipos circulantes em outras regiões do país, incluindo a região Nordeste. A falta de dados epidemiológicos dos genótipos circulantes na região Nordeste mostra a importância de estudos mais detalhados sobre a epidemiologia molecular de *H. capsulatum* nessa região.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Buscar estratégias de conversão *in vitro* em diferentes meios de cultura, detectar o gene *ryp1* e a realizar a caracterização molecular de cepas de *H. capsulatum*, oriundas do Estado do Ceará e do Sudeste brasileiro.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a taxa de conversão *in vitro* da fase filamentosa para a fase leveduriforme de *H. capsulatum* em diferentes meios de cultura suplementados ou não com sangue;
2. Detectar a presença do gene *ryp1* em cepas de *H. capsulatum* e diretamente de amostras clínicas por meio de PCR;
3. Obter o perfil molecular das cepas de *H. capsulatum* através da técnica de RAPD-PCR;
4. Confirmar a identidade molecular das cepas de *H. capsulatum* por meio do sequenciamento das regiões ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossômico nuclear;
5. Estabelecer a relação filogenética, com base no sequenciamento das regiões ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossômico nuclear, das cepas de *H. capsulatum* pertencentes à micoteca do CEMM com cepas de *H. capsulatum* depositadas no GenBank.

3. ARTIGOS CIENTÍFICOS

3.1 Capítulo 1

*Conversão de cepas de Histoplasma capsulatum de origem humana e veterinária:
Eficácia do meio de cultura suplementado com 10% de sangue de carneiro para a
realização de testes de sensibilidade in vitro*

Conversion of *Histoplasma capsulatum* strains from cats and humans: Effectiveness of
culture media enriched with 10% sheep blood for the performance of *in vitro*
susceptibility tests

Periódico: Research in Veterinary Science (submetido em dezembro de 2012)

Fator de Impacto: 1,760, Qualis B3

Research in Veterinary Science - Short Communication

Conversion of *Histoplasma capsulatum* strains from cats and humans: Effectiveness of culture media enriched with 10% sheep blood for the performance of *in vitro* susceptibility tests

Raimunda S.N. Brilhante^a, Joyce F. Ribeiro^a, Rita A.C. Lima^a, Juliana F. Pereira^a, Débora
S.C.M. Castelo-Branco^a, André J. Monteiro^c, Jacó R. L. Mesquita^d, Zoilo P. de
Camargo^e, Rossana A. Cordeiro^a, Marcos F.G. Rocha^{a,b}, José J.C. Sidrim^a

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

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

^cDepartment of Statistics and Applied Mathematics, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

^dSão José Hospital, Fortaleza, Ceará, Brazil.

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

Corresponding Author: R.S.N. Brilhante. Rua Barão de Canindé, 210; Montese. CEP: 60.425-540. Fortaleza, CE, Brazil. Fax: 55 (85) 3295-1736 E. mail: brilhante@ufc.br

Abstract

The use of culture media with simple composition is extremely important for *in vitro* conversion and maintenance of *H. capsulatum* in its parasitic yeast phase. The aim of this study was to test six different culture media to assess the *in vitro* conversion rate of each medium in *H. capsulatum* strains from animals (2 from cats) and humans (16 from AIDS-infected patients), in order to evaluate the *in vitro* antifungal susceptibility of these fungal strains in the yeast-like phase. Sabouraud agar supplemented with 10% sheep blood at 35 °C presented the highest conversion capacity, when compared to the other tested media. Additionally, MICs for azole derivatives, amphotericin B and caspofungin against *H. capsulatum* were obtained. Thus, Sabouraud agar supplemented with 10% sheep blood can be considered the medium of choice for the conversion of *H. capsulatum* strains, being especially useful for the performance of *in vitro* susceptibility tests.

Key words: *H. capsulatum*, susceptibility test, conversion, culture media.

The dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum* is the etiologic agent of histoplasmosis, an important systemic mycosis that has been reported worldwide (Anderson et al. 2010). In addition to affecting humans, histoplasmosis affects other mammals including dogs and cats (it is considered the second most common systemic fungal disease in cats) (Bromel et al. 2005; Brilhante et al. 2011).

The *in vitro* conversion of *H. capsulatum* from mycelial to yeast-like form, however, is not easily performed and it requires the use of enriched culture media and incubation at specific temperatures (35-37 °C) (Guimarães et al. 2008; Suárez-Alvarez et al. 2010). This technique is useful to study the antifungal susceptibility and the metabolism of this fungal agent, which are commonly made in its yeast-like phase, when the fungus presents its parasitic characteristics (Brilhante et al., 2011).

Several culture media have been used to induce *in vitro* conversion of *H. capsulatum* strains from mold to yeast-like form (Castelucci et al., 2007; Suárez-Alvarez et al., 2010), however, those media present complex composition and the conversion showed to be a difficult and laborious process. Therefore, the use of an appropriate medium for a rapid and complete conversion is fundamental. In this context, a study was performed using different media to evaluate the conversion rate and maintenance of veterinary and human *H. capsulatum* strains, aiming at their use in procedures that require isolates in the parasitic phase, such as *in vitro* susceptibility testing.

In this study, a total of 18 isolates from human and veterinary sources were used, out of which 16 were from HIV-infected patients with histoplasmosis and two strains were from cats with this mycosis. These strains are stored in the fungal collection of the Specialized Medical Mycology Center (CEMM) of the Federal University of Ceará, Brazil. All procedures involving the manipulation of the strains were performed in the Laboratory Biosafety Level 3.

All samples were inoculated on six different culture media: Sabouraud agar (Himedia, Mumbai, India) supplemented 5% sheep blood (SS5%); Sabouraud agar (Himedia, Mumbai, India) supplemented 10% sheep blood (SS10%); BHI agar (Himedia, Mumbai, India) supplemented 5% sheep blood (BS5%); BHI agar (Himedia, Mumbai, India) supplemented 10% sheep blood (BS10%); Sabouraud agar (Himedia, Mumbai, India) with 1% glucose (SG); and BHI agar (Himedia, Mumbai, India) with 1% glucose (BG). Afterwards, the culture tubes were incubated at temperature of 35 °C and the subculture was performed weekly. The procedure was maintained for two months (Lottenberg et al. 1979). Slides of the cultured material were prepared weekly and were examined through optical microscopy. Partial conversion was considered when at least of 30 yeast cells were observed per field with, a 40X objective, and mycelial forms were

still observed (Figure 1- 2B). Complete conversion of strains was considered when all cells examined in the glass slide were in the yeast-like form (Figure 1- 2C).

The protocol described by Brilhante et al. (2010) was used to evaluate the antifungal susceptibility of *H. capsulatum* strains grown on SS10% or BS10% media. Eight *H. capsulatum* strains in the yeast phase were randomly chosen. Each strain was evaluated against the antifungals itraconazole, voriconazole, fluconazole, amphotericin B and caspofungin. To prepare the fungal inoculate, the *H. capsulatum* strains were cultured on BS10% and SS10% media for 7 days at 35 °C. The readings were performed after 4 days of incubation at 35 °C. The strains of *Candida krusei* ATCC and *Candida parapsilosis* ATCC were included in the tests as quality control.

In order to compare the conversion rate between the different culture media, the nonparametric Wilcoxon Signed Rank Test was used. The minimum significance level adopted for conclusive results was 5%.

The conversion from mycelial to yeast-like form was obtained in all six media tested with incubation at 35 °C. Partial conversion was obtained within two weeks of growth on the media containing blood, while on those without blood partial conversion was only seen after 4 weeks of growth. Among the tested media, those supplemented with sheep blood at a concentration of 10% presented conversion rates of 94% and 83% for Sabouraud and BHI agar, respectively, which were higher than those for the other media. Table 1 shows the conversion rate of the 18 strains for each culture medium analyzed.

The statistical analysis showed that the Sabouraud agar supplemented with 10% sheep blood presented a significantly higher conversion rate, when compared Sabouraud agar supplemented with 5% sheep blood ($P=0.0231$) and Sabouraud agar supplemented with glucose ($P=0.0035$). However, no significant differences were observed between the conversion rates of Sabouraud agar supplemented with 5% sheep blood and that

supplemented with glucose (P=0.1875). Concerning BHI, the media supplemented with 10% (P=0.0086) and 5% (P=0.0103) sheep blood had a statistically greater conversion rate, when compared to that supplemented with glucose, but no significant difference was observed between them (P=0.7630). The growth of *H. capsulatum* strains in the yeast phase, after 15 days of incubation at 35 °C in the different media, is shown in Figure 1.

The results of *in vitro* susceptibility tests showed MIC values of 0.17; 0.015; 0.018; 8.51 and 3.66 µg/mL for amphotericin B, itraconazole, voriconazole, fluconazole and caspofungin, respectively, for yeast-like phase of *H. capsulatum*.

In this study, it was demonstrated that the culture media Sabouraud and BHI agar supplemented with sheep blood at different concentrations were more efficient, when compared to the other tested media (BHI and Sabouraud agar supplemented with 1% glucose). Previous studies have used complex media for an effective conversion of *H. capsulatum* strains, with the addition of blood, aminoacids, such as cysteine, aspartic acid and glutamic acid, and vitamins, like thiamine (Pine 1957; Fressati et al. 1992). This study, however, analyzed routinely used culture media supplemented with sheep blood. Blood plasma contains proteins (such as albumin), vitamins, electrolytes, hormones, glucose, lipids and many other substances. These compounds in the blood can be regarded as appropriate substrates that facilitate and increase the capacity of switching the strains of *H. capsulatum*, when associated with incubation at an appropriate temperature (35 °C) and weekly subcultures, as demonstrated in this research.

The *in vitro* conversion of dimorphic fungi is important for the performance of antifungal susceptibility tests, considering that it has been shown that the *in vitro* activity of certain antifungal drugs against dimorphic fungi varies, depending on the phase of the fungus (Brilhante et al., 2010). Most of these studies used the medium BHI supplemented with 1% glucose to obtain yeast cells. On the other hand, supplementation of BHI agar with 10% sheep blood, as suggested in this research, was successfully used in our

laboratory for testing the *in vitro* antimicrobial susceptibility of *H. capsulatum* in both forms and the media were appropriate for the preparation of the fungal inocula for the susceptibility assays. No differences were observed in the obtained MIC values, when comparing the different tested media and the obtained results agree with those from other studies with human strains of *H. capsulatum* (Li et al. 2000).

The present study shows that Sabouraud agar supplemented with 10% sheep blood is appropriate for the complete conversion of *H. capsulatum* strains and this medium can be successfully used in tests requiring the parasitic phase, such as *in vitro* susceptibility tests.

Acknowledgements

This research was supported by CAPES-PNPD (Process number: 2103/2009), CNPq (Process numbers: 562296/2010-7; 307402/2010-0; 552161/2011-0; 304779/2011-3) and FUNCAP (Process number: AE1-0052-00063010011).

References

- Anderson, A.M., Mehta, A.K., Wang, Y.F., Qian, G., Easley, K., Nguyen, L.M.T., 2010. HIV-Associated Histoplasmosis in a nonendemic area of the United States during the HAART era: role of migration from endemic areas and lack of antiretroviral therapy. *Journal of the International Association of Physicians in AIDS Care* 9, 296-300.
- Brilhante, R.S., Coelho, C.G., Sidrim, J.J., de Lima, R.A., Ribeiro, J.F., Cordeiro, R.A., Castelo-Branco, D.D., Gomes, J.M., Simões-Mattos, L., Mattos, M.R., Bezerra, H.E., Nogueira, G.C., de Queiroz Pinheiro, A., Rocha, M.F., 2011. Feline Histoplasmosis in Brazil: Clinical and Laboratory Aspects and a Comparative Approach of Published Reports. *Mycopathologia* 173, 193-197.

Brilhante, R.S., Fechine, M.A., Cordeiro, R.D., Rocha, M.F., Ribeiro, J.F., Monteiro, A.J., De Lima, R.A., De Camargo, Z.P., Sidrim, J.J., 2010. In vitro effect of sulfamethoxazole-trimethoprim against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54, 1-2.

Bromel, C., Sykes, J., 2005. Histoplasmosis in dogs and cats. *Clinical Techniques in Small Animal Practices* 20, 227-232.

Castelucci, S., De Paula Rogerio, A., Ambrosio, S.R., Arakawa, N.S., De Lira, S.P., Faccioli, L.H., Da Costa, F.B., 2007. Anti-inflammatory activity of *Dasyphyllum brasiliensis* (Asteraceae) on acute peritonitis by beta-glucan from *Histoplasma capsulatum*. *Journal of Ethnopharmacology* 112, 192-198.

Fressati, R., Dias-Siqueira, V.L., Svidzinski, T.I.E., Herrero, F., Kimmelmeier, C., 1992. A medium for inducing conversion of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* into its yeast-like form. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz* 87, 53-58.

Guimarães, A.J., Hamilton, A.J., De M Guedes, H.L., Nosanchuk, J.D., Zancopé-Oliveira, R.M., 2008. Biological function and molecular mapping of M antigen in yeast phase of *Histoplasma capsulatum*. *PLoS One* 3, 1-17.

Li, R.K., Ciblak, M.A., Nordoff, N., Pasarel, L., Warnock, D.W., McGinnis, M.R., 2000. In vitro activities of voriconazole, itraconazole and amphotericin B against *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, and *Histoplasma capsulatum*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 44, 1734-1736.

Lottenberg, R., Waldman, R.H., Ajello, L., Hoff, G.L., Bigler, W., Zelnner, S.R., 1979. Pulmonary histoplasmosis associated with exploration of a bat cave. *American Journal of Epidemiology* 110, 156-161.

Pine, L., 1957. Studies on the growth of *Histoplasma capsulatum*. III Effect of thiamin and other vitamins on the growth of the yeast and mycelia phases of *Histoplasma capsulatum*. *Journal of Bacteriology* 74, 239-245.

Suárez-Alvarez, R.O., Pérez-Torres, A., Taylor, M.L., 2010. Adherence patterns of *Histoplasma capsulatum* yeasts to bat tissue sections. *Mycopathologia* 170, 79-87.

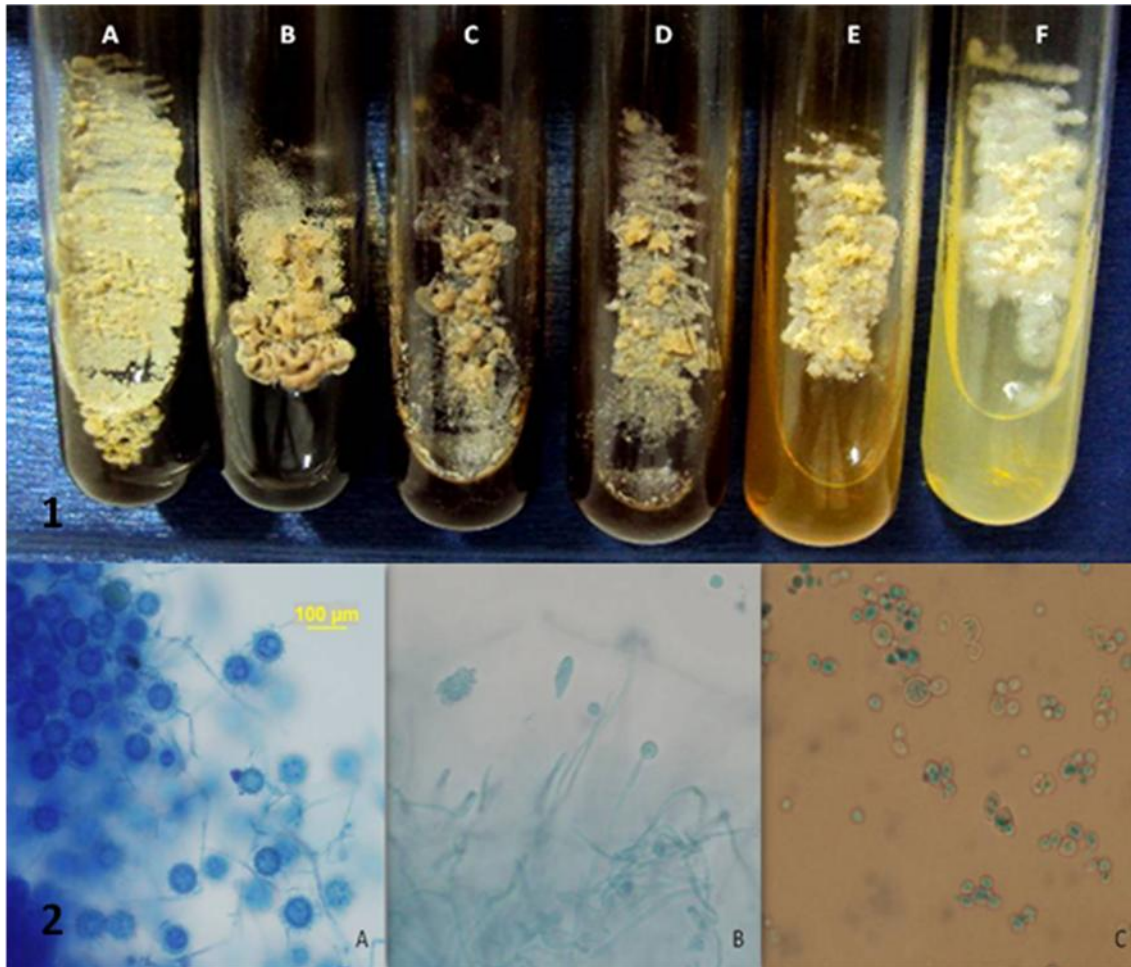


Figure 1. Growth of *H. capsulatum* strains in the yeast phase, after 15 days of incubation at 35 ° C in different media tested. Macroscopic aspect showing colonies of creamy texture, beige color with smooth or rough surface. 1a. Sabouraud agar supplemented with 10% sheep blood; 1b. Sabouraud agar supplemented with 5% sheep blood; 1c. BHI agar supplemented with 10% sheep blood; 1d. BHI agar supplemented with 5% sheep blood; 1e. BHI agar supplemented with 1% glucose, 1f. Sabouraud agar supplemented with

glucose 1%. 2a. Microscopic aspect of filamentous phase of *Histoplasma capsulatum* strains on potato agar at 25 ° C with one week growth, showing hyaline hyphae and presence of numerous microconidia and stalagmospores (400X); 2b. Microscopic aspect considered as parcial conversion: showing hyaline hyphae and yeast cells on Sabouraud agar supplemented with 10% sheep blood at 35°C with two weeks growth (400X); 2c. Microscopic aspect of yeast phase of *Histoplasma capsulatum* strains on Sabouraud agar supplemented with 10% sheep blood at 35°C, with four weeks growth, showing yeast cells unibrotantes, round and oval (400X).

Table 1. Conversion rate of strains of *Histoplasma capsulatum* in the six different media of culture studied

Culture media	Complete conversion	Partial conversion	No conversion
SS 10%	11 (61%)	6 (33%)	1 (5,5%)
SS 5%	7 (38%)	7 (38%)	4 (22%)
BS 10%	9 (50%)	6 (33%)	3 (16%)
BS 5%	8 (44%)	6 (33%)	4 (22%)
SG	5 (27%)	7 (38%)	6 (33%)
BG	4 (22%)	5 (27%)	9 (50%)

3.2 Capítulo 2

Gene ryp1 como região alvo para o diagnóstico molecular da histoplasmose

Ryp1 gene as a target for the molecular diagnosis of histoplasmosis

Periódico: Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

(submetido em dezembro de 2012)

Fator de Impacto: 2,528, Qualis B2

***Ryp1* gene as a target for the molecular diagnosis of histoplasmosis**

Running title: Detection *Ryp1* gene by PCR assay

Raimunda S. N. Brilhante^a, Joyce F. Ribeiro^a, Rita A. C. Lima^a, André J. Monteiro^c,
Débora S. C. M. Castelo-Branco^a, Manoel P. Araújo Neto, Jacó R. L. Mesquita^d, Rossana
A. Cordeiro^a, Marcos F. G. Rocha^{a,b}, José J. C. Sidrim^a

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

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

^cDepartment of Statistics and Applied Mathematics, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

^dSão José Hospital, Fortaleza, Ceará, Brazil.

Corresponding Author: R.S.N. Brilhante. Rua Barão de Canindé, 210; Montese. CEP: 60.425-540. Fortaleza, CE, Brazil. Fax: 55 (85) 3295-1736 E. mail: brilhante@ufc.br

Abstract

The present article reports *Ryp1* gene as a target for the molecular diagnosis of histoplasmosis. The PCR assay identified clinical strains of *H. capsulatum* and detected the fungal DNA in clinical specimens. We believe that the detection of *Ryp1* gene in whole blood is a quick test to diagnose histoplasmosis.

Histoplasma capsulatum is a dimorphic fungus that causes respiratory and systemic disease in mammals and presents universal distribution (Kauffman, 2007). Recently, a transcriptional regulator, the *Ryp1* gene, was identified, showing to be essential for the conversion from the mycelial to the yeast-like form (Nguyen, Sil, 2008).

The diagnosis of histoplasmosis can be achieved through several techniques, such as fungal isolation from clinical specimens, histopathology of tissue samples and the detection of fungal antigens, anti-*H. capsulatum* antibodies and/or fungal DNA through PCR methods (Gupta et al., 2010; Eliás et al., 2012). However, the disadvantage of cultivation of the fungus as a method of diagnosis is the prolonged time necessary for the identification of the etiologic agent, which it can delay the appropriate therapy. Moreover, this fungus is considered at risk for laboratory workers and should be handled in a laboratory biosafety 3 (Guimarães et al., 2008). Thus, molecular methods, based on different PCR techniques, have been successfully used for the rapid diagnosis of histoplasmosis (Highland et al., 2011). However, we must be careful in selecting the target sequences to obtain a good sensitivity and specificity of the assay. In this context, a protocol of PCR assay was developed for the early molecular identification of *H. capsulatum* and for the early diagnosis of histoplasmosis directly from clinical specimens.

In this study, a total of 18 strains of *H. capsulatum* were evaluated. Two of them were isolated from cases of feline histoplasmosis, while the other 16 were isolated from

human cases of the mycosis. These strains belong to the fungal collection of the Specialized Medical Mycology Center (CEMM) of the Federal University of Ceará, Brazil. All procedures involving the manipulation of the strains were performed in the Laboratory Biosafety Level 3. In addition, clinical specimens (3 blood cultures) recently recovered from patients with confirmed histoplasmosis, were included in this study. The diagnosis was made by direct examination and culture positive. Other microorganisms were included as control in the analysis, such as *Paracoccidioides brasiliensis* (n=2), *Coccidioides posadasii* (n=1), *Sporothrix schenckii* (n=1) and *Candida albicans* (n=1).

The extraction DNA method was performed as described by (Talbot, 2001) with modifications. For amplification of the *Ryp1* gene, the primers used were OAS1057 (5' ACCCTTGCAGCTTACAACCT 3') and OAS1058 (5' TCCGTCCATCGCTTAATACC 3'), as described in (Nguyen, Sil, 2008). The PCR reaction for detection of *Ryp1* gene in 18 clinical strains of *H. capsulatum*, as well as in strains of *P. brasiliensis*, *C. posadasii*, *S. schenckii* and *C. albicans* was performed using DNA samples at a concentration 100 ng/ μ L. For detection of *Ryp1* gene directly from clinical specimens, three different concentrations of DNA were tested (5, 10 and 25 ng / μ L). A volume of 2 μ L of each DNA sample were added to 8 μ L of mix containing: 1X reaction buffer (Promega, USA), 1 mM MgCl₂ (Promega, USA), 2 pmol of each OAS1057 and OAS1058 (Invitrogen, USA), 0.5 mM of each desoxyribonucleotide (Thermo Scientific) and 1U/ μ L of Go Hot Start Taq polymerase (Promega, USA), resulting in a final volume of 10 μ L. Negative controls without the presence of DNA were submitted to amplification simultaneously. The PCR thermal cycler (Eppendorf Mastercycler) was programmed for initial denaturation at 95 °C for 2 minutes, followed by: 10 cycles of denaturation at 95 °C for 1 minute, annealing at 58 °C for 45 seconds and extension at 72 °C for 1 minute; 10 cycles of denaturation at 95 °C for 1 minute, annealing at 55 °C for 45 seconds and extension at 72 °C for 1 minute; 15 cycles of denaturation at 95 °C for 1 minute,

annealing at 53 ° C for 45 seconds and extension at 72 ° C for 1 minute. Finally, a final extension cycle at 72 ° C for 7 minutes. The amplified products were analyzed by electrophoresis on 1% agarose gel stained with ethidium bromide.

The PCR amplification of *Ryp1* gene occurred in all 18 strains of *H. capsulatum*, showing an amplified fragment of 300 pb, visualized on 1% agarose gel. The PCR technique also detected the *Ryp1* gene directly into three clinical samples (whole blood), with amplification at the three concentrations of DNA tested (5, 10 and 25 ng). No amplification was observed in *P. brasiliensis*, *C. posadasii*, *S. schenckii* and *C. albicans* strains (Figure 1).

Different molecular methods have been used as alternative for a rapid diagnosis of histoplasmosis. Most of these studies have used nested or semi nested PCR assays for detection of *H. capsulatum* (Bialek et al., 2002; Bracca et al., 2003). However, the search for a suitable target sequence is critical to obtain a highly sensitive and specific technique. Target sequences within the 18S rRNA genes are often used for diagnostic PCR to achieve high sensitivity, since multiple gene copies are usually present within a single genome (Eliás et al., 2012). However, Bialek et al. (2002) found a high rate of false-positive results when used a nested PCR assay, targeting the 18S rRNA gene. This study developed a simple PCR method that allowed the direct detection of *H. capsulatum* in clinical specimens, using the gene *Ryp1* as a target region. This assay was specific for identification of *H. capsulatum*, since no cross-reactivity was observed regarding other dimorphic fungi or yeasts, such as *C. albicans*. Furthermore, this technique was sensitive, allowing the amplification of the gene *Ryp1* in all of the samples of *H. capsulatum* and in the tested clinical specimens, it was possible to detect *H. capsulatum* using minimal amounts of DNA to 5ng. It is noteworthy that, the search of DNA *H. capsulatum* in blood may increase the number of diagnosed cases, because it is an easily obtained clinical material compared with bronchial alveolar lavage or surgical biopsies.

Thus, we suggest that the gene *Ryp1* not only can be used as target for the molecular identification of *H. capsulatum*, but also for the molecular diagnosis of histoplasmosis, directly from clinical specimens.

References

1. Bialek R, Ernst F, Dietz K, Najvar LK, Knobloch J, Graybill JR, Schaumburg-Lever G. Comparison of staining methods and a nested PCR assay to detect *Histoplasma capsulatum* in tissue sections. *Am J Clin Pathol* 2002; 117:597-603.
2. Bracca A, Tosello ME, Girardini JE, Amigot SL, Gomez C, Serra E. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in human clinical samples. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1753-55.
3. Eliás NA, Cuestas ML, Sandoval M, Poblete G, Lopez-Daneri G, Jewtuchowicz V, Iovannitti C, Mujica MT. Rapid identification of *Histoplasma capsulatum* directly from cultures by multiplex PCR. *Mycopathologia* 2012; 174: 451-6.
4. Guimarães AJ, Hamilton AJ, De M Guedes HL, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Biological function and molecular mapping of M antigen in yeast phase of *Histoplasma capsulatum*. *PLoS One* 2008; 3:1-17.
5. Gupta N, Arora SK, Rajwanshi A, Nijhawan R, Srinivasan R. Histoplasmosis: cytodiagnosis and review of literature with special emphasis on differential diagnosis on cytomorphology. *Cytopathology* 2010; 21:240-4.
6. Highland MA, Chaturvedi S, Perez M, Steinberg H, Wallace R. Histologic and molecular identification of disseminated *Histoplasma capsulatum* in a captive brown bear (*Ursus arctos*). *J Vet Diagn Invest* 2011; 23: 764-69.

7. Kauffman CA. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. Clin Microbiol Rev 2007; 20:115-32.
8. Nguyen VQ, Sil A. Temperature-induced switch to the pathogenic yeast form of *Histoplasma capsulatum* requires *Ryp1*, a conserved transcriptional regulator. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105: 4880-85.
9. 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.

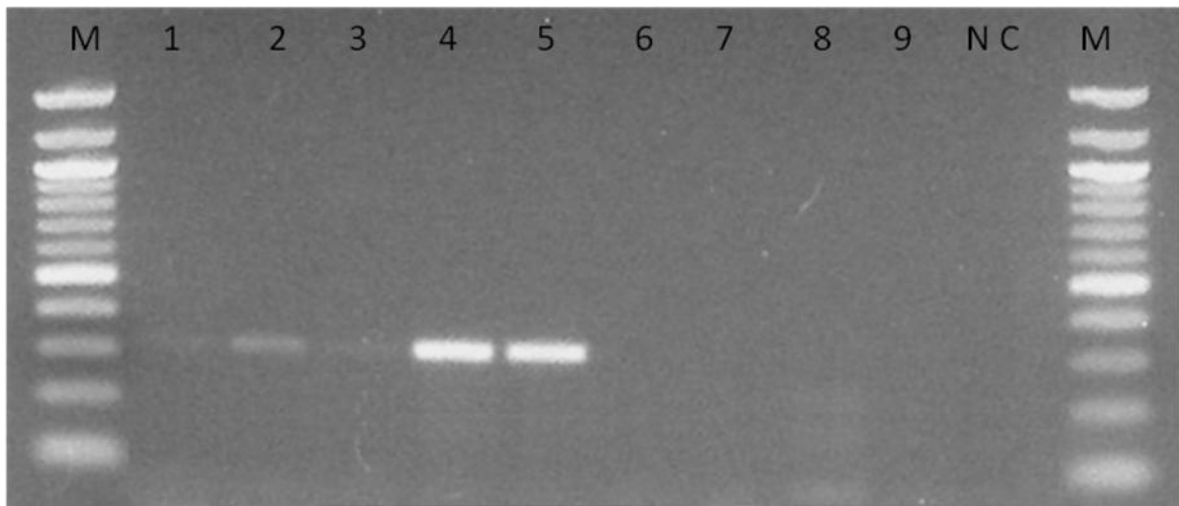


Figura 1. Gel electrophoresis in 1% agarose representative, showing fragments of approximately 300 bp gene, specific for *Ryp1* gene of *Histoplasma capsulatum*. (M: molecular weight marker 100 bp; 1-3: *Ryp1* gene amplification directly from whole blood (DNA concentration of 25 ng); 4-5: *Ryp1* gene amplification in strains of *H. capsulatum*; 6-9: absence of amplification of *Ryp1* gene in strains of *P. brasiliensis*, *C. posadasii*, *S. schenckii* and *C. albicans*, respectively; NC: negative control).

3.3 Capítulo 3

Avaliação da diversidade genética de isolados de Histoplasma capsulatum var. capsulatum da região Nordeste do Brasil

Evaluation of the genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* isolates from north-eastern Brazil

Periódico: Journal of Medical Microbiology (aceito em setembro de 2012)

Fator de Impacto: 2,502, Qualis B2

Evaluation of the genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* isolates from north-eastern Brazil

Raimunda S.N. Brilhante^a, Joyce F. Ribeiro^a, Rita A.C. Lima^a, Débora S. C. M. Castelo-Branco^a, Rodrigo Martins Soares^d, Jacó R. L. Mesquita^c, Thalles Barbosa Grangeiro^e, Zoilo P. de Camargo^f, Rossana A. Cordeiro^a, Marcos F.G. Rocha^{a,b}, José J.C. Sidrim^a

^a Department of Pathology and Legal Medicine, College of Medicine, Post-Graduation Program in Medical Microbiology, Specialized Medical Mycology Center, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

^b College of Veterinary Medicine, Post-Graduation Program in Veterinary Sciences, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

^c São José Hospital, Fortaleza, Ceará, Brazil.

^d Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health. College of Veterinary Medicine, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

^e Department of Biological Sciences, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

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

***Corresponding Author:** R.S.N. Brilhante. Rua Barão de Canindé, 210; Montese. CEP: 60.425-540. Fortaleza, CE, Brazil. Fax: 55 (85) 3366-8319 E mail: brilhante@ufc.br

ABSTRACT

Since the beginning of the HIV epidemic, there has been a significant increase in the number of histoplasmosis cases in Brazil's northeastern state of Ceará. The lack of epidemiological data on the genotypes circulating in the Northeast region shows the importance of more detailed studies on the molecular epidemiology of *H. capsulatum* var. *capsulatum* in this region. Different molecular techniques have been used to better characterize the genetic profile of *H. capsulatum* var. *capsulatum* strains. This study aimed to analyze the genetic diversity of *H. capsulatum* var. *capsulatum* isolated in Fortaleza, the capital of Ceará, through the sequencing of the ITS1-5.8S-ITS2 regions, as well as to establish the molecular profile of these isolates and strains from southeastern Brazil by the RAPD assay, featuring the different clusters in those regions. The isolates were grouped into two clusters. Cluster 1 included strains from the Southeast and Northeast regions, with separation of isolates into three distinct subgroups (subgroups 1a, 1b and 1c). Cluster 2 included only samples from northeastern Brazil. The sequencing of the ITS1-5.8S-ITS2 regions allowed the detection of two major clades, showing geographical correlation between them and their subgroups. Therefore, it can be concluded that the *H. capsulatum* var. *capsulatum* isolates from Ceará have a high degree of genetic polymorphism. The molecular data contributes also confirm that different genotypes comprise populations of this fungus in Brazil and worldwide.

INTRODUCTION

Histoplasmosis is an important systemic mycosis, whose etiological agent is the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. The natural habitat of this fungus is soil, where it grows as a filamentous saprophyte (Kauffman, 2009). This mycosis is widely distributed in the Americas, with predominance of cases in some areas of the United States along the valleys of the Mississippi and Ohio rivers and in countries of Central and South America (Rossini & Goulart, 2006; Ferreira & Borges, 2009).

In Brazil, the occurrence of histoplasmosis is relatively common, as demonstrated by the observation of autochthonous clinical cases, either in isolated cases or in the form of outbreaks (Chang et al., 2007). With the advent of AIDS in the 1980s and 90s, several cases of histoplasmosis were observed among patients with this syndrome. Currently, histoplasmosis is the most common systemic mycosis among HIV-infected individuals in endemic areas (Daher et al., 2006).

In Ceará, the incidence of histoplasmosis has more than doubled among patients with AIDS in the past decade. There were 191 cases of histoplasmosis in AIDS patients in the period between 1999 and 2005 (Pontes et al., 2010). In 2011, Brilhante conducted a descriptive analysis of histoplasmosis cases in AIDS patients in Ceará in the period from 2006 to 2010. This study evaluated 208 cases of individuals diagnosed with histoplasmosis and AIDS (Brilhante et al., 2012). Due to the increase in histoplasmosis cases in the world, many authors have attempted to trace a molecular and epidemiological profile of this disease through molecular techniques, in order to better understand its distribution and pathogenicity (Taylor et al., 2000; Karimi et al., 2002; Kasuga et al., 2003).

Some studies have demonstrated the molecular profile of the *H. capsulatum* var. *capsulatum* strains in the Southern and Southeastern regions of Brazil (Zancopé et al., 2005; Muniz et al., 2010). However, there is a scarcity of data on the genotypes

circulating in the other regions of the country, including the Northeast. Thus, the present study aimed at evaluating the genetic diversity of human and animal strains of *H. capsulatum* var. *capsulatum*, isolated in Fortaleza, Northeastern Brazil, through the sequencing of the ITS1-5.8S-ITS2 regions, as well as to establish the molecular profile of these isolates and strains from southeastern Brazil, by the RAPD assay, featuring the different clusters in those regions.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms

In this study, we used 31 strains of *H. capsulatum* var. *capsulatum*, 26 from the state of Ceará, in Northeastern Brazil, out of which 24 were recovered from AIDS patients with histoplasmosis from the municipalities of Fortaleza (n=18, CEMM-05-1-097, CEMM-05-1-100, CEMM-03-1-052, CEMM-05-1-069, CEMM-05-2-002, CEMM-05-2-052, CEMM-05-2-034, CEMM-05-1-098, CEMM-05-1-099, CEMM-05-2-001, CEMM-05-2-035, CEMM-05-1-070, CEMM-05-2-074, CEMM-05-2-049, CEMM-05-2-038, CEMM-05-2-019, CEMM-05-1-066, CEMM-05-2-039), Paracuru (n=2, CEMM-05-2-043, CEMM-05-2-072), Itaitinga (CEMM-05-2-042), Trairi (CEMM-05-2-037), Cascavel (CEMM-05-1-096) and Horizonte (CEMM-05-2-021). The two remaining isolates from Ceará were obtained from cats from Fortaleza and Baturité (CEMM-03-3-055, CEMM-03-6-059); and five clinical strains were isolated from the Southeastern region of Brazil (CEMM-03-6-024, CEMM-03-6-020, CEMM-03-4-081, CEMM-03-4-036, CEMM-05-4-015). These strains are stored in the culture collection of the Specialized Medical Mycology Center (CEMM), Federal University of Ceará, Brazil. All procedures involving the manipulation of the strains were performed in a biosafety level 3 laboratory (NB-3).

Extraction of genomic DNA

Genomic DNA was extracted from yeast phase of the microorganism grown for five days at 35 °C in Sabouraud agar (Himedia, Mumbai, India) supplemented with 10% sheep blood. DNA extraction was performed as described by Ausubel et al. (2002). Thus, genomic DNA was extracted by mechanical lysis with glass beads and chemistry lysis with breaking buffer. The nucleic acids were precipitated with ethanol after exposure to a solution of phenol/chloroform/isoamyl alcohol to separate the cellular debris. The DNA pellet was then resuspended in TE buffer and stored at 4 °C. The DNA quantification was performed by spectrophotometry and its integrity was analyzed by 1% agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining.

RAPD-PCR assay

The genetic polymorphism of the *H. capsulatum* var. *capsulatum* isolates was assessed by the RAPD assay. RAPD reactions were performed with 31 strains of *H. capsulatum* using four primers: primer 2 (5' GTTTCGCTCC3'), primer 3 (5'GTAGACCCGT3'), primer 4 (5' AAGAGCCCGT3'), and primer 5 (5'AACGCGCAAC3'), as described by Zancopé-Oliveira et al. (2005), with modifications. The RAPD reaction was performed in a total volume of 10µL containing 50 ng of *H. capsulatum* DNA, 1X buffer, 1mM MgCl₂, 2 pmol primer, 0.5mM of each dNTPs and 1U of Hot Start Taq polymerase (Promega, Madison, WI, USA). Negative controls, without the presence of DNA, were subjected to amplification simultaneously. The amplification was performed in a Mastercycler thermocycler (Eppendorf, Germany), involving initial denaturation at 95 °C for 5 minutes followed by 45 cycles of denaturation at 95 °C for 1 minute, annealing at 36 °C for 1 minute and extension at 72 °C for 2 minutes, and finally, one cycle of final extension at 72 °C for 10 minutes. The visualization of the amplified products was performed by electrophoresis on 2% agarose

gel containing ethidium bromide, followed by exposure to UV light through a transilluminator.

RAPD-PCR data analysis

The RAPD profile was defined by bands. The size of all bands seen on agarose gel was calculated using the analysis E-Capt software (Vilber Lourmat, France). The data matrix was determined by the presence (1) or absence (0) of amplification products. The construction of the dendrogram was based on the similarity of the data matrix, using the unweighted pair group with arithmetic mean (UPGMA) clustering method (Huson & Bryant, 2006).

Sequencing of the ITS1-5.8S-ITS2 region

Considering that the strains within the same group present similar genotypical profiles, at least one isolate from each RAPD cluster was selected to be further analyzed by ITS sequencing. A total of 15 randomly chosen strains of *H. capsulatum* var. *capsulatum* were used in the sequencing reactions, 12 from the Northeastern region (10 isolates from HIV-infected patients with histoplasmosis: CEMM-05-2-001, CEMM-05-1-070, CEMM-05-1-096, CEMM-05-1-098, CEMM-05-2-034, CEMM-05-2-039, CEMM-05-2-002, CEMM-05-2-072, CEMM-05-2-049, CEMM-05-2-037; two from animals: CEMM-03-3-055, CEMM-03-6-059; and three clinical strains from the Southeastern region of Brazil: CEMM-03-6-020, CEMM-03-4-036 and CEMM-05-4-015). The sequencing reactions were performed at the Genetics Laboratory of Federal University of Ceará, Brazil..

The ITS1-5.8S-ITS2 region was amplified using the universal primers ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') and ITS5 (5' GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G 3') as described by White et al. (1990). The amplification reactions were performed in a final volume of 25 µL, containing 200 ng of DNA, reaction buffer 1X (Green GoTaq Buffer, Promega), 1.5 mmol/L of MgCl₂, 12.5 pmol of each primer, 10

mmol/L of each dNTPs and 1U of Taq DNA polymerase (GoTaq Hot Start DNA polymerase, Promega). Negative controls, without the presence of DNA, were subjected to amplification simultaneously. The amplification was performed in a Mastercycler thermocycler (Eppendorf, USA), involving initial denaturation at 95 °C for 2 min followed by 33 cycles of denaturation at 95 °C for 1 min, annealing at 55 °C for 90 seconds and extension at 72 °C for 3 min and finally one cycle of final extension at 72 °C for 8 min. The visualization of the amplified products was performed by electrophoresis on 1% agarose gel containing ethidium bromide, followed by exposure to UV light. Subsequently, the PCR products were purified using the GFX PCR DNA and gel band purification kit (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK). The ITS1-5.8S-ITS2 region was sequenced using primers ITS4 and ITS5, as described above. The sequencing reactions were then analyzed in a MegaBACE 1000 automated sequencer (GE Healthcare Life Sciences). The program CodonCode Aligner 3.03 was used to generate the consensus sequences. The determined sequences were compared to those already deposited in the GenBank database (www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank) using the BLAST program (Altschul et al., 1990). The program MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis, version 4.1) (Tamura et al., 2007) was used for phylogenetic analysis.

Phylogenetic analysis

The phylogenetic relationship of the ITS1-5.8S-ITS2 sequences from the clinical *H. capsulatum* var. *capsulatum* isolates used in this study with corresponding sequences from other *H. capsulatum* var. *capsulatum* strains circulating in the world, was determined using the MEGA4 program (Molecular Evolutionary Genetic Analysis, version 4.1) (Tamura et al., 2007). A total of 96 ITS1-5.8S-ITS2 sequences of strains from different geographic locations were retrieved from the GenBank database and it used for this analysis (Table 1). The evolutionary history was inferred using the Maximum Parsimony method (Eck & Dayhoff, 1966). It was obtained using the Close-

Neighbor-Interchange algorithm (Nei & Kumar, 2000). Branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% bootstrap replicates were collapsed. The bootstrap consensus tree inferred from 500 replicates was taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed. There were a total of 405 positions in the final dataset, out of which 12 were parsimony informative.

RESULTS

RAPD profile analysis revealed a total of 68 fragments with sizes ranging from 143 to 1,291 bp. Primer 2 (5' GTTTCGCTCC3') was the most polymorphic of the primers tested, producing a total of 21 different bands. A representative RAPD pattern obtained by primer 2 is shown in Figure 1, in which 25 different genotypic patterns were observed.

The dendrogram constructed using the UPGMA cluster analysis method grouped all 31 samples into two major clusters (Figure 2). Cluster 1 included 26 strains, originating from the Northeast and Southeast regions of Brazil. Within this cluster there was a clear separation into three distinct subgroups (subgroups 1a, 1b and 1c). The first subgroup included 10 samples from both the Northeast and Southeast regions. Subgroup 1b included four samples from the Northeast and the subgroup 1c included three samples, being two from animal sources. The rest of the samples showed similar differences between them, allowing no inference of close evolutionary relationships. The second cluster included five samples, all of them from the city of Fortaleza, northeastern Brazil.

The ITS1-5.8S-ITS2 sequences determined in this work were submitted to similarity searches on the GenBank database, and the results confirmed the identification of all strains as *H. capsulatum* var. *capsulatum*.

In the phylogenetic tree based on the ITS1-5.8S-ITS2 sequences (Figure 3), the isolates were classified into two distinct clades. The clusters formed by *H. capsulatum*

var. capsulatum isolates correlated with their geographical origin. Clade 1 comprised the majority of strains and included isolates from different geographical locations. Within this clade, there were three baseline subclades. The first subclade grouped strains from different parts of the world, such as Asia, the Americas and Oceania. It is noteworthy that all isolates from the northeastern Brazil, including 13 strains from Ceará and two strains from the neighboring state of Pernambuco, are grouped in this subclade. The second subclade consisted of isolates from the United States together with an isolate from Costa Rica. Subclade 3 grouped Brazilian isolates from the Midwest, Southeast and South regions together with two isolates from Argentina and one isolate from Colombia. The second clade was composed exclusively of isolates from Rio de Janeiro state.

DISCUSSION

The increasing number of histoplasmosis cases together with the lack of data on the epidemiology and genotypes circulating in the Northeast region demonstrates the importance of further studies of *H. capsulatum var. capsulatum* in this region. In this study, we observed a high degree of genetic variability among *H. capsulatum var. capsulatum* isolates analyzed by the RAPD assay, allowing characterizing the molecular profile of the isolates and detecting different clusters, circulating in the Northeast and Southeast of Brazil. Moreover, the analysis of polymorphisms in the ITS1-5.8S-ITS2 region allowed detecting that *H. capsulatum var. capsulatum* presents different molecular types distributed in the world. This information is particularly useful for a better understanding of the genotypes circulating in Latin America.

Regarding the RAPD assay analysis, the results allowed characterization of two main clusters. The first cluster showed a high prevalence of genotypes detected. Thus, it grouped 84% of the strains (n = 26) of human and animal origin from the Northeast and Southeast regions. On the other hand, cluster 2 was restricted to 16% of the samples (n =

5), which had a high rate of genetic similarity between them, being composed of strains of human origin exclusively from the Northeast region. More detailed studies are needed to verify if the strains belonging to this group (cluster 2) show any difference in virulence or pathogenicity to separate them from the other larger group (cluster 1). Previous studies have shown that *H. capsulatum* var. *capsulatum* strains can be grouped according to their geographical origin. According to the study by Zancopé et al. (2005), there are three clusters, related to the Northeast (Cluster I; n=3), South and Southeast (Cluster II; n=17) and Midwest regions (Cluster III; n=2) of Brazil. In that study, the cluster of strains in the Northeast region was composed of only three strains from this region, two from Pernambuco and one from Ceará. In contrast, this study provided a more accurate analysis of the genetic variability and the existence of different clusters among *H. capsulatum* var. *capsulatum* strains in the Northeast region. We analyzed a larger number of isolates (n=31), assessing the most appropriate way of forming a general overview of histoplasmosis in Brazil. As observed in other studies, *H. capsulatum* var. *capsulatum* isolates tend to cluster according to geographical origin and different genotypes can be found within the same cluster (Kasuga, et al., 2003; Muniz, et al., 2010).

As observed in the present work, the ITS1-5.8S-ITS2 region showed to be adequate for the detection of different clades, with geographic correlation among them. The analysis of the relationship between the sequences of ITS1-5.8S-ITS2 of *H. capsulatum* var. *capsulatum* isolates from Brazil and other countries revealed that all the isolates from the northeastern Brazil were grouped in the same subclade and showed genetic similarities with strains originating from several continents. A group of isolates consisting exclusively of strains from Rio de Janeiro state were grouped into a distinct clade. This result corroborates that of Muniz et al. (2010), who successfully typed *H. capsulatum* with the same genetic region, and observed a single genetic population in the microenvironment of Rio de Janeiro state.

The present study is a pioneer in the analysis of genetic variability of *H. capsulatum* var. *capsulatum* strains circulating in the Northeast region of Brazil, contributing greatly to characterize the population of this microorganism in this region.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; Brazil; PROTAX Process: 562296/2010-7, CNPq processes 552161/2011-0 and 304779/2011-3) and by the Brazilian Federal Agency for the Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES; Brazil; PNPD Process: 2103/2009).

REFERENCES

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R.R., Moore, D.D., Seidman, J.J., Smith, J.A., Struhl, K. (2002). A compendium of methods from current protocols in molecular biology, in *Molecular Biology: Vol. 1*, Wiley, New York.

Brilhante, R.S., Fechine, M.A., Cordeiro, R.D., Rocha, M.F., Ribeiro, J.F., Monteiro, A.J., De Lima, R.A., De Camargo, Z.P., Sidrim, J.J. (2010). In vitro effect of sulfamethoxazole-trimethoprim against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 3978-3979.

Brilhante, R.S., Fechine, M.A., Mesquita, J.R.L., Cordeiro, R.D., Rocha, M.F., Monteiro, A.J., De Lima, R.A., Caetano, E.P., Pereira, J.F., Castelo-Branco, D.S.C.M., De Camargo, Z.P., Sidrim, J.J. (2012). Histoplasmosis in HIV-positive patients in Ceará, Brazil: clinical-laboratory aspects and in vitro antifungal susceptibility of *Histoplasma capsulatum* isolates. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* **106**, 484-488.

Chang, M.R., Taira, C.L., Paniago, A.M.M., Taira, D.L., Cunha, R.V., Wanke, B. (2007). Study of 30 cases of histoplasmosis observed in Mato Grosso do Sul State, *Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo* **49**, 37-39.

Daher, F.E., Barros, F.A.S, da Silva Júnior, G.B., Takeda, C.F.V., Mota, R.M.S., Ferreira, M.T., Martins, J.C., Oliveira, S.A.J., Gutiérrez-Adrianzén, O.A. (2006). Risk factors for death in acquired immunodeficiency syndrome-associated disseminated histoplasmosis. *Am J Trop Med Hyg* **74**,600–603.

Eck, R.V & Dayhoff, M.O. (1966). Atlas of Protein Sequence and Structure. National Biomedical Research Foundation, Silver Springs, Maryland.

Ferreira, M.S. & Borges, A.S. (2009). Histoplasmosis. *Rev Soc Bras Med Trop* **42**, 192-198.

Huson, D.H & Bryant, D. (2006). Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Mol Biol Evol* **23**, 254-267.

Karimi, K., Wheat, L.J., Connolly, P., Cloud, G., Hajjeh, R., Wheat, E., Alves, K., Lacaz, C.S., Keath, E. (2002). Differences in histoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome in the United States and Brazil. *J Infect Dis* **186**, 1655-1660.

Kasuga, T., White, T.J., Koenig, G., McEwen, J., Restrepo, A., Castañeda, E., Da Silva Lacaz, C., Heins-Vaccari, E.M., De Freitas, R.S. & other authors. (2003). Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol Ecol* **12**, 3383-3401.

Kauffman, C.A. (2009). Histoplasmosis. *Clin Chest Med* **30**, 217-225.

Muniz, M.M, Morais e Silva Tavares, P., Meyer, W., Nosanchuk, J.D., Zancopé-Oliveira, R.M. (2010). Comparison of different DNA-based methods for molecular typing of *Histoplasma capsulatum*. *Appl Environ Microbiol* **76**, 4438-4447.

Nei, M. & Kumar, S. (2000). Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.

Pontes, L.B., Leitão, T.M.J.S., Lima, G.G., Gerhard, E.S. (2010). Clinical and evolutionary characteristics of 134 patients with disseminated histoplasmosis associated with AIDS in the State of Ceará. *Rev Soc Bras Med Trop* **43**, 27-31.

Rossini, F.T. & Goulart, L.S. (2006). Classic histoplasmosis: Review. *RBAC* **38**, 275-279.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596-99.

Taylor, M.L., Chávez-Tapia, C.B., Reyes Montes, M.R (2000). Molecular Typing of *Histoplasma capsulatum* Isolated from Infected Bats, Captured in Mexico. *Fungal Genet Biol* **30**, 207-212.

Zancopé-Oliveira, R.M, Morais e Silva Tavares, P. Muniz, M.M. (2005). Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains in Brazil. *FEMS Immunol Med Microbiol* **45**, 443-449.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S.B., Taylor, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for Phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, PCR Protocols: a guide to methods and applications, Academic, San Diego, USA, p. 315-322.

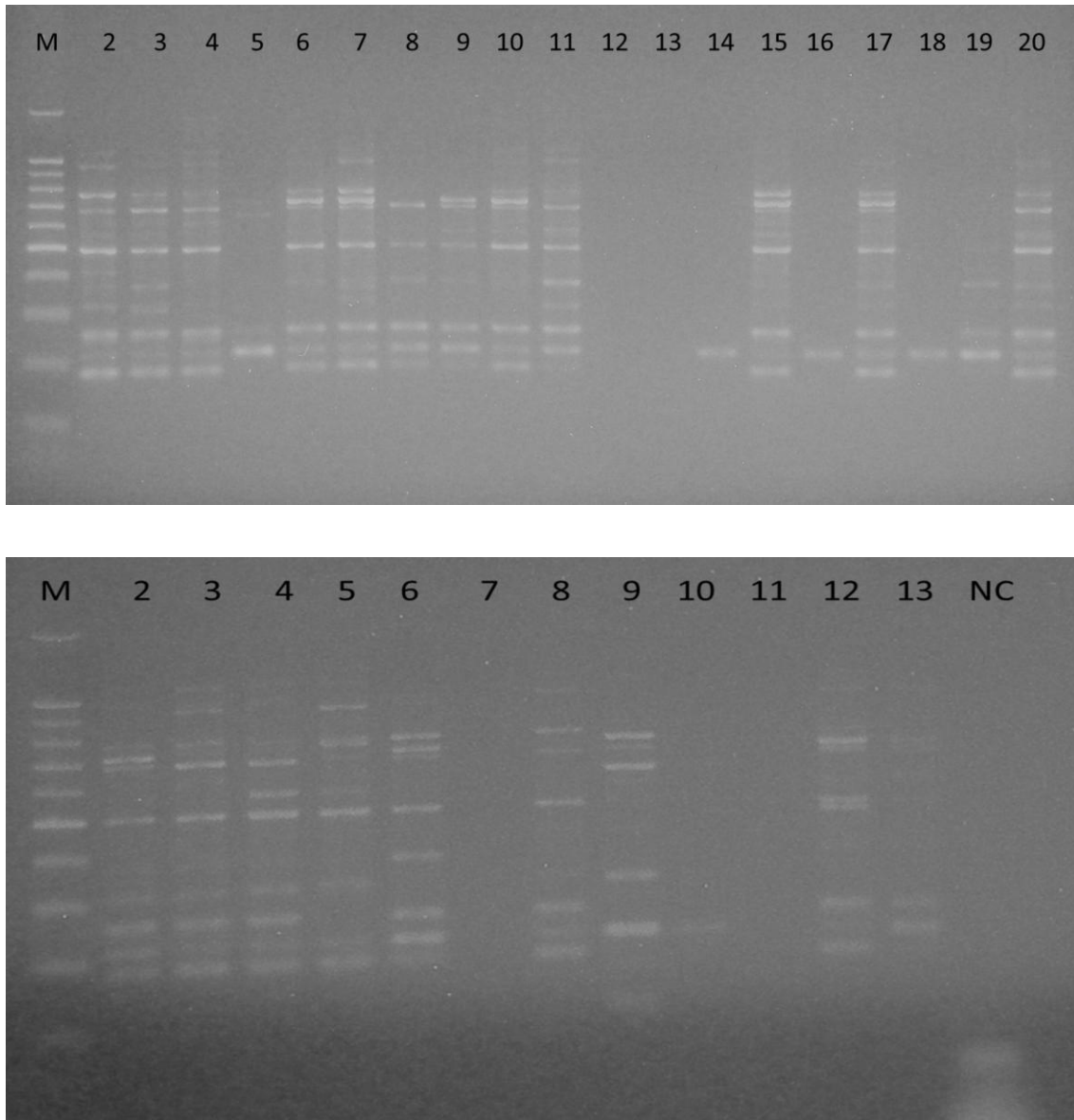


Figure 1. A) 2% agarose gel electrophoresis showing representative RAPD patterns of *H. capsulatum* strains obtained with primer 2. (M: 100 bp molecular weight marker; Lines 2-20: tested *H. capsulatum* strains; 1: CEMM-05-1-069, 2: CEMM-05-1-096, 3: CEMM-05-2-072, 4: CEMM-05-1-099, 5: CEMM-05-1-066, 6: CEMM-05-2-034, 7: CEMM-05-2-052, 8: CEMM-05-2-037, 9: CEMM-05-1-070, 10: CEMM-05-1-098, 11: CEMM-05-1-100, 12: CEMM-05-2-021, 13: CEMM-03-1-052, 14: CEMM-05-2-074, 15: CEMM-05-2-038, 16: CEMM-05-2-019, 17: CEMM-05-2-001, 18: CEMM-05-2-042, 19: CEMM-05-1-97). B) Lines 2-13: 20: CEMM-05-2-035, 21: CEMM-05-2-002, 22: CEMM-05-2-039, 23: CEMM-05-2-049, 24: CEMM-05-2-043, 25: CEMM-05-4-015, 26: CEMM-03-4-036, 27: CEMM-03-6-024, 28: CEMM-03-6-020, 29: CEMM-03-4-081, 30: CEMM-03-6-059, 31: CEMM-03-3-055, NC (Negative control).

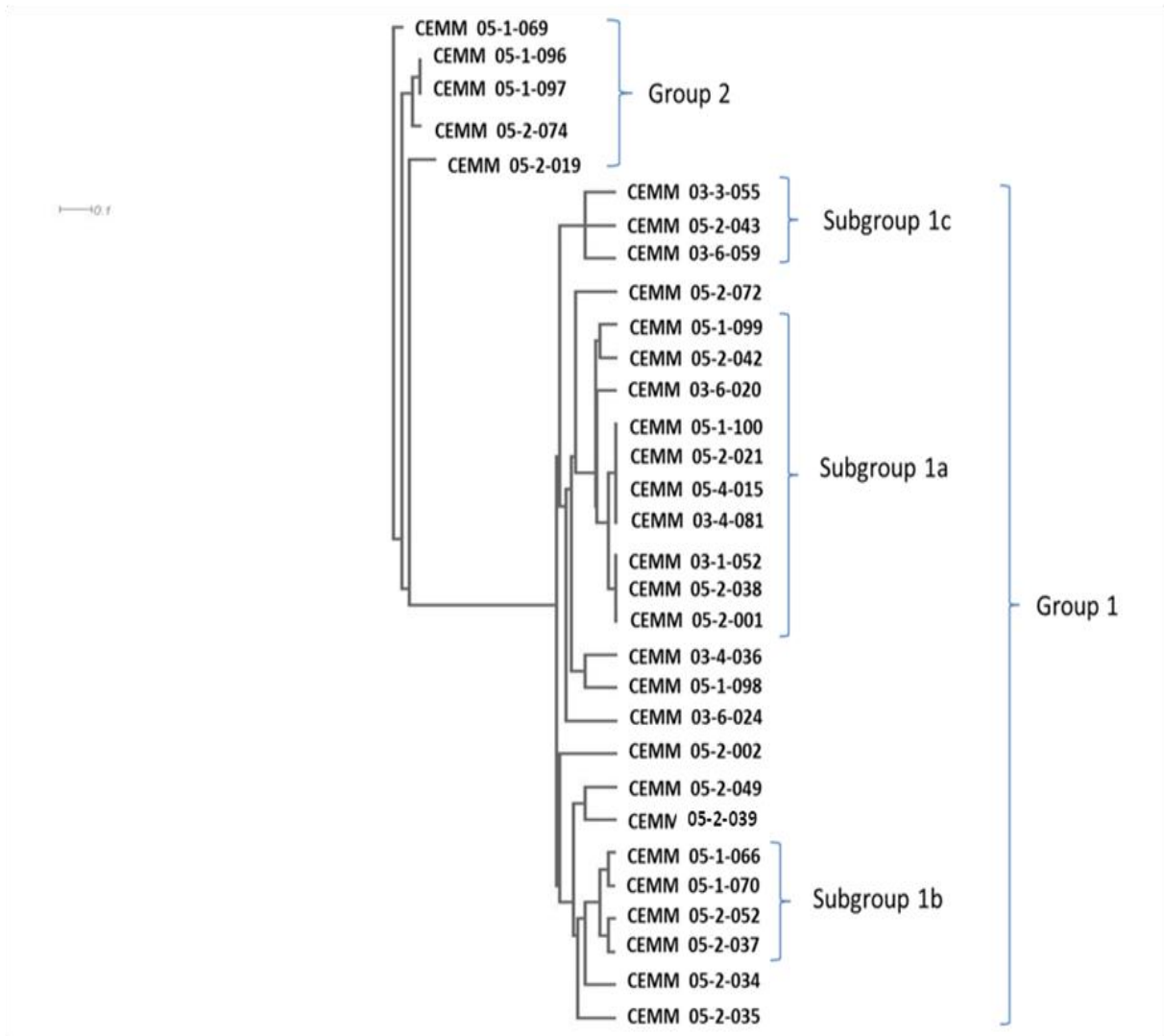


Figure 2. Dendrogram (unrooted) showing the UPGMA distances among 31 taxa using the primer 2 (5' GTTTCGCTCC3'). Uncorrected P distance was used to infer the evolutionary reconstruction with RAPD data transformed to binary characters. Star inferred with the program Splitstree 4*.

Table 1. Places of origin of the *H. capsulatum* strains whose ITS1-5.8S-ITS2 sequences were used in the study. The GenBank accession numbers of the sequences are shown.

Strains	Accession number	Local	Group Code
<i>H. capsulatum</i> CEMM 05-2-072 (1)	<u>JX051637</u>	CE- Brazil	A
<i>H. capsulatum</i> CEMM 05-2-039 (2)	<u>JX051639</u>	CE- Brazil	A
<i>H. capsulatum</i> CEMM 05-1-098 (3)	<u>JX051642</u>	CE- Brazil	A
<i>H. capsulatum</i> CEMM 05-1-096 (4)	<u>JX051643</u>	CE- Brazil	A
<i>H. capsulatum</i> CEMM 05-1-070 (5)	<u>JX051644</u>	CE- Brazil	A
<i>H. capsulatum</i> (6)	<u>GU320956.1</u>	CE- Brazil	A
<i>H. capsulatum</i> (1)	<u>AB055241.2</u>	Thailand	B
<i>H. capsulatum</i> (2)	<u>AB055238.2</u>	Thailand	B
<i>H. capsulatum</i> (1)	<u>AB055230.2</u>	United States	C
<i>H. capsulatum</i> (2)	<u>AB071821.1</u>	United States	C
<i>H. capsulatum</i> (3)	<u>AB071822.1</u>	United States	C
<i>H. capsulatum</i> (4)	<u>AB055229.2</u>	United States	C
<i>H. capsulatum</i> (3)	<u>AB055243.2</u>	Thailand	D
<i>H. capsulatum</i> (4)	<u>AB055240.2</u>	Thailand	D
<i>H. capsulatum</i> (1)	<u>AB055236.2</u>	United Kingdom	D
<i>H. capsulatum</i> (8)	<u>EU048556.1</u>	Brazil	E
<i>H. capsulatum</i> (16)	<u>GU320957.1</u>	PE- Brazil	E
<i>H. capsulatum</i> (17)	<u>GU320958.1</u>	PE- Brazil	E
<i>H. capsulatum</i> (18)	<u>GU320952.1</u>	SP- Brazil	E
<i>H. capsulatum</i> CEMM 03-4-036 (19)	<u>JX051636</u>	SP- Brazil	E
<i>H. capsulatum</i> (20)	<u>GU320984.1</u>	RJ Brazil	E
<i>H. capsulatum</i> (21)	<u>GU320983.1</u>	RJ Brazil	E
<i>H. capsulatum</i> (22)	<u>GU320939.1</u>	RJ Brazil	E
<i>H. capsulatum</i> (2)	<u>AB071843.1</u>	Australia	E
<i>H. capsulatum</i> (1)	<u>AB071840.1</u>	China	E
<i>H. capsulatum</i> (2)	<u>AB055237.2</u>	China	E
<i>H. capsulatum</i> (1)	<u>AB071827.1</u>	Equador	E
<i>H. capsulatum</i> (1)	<u>AB071824.1</u>	Colombia	E
<i>H. capsulatum</i> (2)	<u>AB071823.1</u>	Colombia	E
<i>H. capsulatum</i> (1)	<u>AB055235.2</u>	Indonesia	E
<i>H. capsulatum</i> (3)	<u>AY623792.1</u>	Japan	E
<i>H. capsulatum</i> CEMM 05-2-001 (9)	<u>JX051647</u>	CE- Brazil	E
<i>H. capsulatum</i> CEMM 05-2-049 (10)	<u>JX051635</u>	CE- Brazil	E
<i>H. capsulatum</i> CEMM 05-2-034 (11)	<u>JX051641</u>	CE- Brazil	E
<i>H. capsulatum</i> CEMM 05-2-037 (12)	<u>JX051634</u>	CE- Brazil	E
<i>H. capsulatum</i> CEMM 05-2-002 (13)	<u>JX051638</u>	CE- Brazil	E
<i>H. capsulatum</i> CEMM 03-3-055 (14)	<u>JX051648</u>	CE- Brazil	E
<i>H. capsulatum</i> CEMM 03-6-059 (15)	<u>JX051640</u>	CE- Brazil	E
<i>H. capsulatum</i> (6)	<u>AF129547.1</u>	United States	F
<i>H. capsulatum</i> (7)	<u>AF129546.1</u>	United States	F
<i>H. capsulatum</i> (9)	<u>AF129539.1</u>	United States	G
<i>H. capsulatum</i> (10)	<u>AF129538.1</u>	United States	G
<i>H. capsulatum</i> (11)	<u>AF129540.1</u>	United States	G
<i>H. capsulatum</i> (14)	<u>AB071770.1</u>	United States	H
<i>H. capsulatum</i> (15)	<u>AB055228.2</u>	United States	H

<i>H. capsulatum</i> (1)	<u>AB071832.1</u>	Argentina	I
<i>H. capsulatum</i> (2)	<u>AB055231.2</u>	Argentina	I
<i>H. capsulatum</i> (24)	<u>GU320985.1</u>	RS-Brazil	I
<i>H. capsulatum</i> (25)	<u>GU320936.1</u>	RS-Brazil	I
<i>H. capsulatum</i> (26)	<u>GU320951.1</u>	SP-Brazil	I
<i>H. capsulatum</i> (27)	<u>GU320955.1</u>	GO-Brazil	I
<i>H. capsulatum</i> (28)	<u>GU320954.1</u>	GO-Brazil	I
<i>H. capsulatum</i> (29)	<u>GU320981.1</u>	MS-Brazil	I
<i>H. capsulatum</i> (30)	<u>GU320953.1</u>	MS-Brazil	I
<i>H. capsulatum</i> (31)	<u>GU320941.1</u>	RJ-Brazil	I
<i>H. capsulatum</i> CEMM 03-6-020 (23)	<u>JX051646</u>	ES-Brazil	I
<i>H. capsulatum</i> (36)	<u>GU320938.1</u>	RS- Brazil	J
<i>H.capsulatum</i> (37)	<u>GU320937.1</u>	RS- Brazil	J
<i>H.capsulatum</i> (38)	<u>GU320986.1</u>	RS- Brazil	J
<i>H. capsulatum</i> (33)	<u>GU320950.1</u>	ES- Brazil	J
<i>H. capsulatum</i> (34)	<u>GU320948.1</u>	ES- Brazil	J
<i>H. capsulatum</i> (35)	<u>GU320949.1</u>	ES- Brazil	J
<i>H. capsulatum</i> (3)	<u>AB055232.2</u>	Colombia	J
<i>H. capsulatum</i> (40)	<u>AB055234.2</u>	Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> CEMM 05-4-015 (41)	<u>JX051645</u>	SP- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (42)	<u>GU320982.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H.capsulatum</i> (43)	<u>GU320975.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (44)	<u>GU320960.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (45)	<u>GU320946.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (46)	<u>GU320968.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (47)	<u>GU320980.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (48)	<u>GU320978.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (49)	<u>GU320943.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (50)	<u>GU320971.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (51)	<u>GU320970.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (52)	<u>GU320942.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (53)	<u>GU320963.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (54)	<u>GU320944.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (55)	<u>GU320972.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (56)	<u>GU320974.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (57)	<u>GU320962.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H.capsulatum</i> (58)	<u>GU320976.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (59)	<u>GU320961.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (60)	<u>GU320940.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (61)	<u>GU320979.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H.capsulatum</i> (62)	<u>GU320977.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (63)	<u>GU320947.1</u>	ES- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (65)	<u>GU320959.1</u>	RJ- Brazil	L
<i>H. capsulatum</i> (66)	<u>GU320966.1</u>	RJ- Brazil	L
<i>H. capsulatum</i> (67)	<u>GU320965.1</u>	RJ- Brazil	L
<i>H. capsulatum</i> (68)	<u>GU320969.1</u>	RJ- Brazil	L
<i>H. capsulatum</i> (69)	<u>GU320964.1</u>	RJ- Brazil	L
<i>H. capsulatum</i> (70)	<u>GU320967.1</u>	RJ- Brazil	L
<i>H. capsulatum</i> (1)	<u>AF458086.1</u>	Mexico	
<i>H. capsulatum</i> (1)	<u>AB071830</u>	Guatemala	
<i>H. capsulatum</i> (32)	<u>EU048555.1</u>	Brazil	

<i>H. capsulatum</i> (64)	<u>GU320974.1</u>	RJ- Brazil
<i>H. capsulatum</i> (16)	<u>AF129545.1</u>	United States
<i>H. capsulatum</i> (13)	<u>AF129544.1</u>	United States
<i>H. capsulatum</i> (5)	<u>AF129543.1</u>	United States
<i>H. capsulatum</i> (12)	<u>AF129542.1</u>	United States
<i>H.capsulatum</i> (8)	<u>AF129541.1</u>	United States
<i>H. capsulatum</i> (1)	<u>DQ980237.1</u>	Costa Rica
<i>H. capsulatum</i> (1)	<u>AB071844.1</u>	Australia
<i>H. capsulatum</i> (39)	<u>AB071826.1</u>	Brazil
<i>H. capsulatum</i> (7)	<u>AB071825.1</u>	SP- Brazil
<i>H. capsulatum</i> (1)	<u>AB055245.2</u>	Japan
<i>H. capsulatum</i> (2)	<u>AB055244.2</u>	Japan
<i>Histoplasma capsulatum</i> (5)	<u>AB055242.2</u>	Thailand
<i>Histoplasma capsulatum</i> (6)	<u>AB055239.2</u>	Thailand

4. CONCLUSÕES

1. O meio ágar Sabouraud e BHI suplementados com 10% de sangue de carneiro apresentaram maior capacidade de conversão das cepas de *H. capsulatum* em relação aos outros meios testados;
2. O gene *ryp1* pode ser utilizado para detectar e identificar isolados de *H. capsulatum*;
3. A análise da variabilidade genética dos isolados de *H. capsulatum*, pela técnica de RAPD-PCR, permitiu a detecção de dois *clusters* que circulam no Estado do Ceará;
4. A análise filogenética das regiões ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossômico nuclear revelou que as cepas da região Nordeste apresentaram diferenças genéticas quando comparadas com as cepas de outras regiões brasileiras, ficando agrupadas em um *cluster* diferente das mesmas;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDÉ, M.A. Histoplasmosis. **J. Bras. Pneumol.**, v. 35, n. 11, p. 1145-1151, 2009.

ALENCAR, K.F.; AUGUSTO BORGES, C.S.; DIOGENES, M.J.N. Reações a histoplasmina e paracoccidioidina em Aracati (Estado do Ceará, Brasil). **Med. Cutan. Ibero-Latino-Am.**, v. 20, n. 6, p. 275-278, 1992.

ALLTON, D.R.; RIVARD, R.G.; CONNOLLY, P.A.; McCALL, S.; DURKIN, M.M.; BOYD, T.M.; FLANAGAN, J.P.; WHEAT, L.J.; HOSPENTHAL, D.R. Detection of Latin American strains of *Histoplasma* in a murine model by use of a commercially available antigen test. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 17, n. 5, p. 802-806, 2010.

ALMEIDA, F.; LACAZ, C.S. Cogumelo do gênero *Histoplasma* isolado de lesões de cromomicose. Associação de fungos nas lesões. **Folia Clin. Et. Biol.** v. 9, n. 1, 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. **An. Fac. Med. Un. São Paulo**, v. 17, n.1, p. 561-577, 1941.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, n.3, p. 403-10, 1990.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.R.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.J.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **In Short Protocols in Molecular Biology**: a compendium of methods from current protocols in molecular biology, Vol. 1, Wiley, New York, 2002.

BIALEK, R.; FEUCHT, A.; AEPINUS, C.; JUST-NUBLING, G.; ROBERTSON, V.J.; KNOBLOCH, J.; HOHLE, R. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 5, p. 1644-1647, 2002.

BOHSE, M.L.; WOODS, J.P. Expression and interstrain variability of the *YPS3* gene of *Histoplasma capsulatum*. **Eukaryot. Cell.**, v. 6, n. 4, p. 609-615, 2007.

BORKOVICH, K.A.; FARRELLY, F.W.; FINKELSTEIN, D.B.; TAULIEN, J.; LINDQUIST, S. Hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. **Mol. Cell. Biol.**, v. 9, n. 9, p. 3919-3930, 1989.

BRILHANTE, R.S.; FECHINE, M.A.; MESQUITA, J.R.L.; CORDEIRO, R.D.; ROCHA, M.F.; MONTEIRO, A.J.; DE LIMA, R.A.; CAETANO, E.P.; PEREIRA, J.F.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; DE 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. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 106, n. 8, p. 484-488, 2012.

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

CASTELUCCI, S.; DE PAULA, ROGERIO, A.; AMBROSIO, S.R.; ARAKAWA, N.S.; DE LIRA, S.P.; FACCIOLI, L.H.; DA COSTA, F.B. Anti-inflammatory activity of *Dasyphyllum brasiliensis* (Asteraceae) on acute peritonitis by beta-glucan from *Histoplasma capsulatum*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 112, n. 1, p. 192-198, 2007.

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

CHRISTIE, A.; PETERSON, J.C. Pulmonary calcifications in negative reactors to tuberculin. **Am. J. Publ. Hlth.**, v. 35, n. 11, p. 1131-1147, 1945.

COÊLHO, I.C.B.; GADELHA, J.B.; CÂMARA, L.M.C. Estudo sobre a paracoccidiodomicose no Estado do Ceará: análise preliminar da paracoccidiodomicose-infecção, utilizando reações intradérmicas com paracoccidiodina e histoplasmina. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 19, n. 1, p. 97-98, 1986.

COUPPIÉ, P.; AZNAR, C.; CARME, B.; NACHER, M. American histoplasmosis in developing countries with a special focus on patients with HIV: diagnosis, treatment, and prognosis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 19, n. 5, p. 443-449, 2006.

DAHER, E.F.; BARROS, F.A.S.; DA SILVA JÚNIOR, G.B.; TAKEDA, C.F.V.; MOTA, R.M.S.; FERREIRA, M.T.; MARTINS, J.C.; OLIVEIRA, S.A.J.; GUTIÉRREZ-ADRIANZÉN, O.A. Risk factors for death in acquired immunodeficiency syndrome-associated disseminated histoplasmosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 74, n. 4, p. 600-603, 2006.

DAHER, E.F.; SILVA, G.B. Jr.; BARROS, F.A.S.; TAKEDA, C.F.V.; MOTA, R.M.S.; FERREIRA, M.T.; OLIVEIRA, S.A.; MARTINS, J.C.; ARAÚJO, S.M.H.A.; GUTIÉRREZ-ADRIANZZÉN, O.A. Clinical and laboratory features of disseminated

histoplasmosis in HIV patients from Brazil. **Trop. Med. Int. Health.**, v. 12, n. 9, p. 1108-1115, 2007.

DARLING, S. T. A protozoan general infection producing pseudotuberculosis in the lungs and focal necrosis in the liver, spleen and lymphnodes. **J.A.M.A.**, v. 46, n.1, 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. **J.E.M.**, v. 11, n. 4, p. 515-531, 1909.

DEEPE, G.S. Jr.; SEDER, R.A. Molecular and cellular determinants of immunity to *Histoplasma capsulatum*. **Res. Immunol.**, v. 149, n. 4, p. 397-406, 1998.

DeMONBREUM, W.A. The Cultivation and cultural characteristics of Darling's *Histoplasma capsulatum*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 14, n. 2, p. 93-125, 1934.

DEUS FILHO, A.; BODO, W.; CAVALCANTI, S.; AMPARO, M.; SOARES MARTINS, L.M.; CASTELO BRANCO, A.D. Histoplasmosose no Nordeste do Brasil. Relato de três casos. **Rev. Port. Pneumol.**, v. 15, n. 1, 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 (Ceará State-Brazil). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 32, n. 2, p. 116-120, 1990.

DURKIN, M.M.; CONNOLLY, P.A.; KARIMI, K.; WHEAT, E.; SCHNIZLEIN-BICK, C.; ALLEN, S.D.; ALVES, K.; TEWARI, R.P.; KEATH, E. Pathogenic differences between North American and Latin American strains of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in experimentally infected mice. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 9, p. 4370-4373, 2004.

EDWARDS, J.A.; ZEMSKA, O.; RAPPLEYE, C.A. Discovery of a role for Hsp82 in *Histoplasma* virulence through a quantitative screen for macrophage lethality. **Infect. Immun.**, v. 9, n. 8, p. 3348-3357, 2011.

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

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p.186-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 175-85, 1998.

FERREIRA, E.F.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa, 3ª edição, 1995.

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

GUEDES, H.L.; GUIMARÃES, A.J.; MUNIZ, M.M.; PIZZINI, C.V.; HAMILTON, A.J.; PERALTA, J.M.; DEEPE, G.S. Jr.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M. PCR assay for identification of *Histoplasma capsulatum* based on the nucleotide sequence of the M antigen. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 2, p. 535-539, 2003.

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

HALL, T. A. Bioedit: a user-friendly biological alignment editor and analysis program for Windows 95/98NT. **Nucleic Acids Symposium**. v. 41, p. 95-98, 1999.

HENINGER, E.; HOGAN, L.H.; KARMAN, J.; MACVILAY, S.; HILL, B.; WOODS, J.P.; SANDOR, M. Characterization of the *Histoplasma capsulatum*-induced granuloma. **J. Immunol.**, v. 177, n. 5, p. 3303-3313, 2006.

HILTY, J., GEORGE SMULIAN, A., NEWMAN, S.L. *Histoplasma capsulatum* utilizes siderophores for intracellular iron acquisition in macrophages. **Med. Mycol.**, v. 49, n. 6, p. 633-642, 2011.

HOLBROOK, E.D.; RAPPLEYE, C.A. *Histoplasma capsulatum* pathogenesis: making a lifestyle switch. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 11, n. 4, p. 318-324, 2008.

JIANG, B.; BARTLETT, M.S.; ALLEN, S.D.; SMITH, J.W.; WHEAT, L.J.; CONNOLLY, P.A.; LEE, C.H. Typing of *Histoplasma capsulatum* isolates based on nucleotide sequence variation in the internal transcribed spacer regions of rRNA genes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 1, p. 241-245, 2000.

JÜLG, B.; ELIAS, J.; ZAHN, A.; KÖPPEN, S.; BECKER-GAAB, C.; BOGNER, J.R. Bat-associated histoplasmosis can be transmitted at entrances of bat caves and not only inside the caves. **J. Travel. Med.**, v. 15, n. 2, p. 133-136, 2008.

KASUGA, T.; WHITE, T.J.; KOENIG, G.; MCEWEN, J.; RESTREPO, A.; CASTAÑEDA, E.; DA SILVA LACAZ, C.; HEINS-VACCARI, E.M.; DE FREITAS, R.S.; ZANCOPE-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*. **Mol. Ecol.**, v. 12, n. 12, p. 3383-3401, 2003.

KAUFFMAN, C.A. Histoplasmosis. **Clin. Chest. Med.**, v. 30, n. 2, p. 217-225, 2009.

KAUFFMAN, C.A. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 20, n. 1, p. 115-132, 2007.

KEATH, E.J.; KOBAYASHI, G.S.; MEDOFF, G. Typing of *Histoplasma capsulatum* by restriction fragment length polymorphisms in a nuclear gene. **Clin. Microbiol.**, v. 30, n. 8, p. 2104-2107, 1992.

KLEIN, B.S.; TEBBETS, B. Dimorphism and virulence in fungi. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 10, n. 4, p. 314-319, 2007

KUROKAWA, C.S.; SUGIZAKI, M.F.; PERAÇOLI, M.T.S. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 40, n. 3, p. 125-135, 1998.

LACAZ, CS; PORTO, E; MARTINS, JEC; HEINS-VACCARI, EM; MELO, NT. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. São Paulo: Sarvier, 9a edição, 2002.

LACERDA, D.R.; ACEDO, M.D.P.; LEMOS FILHO, J.P.; LOVATO, M.B. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. **Lundiana**, v. 3, n. 2, p. 87-92, 2002.

LEIMANN, B.C.; PIZZINI, C.V.; MUNIZ, M.M.; ALBUQUERQUE, P.C.; MONTEIRO, P.C.; REIS, R.S.; ALMEIDA-PAES, R.; LAZERA, M.S.; WANKE, B.; PÉREZ, M.A.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M. Histoplasmosis in a Brazilian center: clinical forms and laboratory tests. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 22, n. 3, p. 141-146, 2005.

LÓPEZ, C.E. Dimorphism and pathogenesis of *Histoplasma capsulatum*. **Rev. Argent. Microbiol.**, v. 38, n. 4, p. 235-242, 2006.

MAUBON, D.; SIMON, S.; AZNAR, C. Histoplasmosis diagnosis using a polymerase chain reaction method. Application on human samples in French Guiana, South America. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 58, n. 4, p. 441-444, 2007.

MEDOFF, G.; MARESCA, B.; LAMBOWITZ, A.M.; KOBAYASHI, G.; PAINTER, A.; SACCO, M.; CARRATU, L. Correlation between pathogenicity and temperature sensitivity in different strains of *Histoplasma capsulatum*. **J. Clin. Invest.**, v. 78, n. 6, p. 1638-1647, 1986.

MIHU, M.R.; NOSANCHUK, J.D. *Histoplasma* virulence and host responses. **Int. J. Microbiol.**, v.1, n. 1, p. 1-5, 2012.

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

MUNIZ, M.M.; MORAIS, E.S.T.P.; MEYER, W.; NOSANCHUK, J.D.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M. Comparison of different DNA-based methods for molecular typing of *Histoplasma capsulatum*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, n. 13, p. 4438-4447, 2010.

MUNÕZ, C.; GÓMEZ, B.L.; TOBÓN, A.; ARANGO, K.; RESTREPO, A.; CORREA, M.M.; MUSKUS, C.; CANO, L.E.; GONZÁLEZ, A. Validation and clinical application of a molecular method for identification of *Histoplasma capsulatum* in human specimens in Colombia, South America. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 17, n. 1, p. 62-67, 2010.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M.A. *Microbiologia Médica*. Rio de Janeiro, 5ª edição, 2006.

NEWMAN, S.L. Macrophages in host defense against *Histoplasma capsulatum*. **Trends. Microbiol.**, v. 7, n. 2, p. 67-71, 1999.

NGUYEN, V.Q.; SIL, A. Temperature-induced switch to the pathogenic yeast form of *Histoplasma capsulatum* requires *ryp1*, a conserved transcriptional regulator. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 105, n. 12, p. 4880-4885, 2008.

NORMAN, F.F.; MARTÍN-DÁVILA, P.; FORTÚN, J.; DRONDA, F.; QUEREDA, C.; SÁNCHEZ-SOUSA, A.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Imported histoplasmosis: two distinct profiles in travelers and immigrants. **J. Travel. Med.**, v. 16, n. 4, p. 258-262, 2009.

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

RAPPLEYE, C.A.; EISSENBERG, L.G.; GOLDMAN, W.E. *Histoplasma capsulatum* alpha-(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the beta-glucan receptor. **Proc. Nat.l Acad. Sci. USA.**, v. 104, n. 4, p. 1366-1370, 2007.

ROSSINI, F.T.; GOULART, L.S. Classic histoplasmosis: Review. **RBAC.**, v. 38, n. 4, p. 275-279, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

SEIDER, K.; HEYKEN, A.; LUTTICH, A.; MIRAMÓN, P.; HUBE, B. Interaction of pathogenic yeasts with phagocytes: survival, persistence and escape. **Curr Opin Microbiol.**, v. 13, n. 4, p. 392-400, 2010.

SIMON, S.; VERON, V.; BOUKHARI, R.; BLANCHET, D.; AZNAR, C. Detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human samples by real-time polymerase chain reaction. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 66, n. 3, p. 268-273, 2010.

SUARÉZ-ALVAREZ, R.O., PÉREZ-TORRES, A., TAYLOR, M.L. Adherence patterns of *Histoplasma capsulatum* yeasts to bat tissue sections. **Mycopathologia.**, v. 170, n.2, p. 79-87, 2010.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n .8, p. 1596-99, 2007.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 24, p.4876-4882, 1997.

UNIS, G.; ROESCH, E.W.; SEVERO, L.C. Acute pulmonary histoplasmosis in the state of Rio Grande do Sul, **Brazil. J. Bras. Pneumol.**, v. 31, n. 1, p. 52-59, 2005.

Van DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J.D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 46, n. 11, p. 3394-3400, 2002.

VILLELA, E.; PARA, M.. Histoplasmosose em criança no Estado de Minas Gerais. **Rev. Brasil Biol.**, v.1, p. 449-456, 1941.

VINCENT, R.D.; GOEWERT, R.; GOLDMAN, W.E.; KOBAYASHI, G.S.; LAMBOWITZ, A.M; MEDOFF, G. Classification of *Histoplasma capsulatum* isolates by restriction fragment polymorphisms. **J. Bacteriol.**, v. 165, n. 3, p. 813-818, 1986.

WANKE, B; LAZÉRA, M. Histoplasmosose clássica e africana. In: SIDRIM, JJC; ROCHA, MFG. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, p. 222-251, 2004.

WHEAT, J.; SAROSI, G.; MCKINSEY, D.; HAMILL, R.; BRADSHER, R.; JOHNSON, P.; LOYD, J.; KAUFFMAN, C. Practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis: Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, n.4, p. 688-695, 2000.

WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

WOODS, J.P. *Histoplasma capsulatum* molecular genetics, pathogenesis, and responsiveness to its environment. **Fungal Genet. Biol.**, v. 35, n. 2, p. 81-97, 2002.

WOODS, J.P. Knocking on the right door and making a comfortable home: *Histoplasma capsulatum* intracellular pathogenesis. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 6, n. 4, p. 327-331, 2003.

ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; MORAIS E SILVA; TAVARES, P.; MUNIZ, M.M. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains in Brazil. **FEMS. Immunol. Med. Microbiol.**, v. 45, n. 3, p. 443-449, 2005.

ZEIDBERG, L.D.; AJELLO, L.; DILLON, A.; RUNYON, L.C. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil. **Am. J. Public Health Nations Health**, v. 42, n. 8, p. 930-935, 1952.

APÊNDICES

APÊNDICE I

Tabela 2. Procedência dos 18 isolados clínicos de origem veterinária e humana de *Histoplasma capsulatum* incluídos no estudo (Etapa 1).

Isolados	Material	Data	Localidade
CEMM-05-2-002	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM-05-2-038	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM-05-1-096	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM-05-2-003	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM-05-2-001	Aspirado medular	2009	Ceará
CEMM-05-1-098	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM-05-1-097	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM-05-1-099	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM-05-1-100	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM-05-2-021	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM-05-2-019	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM-05-2-042	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM-05-2-035	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM-05-2-037	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM-05-2-034	Aspirado medular	2009	Ceará
CEMM-03-4-036	Biópsia (duodeno)	2007	São Paulo
CEMM-03-6-059	Biópsia (mucosa nasal) - gato	2008	Ceará
CEMM-03-3-055	Biópsia (mucosa nasal) - gato	2008	Ceará

Tabela 3. Procedência dos 31 isolados clínicos de origem veterinária e humana de *Histoplasma capsulatum* incluídos no estudo (Etapa 2).

Isolados	Material	Data	Localidade
CEMM-05-2-002	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM-05-2-038	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM-05-1-069	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM-05-1-096	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM-05-2-003	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM-05-2-001	Aspirado medular	2009	Ceará
CEMM-05-1-098	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM-05-1-097	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM-05-1-099	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM-05-1-100	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM-05-2-021	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM-05-2-019	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM-05-2-052	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM-05-2-042	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM-05-2-035	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM-05-2-037	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM-05-2-034	Aspirado medular	2009	Ceará
CEMM-05-2-049	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM-05-1-070	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM-03-1-052	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM-05-2-043	Aspirado medular	2009	Ceará
CEMM-05-2-072	Creme leucocitário	2010	Ceará
CEMM-05-1-066	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM-05-2-074	Creme leucocitário	2010	Ceará
CEMM-03-4-015	Biópsia	2007	São Paulo
CEMM-03-4-081	Biópsia	2007	São Paulo
CEMM-03-6-024	Biópsia (palato)	2007	São Paulo
CEMM-03-6-020	Aspirado medular	2008	Espírito Santo
CEMM-03-4-036	Biópsia (duodeno)	2007	São Paulo
CEMM-03-6-059	Biópsia (mucosa nasal) - gato	2008	Ceará
CEMM-03-3-055	Biópsia (mucosa nasal) - gato	2008	Ceará

APÊNDICE II

Lugar de origem das cepas de *H. capsulatum*, cujas sequências ITS1-5.8S-ITS2 foram utilizadas no estudo, bem como o número de acesso das sequências no Genbank.

Strains	Accession number	Local	Group Code
<i>H. capsulatum</i> CEMM 05-2-072 (1)	<u>JX051637</u>	CE- Brazil	A
<i>H. capsulatum</i> CEMM 05-2-039 (2)	<u>JX051639</u>	CE- Brazil	A
<i>H. capsulatum</i> CEMM 05-1-098 (3)	<u>JX051642</u>	CE- Brazil	A
<i>H. capsulatum</i> CEMM 05-1-096 (4)	<u>JX051643</u>	CE- Brazil	A
<i>H. capsulatum</i> CEMM 05-1-070 (5)	<u>JX051644</u>	CE- Brazil	A
<i>H. capsulatum</i> (6)	<u>GU320956.1</u>	CE- Brazil	A
<i>H. capsulatum</i> (1)	<u>AB055241.2</u>	Thailand	B
<i>H. capsulatum</i> (2)	<u>AB055238.2</u>	Thailand	B
<i>H. capsulatum</i> (1)	<u>AB055230.2</u>	United States	C
<i>H. capsulatum</i> (2)	<u>AB071821.1</u>	United States	C
<i>H. capsulatum</i> (3)	<u>AB071822.1</u>	United States	C
<i>H. capsulatum</i> (4)	<u>AB055229.2</u>	United States	C
<i>H. capsulatum</i> (3)	<u>AB055243.2</u>	Thailand	D
<i>H. capsulatum</i> (4)	<u>AB055240.2</u>	Thailand	D
<i>H. capsulatum</i> (1)	<u>AB055236.2</u>	United Kingdom	D
<i>H. capsulatum</i> (8)	<u>EU048556.1</u>	Brazil	E
<i>H. capsulatum</i> (16)	<u>GU320957.1</u>	PE- Brazil	E
<i>H. capsulatum</i> (17)	<u>GU320958.1</u>	PE- Brazil	E
<i>H. capsulatum</i> (18)	<u>GU320952.1</u>	SP- Brazil	E
<i>H. capsulatum</i> CEMM 03-4-036 (19)	<u>JX051636</u>	SP- Brazil	E
<i>H. capsulatum</i> (20)	<u>GU320984.1</u>	RJ Brazil	E
<i>H. capsulatum</i> (21)	<u>GU320983.1</u>	RJ Brazil	E
<i>H. capsulatum</i> (22)	<u>GU320939.1</u>	RJ Brazil	E
<i>H. capsulatum</i> (2)	<u>AB071843.1</u>	Australia	E
<i>H. capsulatum</i> (1)	<u>AB071840.1</u>	China	E
<i>H. capsulatum</i> (2)	<u>AB055237.2</u>	China	E
<i>H. capsulatum</i> (1)	<u>AB071827.1</u>	Equador	E
<i>H. capsulatum</i> (1)	<u>AB071824.1</u>	Colombia	E
<i>H. capsulatum</i> (2)	<u>AB071823.1</u>	Colombia	E
<i>H. capsulatum</i> (1)	<u>AB055235.2</u>	Indonesia	E
<i>H. capsulatum</i> (3)	<u>AY623792.1</u>	Japan	E
<i>H. capsulatum</i> CEMM 05-2-001 (9)	<u>JX051647</u>	CE- Brazil	E
<i>H. capsulatum</i> CEMM 05-2-049 (10)	<u>JX051635</u>	CE- Brazil	E
<i>H. capsulatum</i> CEMM 05-2-034 (11)	<u>JX051641</u>	CE- Brazil	E
<i>H. capsulatum</i> CEMM 05-2-037 (12)	<u>JX051634</u>	CE- Brazil	E
<i>H. capsulatum</i> CEMM 05-2-002 (13)	<u>JX051638</u>	CE- Brazil	E
<i>H. capsulatum</i> CEMM 03-3-055 (14)	<u>JX051648</u>	CE- Brazil	E
<i>H. capsulatum</i> CEMM 03-6-059 (15)	<u>JX051640</u>	CE- Brazil	E
<i>H. capsulatum</i> (6)	<u>AF129547.1</u>	United States	F
<i>H. capsulatum</i> (7)	<u>AF129546.1</u>	United States	F
<i>H. capsulatum</i> (9)	<u>AF129539.1</u>	United States	G
<i>H. capsulatum</i> (10)	<u>AF129538.1</u>	United States	G

<i>H. capsulatum</i> (11)	<u>AF129540.1</u>	United States	G
<i>H.capsulatum</i> (14)	<u>AB071770.1</u>	United States	H
<i>H. capsulatum</i> (15)	<u>AB055228.2</u>	United States	H
<i>H. capsulatum</i> (1)	<u>AB071832.1</u>	Argentina	I
<i>H. capsulatum</i> (2)	<u>AB055231.2</u>	Argentina	I
<i>H. capsulatum</i> (24)	<u>GU320985.1</u>	RS-Brazil	I
<i>H. capsulatum</i> (25)	<u>GU320936.1</u>	RS-Brazil	I
<i>H. capsulatum</i> (26)	<u>GU320951.1</u>	SP-Brazil	I
<i>H. capsulatum</i> (27)	<u>GU320955.1</u>	GO-Brazil	I
<i>H. capsulatum</i> (28)	<u>GU320954.1</u>	GO-Brazil	I
<i>H. capsulatum</i> (29)	<u>GU320981.1</u>	MS-Brazil	I
<i>H. capsulatum</i> (30)	<u>GU320953.1</u>	MS-Brazil	I
<i>H.capsulatum</i> (31)	<u>GU320941.1</u>	RJ-Brazil	I
<i>H. capsulatum</i> CEMM 03-6-020 (23)	<u>JX051646</u>	ES-Brazil	I
<i>H. capsulatum</i> (36)	<u>GU320938.1</u>	RS- Brazil	J
<i>H.capsulatum</i> (37)	<u>GU320937.1</u>	RS- Brazil	J
<i>H.capsulatum</i> (38)	<u>GU320986.1</u>	RS- Brazil	J
<i>H. capsulatum</i> (33)	<u>GU320950.1</u>	ES- Brazil	J
<i>H. capsulatum</i> (34)	<u>GU320948.1</u>	ES- Brazil	J
<i>H. capsulatum</i> (35)	<u>GU320949.1</u>	ES- Brazil	J
<i>H. capsulatum</i> (3)	<u>AB055232.2</u>	Colombia	J
<i>H. capsulatum</i> (40)	<u>AB055234.2</u>	Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> CEMM 05-4-015 (41)	<u>JX051645</u>	SP- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (42)	<u>GU320982.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H.capsulatum</i> (43)	<u>GU320975.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (44)	<u>GU320960.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (45)	<u>GU320946.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (46)	<u>GU320968.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (47)	<u>GU320980.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (48)	<u>GU320978.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (49)	<u>GU320943.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (50)	<u>GU320971.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (51)	<u>GU320970.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (52)	<u>GU320942.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (53)	<u>GU320963.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (54)	<u>GU320944.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (55)	<u>GU320972.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (56)	<u>GU320974.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (57)	<u>GU320962.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H.capsulatum</i> (58)	<u>GU320976.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (59)	<u>GU320961.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (60)	<u>GU320940.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (61)	<u>GU320979.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H.capsulatum</i> (62)	<u>GU320977.1</u>	RJ- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (63)	<u>GU320947.1</u>	ES- Brazil	K
<i>H. capsulatum</i> (65)	<u>GU320959.1</u>	RJ- Brazil	L
<i>H. capsulatum</i> (66)	<u>GU320966.1</u>	RJ- Brazil	L
<i>H. capsulatum</i> (67)	<u>GU320965.1</u>	RJ- Brazil	L
<i>H. capsulatum</i> (68)	<u>GU320969.1</u>	RJ- Brazil	L
<i>H. capsulatum</i> (69)	<u>GU320964.1</u>	RJ- Brazil	L
<i>H. capsulatum</i> (70)	<u>GU320967.1</u>	RJ- Brazil	L

<i>H. capsulatum</i> (1)	<u>AF458086.1</u>	Mexico
<i>H. capsulatum</i> (1)	<u>AB071830</u>	Guatemala
<i>H. capsulatum</i> (32)	<u>EU048555.1</u>	Brazil
<i>H. capsulatum</i> (64)	<u>GU320974.1</u>	RJ- Brazil
<i>H. capsulatum</i> (16)	<u>AF129545.1</u>	United States
<i>H. capsulatum</i> (13)	<u>AF129544.1</u>	United States
<i>H. capsulatum</i> (5)	<u>AF129543.1</u>	United States
<i>H. capsulatum</i> (12)	<u>AF129542.1</u>	United States
<i>H. capsulatum</i> (8)	<u>AF129541.1</u>	United States
<i>H. capsulatum</i> (1)	<u>DQ980237.1</u>	Costa Rica
<i>H. capsulatum</i> (1)	<u>AB071844.1</u>	Australia
<i>H. capsulatum</i> (39)	<u>AB071826.1</u>	Brazil
<i>H. capsulatum</i> (7)	<u>AB071825.1</u>	SP- Brazil
<i>H. capsulatum</i> (1)	<u>AB055245.2</u>	Japan
<i>H. capsulatum</i> (2)	<u>AB055244.2</u>	Japan
<i>Histoplasma capsulatum</i> (5)	<u>AB055242.2</u>	Thailand
<i>Histoplasma capsulatum</i> (6)	<u>AB055239.2</u>	Thailand

APÊNDICE III

MATERIAIS E MÉTODOS

Etapa 1 - Reversão das cepas de *H. capsulatum* da forma filamentosa para a forma leveduriforme.

Microorganismos

Para a realização da primeira etapa deste estudo, foram utilizadas 18 cepas clínicas de *H. capsulatum*, sendo 16 cepas de pacientes HIV positivos com histoplasmose e duas cepas obtidas de gatos com histoplasmose. Essas cepas pertencem à Micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará e encontravam-se estocadas em salina fisiológica à temperatura ambiente a (25-28°C) ou a -20°C em congeladores. A origem de cada isolado de *H. capsulatum* incluído neste estudo encontra-se descrita na Tabela 2 (Apêndice I). 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).

Caracterização macro e micromorfológica das cepas

As cepas em estoque foram recuperadas mediante semeadura em ágar batata dextrose (Difco, Detroit, EUA) e ágar infusão de cérebro-coração – BHI (Himedia, Índia), as quais foram submetidas à análise macroscópica, levando-se em consideração relevo, textura e pigmentação das colônias após 7-10 dias de incubação a 25-28°C. A análise micromorfológica foi realizada através da observação, em microscópio óptico, de fragmentos das colônias com no mínimo 7 dias de incubação, montados entre lâmina e lamínula com lactofenol-azul-algodão. A identidade das culturas foi confirmada pela presença de hifas hialinas finas e macroconídios tuberculados.

Meios de cultura e condições de crescimento

Todas as amostras foram inoculadas em seis meios de cultura diferentes: 1) ágar Sabouraud suplementado com 5% de sangue de carneiro, 2) ágar Sabouraud

suplementado com 10% de sangue de carneiro, 3) ágar BHI suplementado com 5% de sangue de carneiro, 4) ágar BHI suplementado com 10% de sangue de carneiro, 5) ágar Sabouraud suplementado com 1% de glicose, 6) ágar BHI suplementado com 1% de glicose. Posteriormente, os tubos foram incubados a uma temperatura de 35°C e o subcultivo foi realizado semanalmente. O procedimento foi mantido por dois meses (Lottenberg et al., 1979). Lâminas do material cultivado foram preparadas semanalmente, coradas com lactofenol azul de algodão e foram examinadas através de microscópio óptico para verificar a presença de células leveduriformes. A conversão parcial foi considerada quando apesar da observação de pelo menos 30 células leveduriformes por campo com uma objetiva de 40X, formas micelianas ainda foram observadas. A conversão completa das cepas foi considerada quando todas as células examinadas na lâmina eram células leveduriformes.

Análise estatística

Para a análise da taxa de conversão nos meios testados, foi utilizado o teste não paramétrico de *Wilcoxon Signed Ranks Test*, adotado os valores de 0 (zero) para a ausência de conversão; 1 para a conversão parcial e 2 para a conversão total. O nível de significância mínimo adotado para resultados conclusivos foi de 5%.

Etapa 2 - Detecção do gene *ryp1* por PCR específica

Para a detecção do gene *ryp1*, foram utilizadas 18 cepas clínicas de *H. capsulatum*, três espécimes clínicos (sangue total), bem como, duas cepas de *Paracoccidioides brasiliensis*, uma cepa de *Candida albicans*, uma cepa de *Sporothrix schenckii* e uma cepa de *Coccidioides posadasii*. A detecção do gene *ryp1* foi realizada através da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando os *primers* OAS1057 (5' ACCCTTGCAGCTTACAACCT 3') e OAS1058 (5' TCCGTCCATCGCTTAATACC 3'), conforme descrito por Nguyen, Sil, 2008. Estes *primers* de 20 bases nucleotídicas amplificam um fragmento de aproximadamente 300pb (NGUYEN, SIL, 2008).

A reação de PCR para detecção do gene *ryp1* nas 18 cepas clínicas de *H. capsulatum*, bem como nas cepas de *P. brasiliensis*, *C. posadasii*, *S. schenckii* e *C. albicans* foi realizada utilizando amostras de DNA na concentração de 100 ng/μL. Para a detecção do gene *ryp1* diretamente dos três espécimes clínicos, três concentrações

diferentes de DNA foram testadas (5, 10 e 25 ng/ μ L). Um volume de 2 μ L de cada amostra de DNA, em diferentes concentrações, foram adicionadas ao mix de 8 μ L contendo: tampão de reação 1X (Promega, USA), 1 mM de MgCl₂ (Promega, USA), 2 pmol de cada OAS1057 e OAS1058 (Invitrogen, USA), 0.5mM de cada desoxirribonucleotídeo (Thermo Scinetific) e 1U/ μ L de Go Taq Hot Start polymerase (Promega, USA), resultando assim, um volume final de 10 μ L.

A amplificação do DNA foi realizada em termociclador *Mastercycler* (Eppendorf, USA). Primeiramente, seguiu-se a etapa de desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguido por: 10 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 58°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto; 10 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto; 15 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 53°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Por fim, um ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos. A visualização dos produtos amplificados foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídio, seguida de exposição à luz UV por meio de um transluminador. A corrida foi realizada em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X a 100 V por 50 minutos.

Etapa 3 – Caracterização molecular de cepas clínicas de *H. capsulatum*

Microrganismos

Nesta terceira etapa do estudo, foram utilizados 31 isolados de *H. capsulatum*, das quais 26 cepas são oriundas da região Nordeste, sendo 24 isolados de pacientes HIV positivos com histoplasmose e duas de origem animal, e cinco cepas oriundas da região Sudeste do Brasil. As cepas da região Sudeste foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo da UNIFESP. Essas cepas pertencem à Micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará e encontravam-se estocadas em salina fisiológica à temperatura ambiente a 28°C ou a -20°C em congeladores. A origem de cada isolado de *H. capsulatum* incluído neste estudo está descrita na Tabela 3 (Apêndice I).

Extração de DNA genômico

Os 31 isolados de *H. capsulatum* foram submetidos à extração do DNA genômico na fase leveduriforme, crescidos por cinco dias a 35°C em meio Agar Sabouraud suplementado com 10% de sangue de carneiro (BRILHANTE et al., 2010). A extração de DNA foi realizada conforme descrito por Ausubel et al., (2002). Assim, o DNA genômico foi extraído através de lise mecânica com esferas de vidro e lise química com tampão *breaking buffer*. Os ácidos nucleicos foram precipitados com etanol absoluto após exposição a uma solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico para separação dos debris celulares. O pellet de DNA foi, então, ressuspendido em tampão TE e estocado a 4°C. A quantificação do DNA foi realizada por espectrofotometria e a visualização de sua integridade foi realizada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. O protocolo para extração de DNA genômico de *H. capsulatum* encontra-se descrito no Anexo II.

Técnica de RAPD-PCR

O polimorfismo genético dos isolados de *H. capsulatum* foi avaliado por meio da técnica de RAPD-PCR. As reações de RAPD-PCR foram realizadas utilizando quatro *primers* diferentes contendo 10 nucleotídeos. As sequências dos *primers* utilizados são mostradas na Tabela 4 (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2005).

Tabela 4. Sequências dos *primers* de 10 nucleotídeos, utilizados na técnica de RAPD-PCR

<i>Primers</i>	Sequências (5' → 3')
<i>Primer 2</i>	5' GTTTCGCTCC3'
<i>Primer 3</i>	5'GTAGACCCGT3'
<i>Primer 4</i>	5' AAGAGCCCGT3'
<i>Primer 5</i>	5'AACGCGCAAC3'

A reação de RAPD-PCR foi realizada em um volume total de 10µL contendo 2µL de amostra de DNA (na concentração 100 ng/µL), tampão de reação 1X (Promega, USA), 1mM de MgCl₂ (Promega, USA), 2 pmol de *primer* (Invitrogen, USA), 0.5mM de cada desoxirribonucleotídeo (Thermo Scinetific) e 1U/µL de Go Taq Hot Start polymerase (Promega, USA). Os controles negativos, sem a presença de DNA, foram submetidos à amplificação simultaneamente. A amplificação foi realizada em termociclador Mastercycler (Eppendorf, USA). Primeiramente, seguiu-se a etapa de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido por 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 36°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, por fim, um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos. A visualização dos produtos amplificados foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 2%, contendo brometo de etídio, seguida de exposição à luz UV por meio de um transluminador. A corrida foi realizada em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X a 50 V por 4 horas.

Análise RAPD-PCR

O padrão RAPD-PCR foi definido por bandas. O tamanho de todas as bandas visualizadas no gel foram calculadas utilizando o programa E-capt (Vilber Lourmart). A matriz de dados foi feita pela presença (1) ou ausência (0) dos produtos de amplificação. A construção do dendrograma foi baseada na similaridade dos dados da matriz usando o método de agrupamento “*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*” (UPGMA).

Amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNAr

A região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal foi amplificada através da técnica de PCR usando os *primers* universais ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') e ITS5 (5' GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G3'), gerando amplicons de aproximadamente 600 pb.

A reação foi realizada em um volume total de 25 µL contendo 2 µL de DNA (na concentração 100 ng/µL), 5 µL de tampão de reação 5X (Green GoTaq Buffer, Promega, USA), 1,5 mmol/L de MgCl, 50 pmol de cada *primer* ITS5 e ITS4, 10 mmol/L de cada desoxirribonucleotídeo e 1 U de Taq DNA polimerase (*GoTaq DNA polimerase, Promega, USA*). Os controles negativos, sem a presença de DNA, foram submetidos à

amplificação simultaneamente. Cada amostra foi submetida à reação de PCR em quadruplicata.

A amplificação foi realizada em termociclador *Mastercycler* (Eppendorf, USA). Primeiramente, seguiu-se a etapa de desnaturação inicial a 92°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 1 minuto e 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, por fim, um ciclo de extensão final a 72°C por 8 minutos. A visualização dos produtos amplificados foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídio, seguida de exposição à luz UV por meio de um transluminador. A corrida foi realizada em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X a 100 V por 30 minutos.

Após a corrida eletroforética, as amostras de DNA amplificadas foram purificadas utilizando o *kit GFX™ PCR DNA and gel band purification* (GE Healthcare, Reino Unido), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. O protocolo do kit purificação é descrito no Anexo III. Posteriormente, as amostras purificadas foram quantificadas em espectrofotômetro pela mensuração da densidade óptica a 260 nm e 320 nm, em seguida, diluídas em água deionizada estéril para a concentração de 12,8 ng/μL.

Sequenciamento de DNA

Sequências iniciadoras utilizadas e condições da reação de sequenciamento

Os produtos de PCR amplificados e diluídos em água deionizada estéril foram submetidos às reações de sequenciamento pelo método da terminação da cadeia pelo didesoxinucleotídeo (SAMBROOK et al., 1989), usando-se o *kit DYEnamic™ ET terminators cycle sequencing* (GE Healthcare, Reino Unido).

Para o sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 DNAr foram utilizados os mesmos *primers* já descritos anteriormente para a amplificar essa região (ITS5 e ITS4). A reação de sequenciamento foi realizada em volume final de 10 μL, onde cada poço da placa continha 5 μL de DNA da amostra, previamente purificado e diluído, 1 μL de um dos iniciadores e 4 μL de pré-mix fornecido pelo kit. Para cada amostra de DNA a ser sequenciada, a reação foi realizada em quadruplicata, em relação a cada um dos iniciadores utilizados.

A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador *Mastercycler* (Eppendorf, USA) em 25 ciclos de desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 1 minuto.

Precipitação da placa de sequenciamento e origem das sequências

Após a reação de sequenciamento, os produtos foram precipitados por centrifugação de acordo com protocolo descrito no Anexo IV, para a remoção de sais e componentes do kit não incorporados e então analisados em um sequenciador MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences, USA).

Os resultados gerados foram analisados pelo programa *MegaBace DNA Sequencing System* disponível na própria plataforma de sequenciamento, o qual originou uma sequência de nucleotídeos e um eletroferograma.

Montagem das sequências consenso, alinhamento múltiplo e edição das sequências

As sequências de DNA foram analisadas em relação à qualidade e montadas com o auxílio do pacote Phred/Phrap/Consed (EWING et al., 1998; EWING; GRENN, 1998). As sequências consenso de alta qualidade (phred > 20) foram submetidas à busca por similaridade com sequências depositadas no *GenBank*, através do programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). As sequências com maior similaridade foram alinhadas usando-se o programa ClustalW (THOMPSON et al., 1997). As edições dos alinhamentos foram realizadas manualmente, com o auxílio do programa Bioedit, versão 5.0.9. (HALL, 1999).

Análise filogenética

Para analisar a relação filogenética dos isolados clínicos de *H. capsulatum* em estudo, bem como, a relação destas com outras cepas depositadas no banco de dados *GenBank*, foram realizadas análises de agrupamentos abrangendo o método da máxima parcimônia, por meio do programa MEGA4 (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*, versão 4.1) (TAMURA et al., 2007).

APÊNDICE IV

Artigo publicado em Setembro de 2010

Título: *In Vitro* Effect of Sulfamethoxazole Trimethoprim against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*

Periódico: Antimicrobial Agents and Chemotherapy

Fator de Impacto 4,911, Qualis A2

ANEXOS

ANEXO I

MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

1. MEIOS DE CULTURA

1.1 Ágar-batata

Infusão de batatas* 500 mL

Dextrose 10 g

Ágar bacteriológico 15 g

Água deionizada q.s.p. 1000 mL

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

1.2 Ágar-BHI (*Brain Heart Infusion*)

Cérebro-coração, infusão de sólidos 8,0 g

Hidrolisado péptico de tecido animal 5,0 g

Hidrolisado pancreático de caseína 16,0 g

Cloreto de sódio 5,0 g

Glucose 2,0 g

Fosfato dissódico de hidrogênio 2,5 g

Ágar 13,5 g

Água destilada q.s.p 1000 mL

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

1.3 Ágar Sabouraud suplementado com sangue de carneiro a 5%

Ágar Sabouraud 6,5g

Água destilada 100 ml

Sangue de carneiro 5 ml

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

1.4 Ágar Sabouraud suplementado com sangue de carneiro a 10%

Ágar Sabouraud 6,5g

Água destilada 100 ml

Sangue de carneiro 10 ml

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

1.5 Ágar BHI suplementado com sangue de carneiro a 5%

Ágar BHI 5,2g

Água destilada 100 ml

Sangue de carneiro 5 ml

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

1.6 Ágar BHI suplementado com sangue de carneiro a 10%

Ágar BHI 5,2g

Água destilada 100 ml

Sangue de carneiro 10 ml

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

1.7 Ágar Sabouraud suplementado com glicose a 1%

Ágar Sabouraud 6,5g
Água destilada 100 ml
Glicose 1g

Modo de preparo: Dissolver o ágar Sabouraud em água destilada e adicionar 1g de glicose. Autoclavar por 15 minutos a 121°C. Esperar esfriar e distribuir em tubos inclinados estéreis.

1.8 Ágar BHI suplementado com glicose a 1%

Ágar BHI 5,2g
Água destilada 100 ml
Glicose 1g

Modo de preparo: Dissolver o ágar BHI em água destilada e adicionar 1g de glicose. Autoclavar por 15 minutos a 121°C. Esperar esfriar e distribuir em tubos inclinados estéreis.

2. SOLUÇÕES

2.1 Lactofenol azul-algodão

Ácido láctico 20 g
Fenol 20 g
Glicerina 20 g
Azul-algodão 0,05 g
Água deionizada 20 mL

2.2 Solução salina

NaCl 0,85 g
Água deionizada 100 mL

2.3 Tampão TE

Tris hidroximetil aminometano C₄H₁₁NO₃ 1,12g

Na₂EDTA 1,861g

Modo de preparo: Dissolver os reagentes em aproximadamente 100mL de água deionizada agitando manualmente até a completa dissolução. Ajustar o pH final a 8,0 com a solução de HCl 1M. Estocar a solução estéril na geladeira (4°C).

2.4 Tampão TBE

Água deionizada

Tris base 60,5g

Ácido bórico 30,915g

EDTA P.A 9,306

Solução de HCl 1M

Modo de preparo: Dissolver os reagentes em aproximadamente 800mL de água deionizada agitando manualmente até a completa dissolução. Ajustar o pH final a 8,0 com a solução de HCl 1M. Estocar a solução estéril na geladeira (4°C).

2.5 Solução *Breaking buffer*

Tris-HCl 0,5mL

EDTA 0,1mL

NaCl 1mL

Sodium dodecyl sulfate (SDS) 1%

Triton 100X 2% 1mL

Modo de preparo: Dissolver os reagentes em aproximadamente 50mL de água deionizada agitando manualmente até a completa dissolução. Colocar a solução em tubo Falcon e identificar. A solução deve ser mantida a temperatura ambiente.

2.6 Solução fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1)

Fenol 12,5

Clorofórmio 12 mL

Álcool isoamílico 0,5 mL

Modo de preparo: Dissolver os reagentes em aproximadamente 50mL de água deionizada agitando manualmente até a completa dissolução. Colocar a solução em tubo Falcon e identificar. Estocar a solução na geladeira (4°C).

ANEXO II

Protocolo para extração de DNA genômico de *Histoplasma capsulatum* na fase leveduriforme

Procedimento:

1. Colocar 3 ml de salina e fazer uma suspensão fúngica (inóculo)
2. Raspar suavemente a colônia
3. Centrifugar por 5 minutos (12.000rpm)
4. Retirar o sobrenadante
5. Adicionar 5 esferas de vidro + 200µl de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico + 200 µl de *breaking buffer*
6. Colocar no vórtex por 3 minutos para lisar 80-90% das células
7. Adicionar 200µl de tampão TE
8. Colocar no vórtex rapidamente por 10 segundos
9. Centrifugar por 5 minutos (12.000rpm)
10. Retirar o sobrenadante (aproximadamente 300µl)
11. Adicionar 1 ml de álcool etílico absoluto
12. Inverter cuidadosamente
13. Precipitar *overnight* a -20°C
14. Centrifugar por 5 minutos (12.000rpm) a 4°C
15. Retirar o sobrenadante e deixar somente o *pellet*
16. Deixar secar o *pellet* por aproximadamente 10 minutos
17. Ressuspender o DNA em 50µl de TE.

ANEXO III

Protocolo para purificação de DNA (produtos de PCR) Kit GFX™ PCR DNA and gel band purification (GE Healthcare, USA)

Procedimento:

- 1- Transferir toda a amostra de reação de PCR para um microtubo de 2 mL e adicionar 500µL de tampão de captura tipo 2, misturando bem;
- 2- Transferir todo o volume para um microtubo contendo a coluna do filtro e dar *spin* de 30 segundos na centrífuga;
- 3- Descartar volume do microtubo e recolocar a coluna com o filtro no mesmo;
- 4- Adicionar 500µL de tampão de lavagem tipo 1 na coluna e dar *spin* de 30 segundos;
- 5- Transferir coluna com filtro para um novo microtubo;
- 6- Adicionar 50µL de tampão de eluição e dar *spin* por 1 minuto;
- 7- Descartar filtro;
- 8- Estocar a -20°C.

ANEXO IV

Protocolo para precipitação de DNA em placa de sequenciamento

Procedimento:

- 1- Com o auxílio de pipeta multicanal, adicionar 20µL de isopropanol 80% em cada poço da placa de sequenciamento;
- 2- Agitar vigorosamente por 20 segundos em vórtex;
- 3- Centrifugar placa por 50 minutos a 4°C (4000 rpm);
- 4- Descartar isopropanol e dar *spin* invertido de 5 segundos na centrífuga;
- 5- Adicionar 45 µL de etanol 75% em todos os poços;
- 6- Centrifugar por 10 minutos a 20°C (4000 rpm);
- 7- Descartar etanol e dar *spin* invertido de 5 segundos;
- 8- Deixar secar até que todo o álcool evapore (em torno de 15 minutos);
- 9- Adicionar 10 µL de *loading solution* (componente do kit de sequenciamento) em todos os poços da placa;
- 10- Adicionar 10µL de agarose 0.12% e agitar vigorosamente em vórtex por 20 segundos;
- 11- Estocar a -20°C.

