

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

MAURO DE MEDEIROS MUNIZ

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
***Histoplasma capsulatum* ISOLADOS NO BRASIL**

Rio de Janeiro

2009

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
***Histoplasma capsulatum* ISOLADOS NO BRASIL**

MAURO DE MEDEIROS MUNIZ

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof. Dra. Rosely Maria Zancopé-Oliveira

Rio de Janeiro

2009

MAURO DE MEDEIROS MUNIZ

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

M966

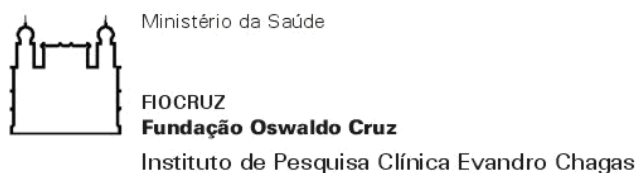
Muniz, Mauro de Medeiros.

Caracterização molecular de *Histoplasma capsulatum* isolados no Brasil / Mauro de Medeiros Muniz. – Rio de Janeiro, 2009.
viii, 101 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2009.
Bibliografia: f. 87-101

1. *Histoplasma capsulatum*. 2. Análise filogenética. 3. Histoplasmose.
4. Tipagem molecular I. Título.

CDD 616.96



MAURO DE MEDEIROS MUNIZ

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Histoplasma capsulatum* ISOLADOS EM ALGUNS ESTADOS DO BRASIL

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Doutor em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas

Orientadora: Prof. Dra. Rosely Maria Zancopé Oliveira

Aprovada em: / /

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. (Presidente) Maria Clara Gutierrez Galhardo
Doutora em Medicina (Dermatologia)
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil.

Profa. Dra. Luciana Trilles
Doutora em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas .
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fundação Oswaldo Cruz

Profa. Dra. Raquel da Silva Pacheco
Doutora em Biologia Celular e Molecular
Instituto Oswaldo Cruz - Fundação Oswaldo Cruz

Profa. Dra. Aurea Maria Lage de Moraes
Doutora em Biologia Celular e Molecular
Instituto Oswaldo Cruz – Fundação Oswaldo Cruz

Profa. Dra. Liane Castro
Doutora em em Biologia Celular e Molecular
Instituto Oswaldo Cruz – Fundação Oswaldo Cruz.

Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares (Suplente)
Doutora em Ciências Biológicas (Biofísica)
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ

Aos meus pais, Oswaldo e Maria Aparecida (*in memorium*) que não mediram esforços para que eu alcançasse meus objetivos...

À minha mulher Cláudia e minhas filhas Carolina e Rafaela, pelo tempo roubado, pelo carinho e compreensão...

AGRADECIMENTOS

- À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, IPEC – Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, na pessoa do Dr. Armando de Oliveira Schubach.
- À Dr^a Rosely Maria Zancopé Oliveira, pelo apoio, incentivo, o meu especial agradecimento pelas oportunidades oferecidas para o meu crescimento e amadurecimento profissional.
- Ao Prof. Dr. Wieland Meyer pelo suporte técnico científico no Westmead Hospital Universidade Sydney – Austrália, onde parte desse trabalho foi desenvolvido.
- Ao Prof. Dr. Joshua Daniel Nosanchuk e equipe pelo suporte técnico científico no Albert Einstein College of Medicine – New York – USA, onde parte desse trabalho foi desenvolvido, e um agradecimento especial a Allan Jefferson Guimarães.
- À grande mulher, Cláudia Gonçalves Muniz, pela paciência, pelo apoio total e compreensão que muito me ajudou no prosseguimento deste trabalho.
- À Carolina e Rafaela, minhas filhas, minhas melhores amigas, que apesar da pouca idade, entenderam que o papai precisava de tempo “*para escrever OUTRO livro*”.
- À amiga e companheira de bancada Cláudia Vera Pizzini, por todo apoio no decorrer deste trabalho – liberando-me de gestão e bancada quando possível e mostrando o tempo todo que em um trabalho científico; assim como na vida, a dose de humor é um fator muito importante.
- Aos amigos do Setor Imunodiagnóstico do Laboratório de Micologia, pelas horas agradáveis de convívio – minha família científica (em ordem alfabética) André, Gabriela, Karla, Manoel, Marcos, Patrícia e Priscila.
- À minha família – (Muniz) - que muitas das vezes, liberou-me de determinados problemas, para que eu tivesse o tempo necessário para a conclusão deste trabalho.
- À minha família – (Gonçalves) por todo apoio, carinho e compreensão, o meu agradecimento a todos; especialmente a Milton Gonçalves (super-sogra) e Margarida da Silva Gonçalves (super-sogra).
- À Prof^a. Dra. Luciana Trilles, pela revisão e valiosas sugestões no texto desta dissertação.
- A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram com este trabalho.

*“Há homens que lutam um dia, e são bons;
Há outros que lutam um ano, e são
melhores;
Há aqueles que lutam muitos anos, e são
muito bons;
Porém há os que lutam toda a vida
Estes são os imprescindíveis”*

Bertold Brecht

Muniz, M. M. Caracterização molecular de *Histoplasma capsulatum* isolados no Brasil. Rio de Janeiro, 2009. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

Para estabelecer a relação genética entre isolados de *Histoplasma capsulatum* brasileiros obtidos de diferentes fontes, um ensaio de reação em cadeia de polimerase utilizando primers arbitrários (PCR-RAPD) foi usado para delinear o polimorfismo entre os isolados de diversas regiões geográficas do Brasil e o RAPD *fingerprinting* revelou distintos perfis genotípicos promovendo um alto nível de discriminação entre cepas de *H. capsulatum* de diferentes localidades. Este estudo foi pioneiro na estratificação de isolados de *H. capsulatum* do Brasil através da tipagem molecular e associação com a sua origem geográfica.

Múltiplos métodos de tipagem foram desenvolvidos para estudo epidemiológico de *H. capsulatum*, porém as informações são limitadas quando comparados os resultados obtidos por metodologias diferentes usando o mesmo grupo de isolados. Para explorar a diversidade de *H. capsulatum* no Brasil e determinar a correlação entre três técnicas de tipagem molecular diferentes, examinamos 51 isolados de origem (ambiental, animal, e humano) por M13 PCR *fingerprinting*, PCR-RFLP da região ITS1-5.8S-ITS2 e sequenciamento parcial de quatro genes que codificam proteínas (ARF, H ANTI, OLE, TUB). Cada método identificou três agrupamentos genéticos principais com uma alta concordância entre si. Notavelmente, o método de sequenciamento parcial de gene resultou em altos valores de *bootstrap* sugerindo que o método apresenta grande sensibilidade. Além disso, análise filogenética dos 51 isolados brasileiros com 19 seqüências de *H. capsulatum* publicadas em bancos de dados de tais genes demonstrou um agrupamento genético singular, exibindo a natureza complexa e diversa do *H. capsulatum*.

Diferentes métodos moleculares promovem informações complementares que podem conduzir a um entendimento mais amplo de epidemiologia molecular. Neste trabalho, investigamos a possibilidade de utilização da técnica de qRT-PCR para quantificar a expressão de genes e elucidar a relação dos isolados brasileiros de *H. capsulatum* que se agruparam por perfis de PCR-RFLP, M13 DNA *fingerprinting* e por sequenciamento parcial do gene do antígeno H. Portanto, a expressão de seis genes associados à virulência do *H. capsulatum* e ficou evidenciado que este método permitiu o agrupamento dos isolados altamente relacionados. Além disso, os resultados sugerem que no modelo *H. capsulatum*, processos de microevoluções possam estar ocorrendo para possivelmente facilitar sua adaptação a seu ambiente local.

Palavras-chave: *Histoplasma capsulatum*, análise filogenética, histoplasmose, tipagem molecular

Muniz M. M. Molecular characterization of *Histoplasma capsulatum* isolates in Brazil. Rio de Janeiro, 2009. *Ph.D* [Science Thesis in Clinic Research in Infectious Diseases] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

ABSTRACT

To establish the genetic relationship among *Histoplasma capsulatum* isolates obtained from different sources a PCR-based random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay was used to delineate polymorphisms among isolates in geographically diverse regions in Brazil. RAPD fingerprinting revealed distinct DNA profiles and provided a high level of discrimination among *H. capsulatum* strains from different locations. This study was the first report that stratifies the clusters of *H. capsulatum* strains from Brazil by molecular typing and associates them with the geographical origin.

Multiple typing methods have been developed to study *H. capsulatum* epidemiology, however there is limited information comparing results obtained from different methodologies using the same set of isolates. To explore the diversity of *H. capsulatum* in Brazil and determine the correlation between three different molecular typing techniques, we examined 51 environmental, animal, and human isolates by M13 PCR fingerprinting, PCR-RFLP analysis of the ITS1-5.8S-ITS2 region and nucleotide sequence polymorphism of four partial gene coding proteins (ARF, H ANTI, OLE, TUB). Each method identified three major genetic clusters with a high concordance between the results of each typing techniques. Notably, the partial gene sequencing method resulted in high bootstrap values suggesting that the genetic sequencing method has the greatest sensitivity. Furthermore, phylogenetic analysis comparing the 51 Brazilian strains with 19 published *H. capsulatum* sequences of these genes showed unique genetic groups of the pathogenic fungus, demonstrating the complex and diverse nature of *H. capsulatum*.

Different molecular approaches provide complementary information that can lead to a more complete understanding of molecular epidemiology. In this work we investigated whether quantitative real-time measurements of gene expression - qRT-PCR - could be utilized to dissect the relatedness of Brazilian *Histoplasma capsulatum* isolates that cluster by PCR-RFLP profiling, M13 DNA fingerprinting and by sequencing of their ITS1-5.8S-ITS2 region and H antigen gene. We examined the expression of six genes associated with *H. capsulatum* virulence and determined that this method allowed for the separation of closely related isolates. Furthermore, the results suggest that *H. capsulatum* undergoes microevolution to facilitate adaptation to its local environment.

keywords: *Histoplasma capsulatum*, phylogenetic analysis, histoplasmosis, molecular typing methods

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1 HISTÓRICO.....	2
1.1.1 Características fenotípicas.....	4
1.1.2 Ecologia de <i>Histoplasma capsulatum</i>	5
1.2 EPIDEMIOLOGIA.....	6
1.3 PATOGENIA e QUADRO CLÍNICO	8
1.4.1 Diagnóstico micológico.....	12
1.4.2 Método imunológico para identificação de cepas de <i>Histoplasma capsulatum</i>	13
1.4.3 Diagnóstico histopatológico.....	14
1.4.4 Diagnóstico imunológico.....	14
2. <i>Histoplasma capsulatum</i>	17
2.1 Etiologia.....	17
2.2 Taxonomia e filogenia.....	18
3. FATORES DE VIRULÊNCIA.....	19
3.1 Determinantes moleculares da virulência.....	19
3.2 Fatores de virulência comprovados.....	20
3.2.1 CBP “Calcium Binding Protein”.....	20
3.2.2 $\alpha(1,3)$ -glucana.....	20
3.2.2 Candidatos a fatores de virulência.....	21
3.3.1 Melanina.....	22
3.3.2 Dimorfismo.....	23
3.3.3 Defesas oxidativas.....	23
3.3.4 Adesinas – HSP60.....	24
4. TIPAGEM MOLECULAR.....	25
4.1 Abordagem fenotípica.....	25
4.2 Abordagem genotípica.....	27
4.2.1 Sondas para <i>H. capsulatum</i>	27
4.2.2 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado.....	28
4.2.3 Polimorfismo dos fragmentos gerados por endonuclease de restrição (RFLP) e análises de DNA cromossomal por <i>Southern blot</i>	29
4.2.4 Reação em cadeia de polimerase utilizando “primers” arbitrários – (RAPD)	31
4.2.5 Sequenciamento de DNA.....	33
5. EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR.....	36
6. RELEVÂNCIA DO ASSUNTO E IMPACTO	37
7. OBJETIVOS	39
7.1 Objetivos gerais.....	39
7.1 Objetivos específicos.....	39
8. Artigo nº 1	40
9. Artigo nº 2	47
10. Artigo nº 3	58
11. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	79
12. CONCLUSÕES.....	86
13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

1. INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

O *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* foi descrito pela primeira vez pelo patologista americano Samuel Taylor Darling, em 1906, durante a investigação da prevalência de calazar, em necropsia de trabalhadores com hepatoesplenomegalia, na região do Canal do Panamá. Durante esta pesquisa, foi observada, a presença de histiócitos parasitados por um protozoário encapsulado que ainda não havia sido descrito, sendo denominado *Histoplasma capsulatum* (Darling, 1906). Somente 6 anos após esta descrição, Henrique da Rocha Lima, um pesquisador brasileiro, classificou-o como um fungo (Rocha Lima, 1912), sugerindo que o microrganismo, originalmente considerado um protozoário, seria uma levedura.

Em 1934, foi relatado o primeiro caso de histoplasmose descrito em lactente de seis meses de idade (Dodd e Tompkins, 1934). O primeiro cultivo do fungo coube a DeMonbreun, (1934), e este fato possibilitou a demonstração do caráter dimórfico do fungo através do estudo morfológico em parasitismo e saprofitismo. O nome específico *H. capsulatum* permaneceu, mesmo após ter sido verificado, através da utilização de microscopia eletrônica, a ausência de cápsula (Ribi e Salvin, 1956).

A demonstração do habitat ecológico do *H. capsulatum* ocorreu em 1949, quando o fungo foi isolado pela primeira vez do solo (Emmons, 1949) e em 1951 descreveram-se os fatores que propiciam seu crescimento neste ambiente, tal como a presença de altos teores de matéria orgânica em solos enriquecidos com fezes de aves e morcegos (Ajello e Zeidberg, 1951).

Até 1945, a histoplasmose era considerada uma doença rara e quase sempre fatal (Parsons e Zaraforretis, 1945). Estes conceitos foram modificados por Christie e Peterson, (1945) por verificarem que em áreas rurais de determinadas regiões, onde a mortalidade por tuberculose e incidência de calcificações pulmonares não era concordante, um grande número de indivíduos que apresentava calcificações pulmonares e eram PPD (Purified

Protein Derivative) Derivado Protéico Purificado, não reatores, apresentava positividade para o teste intradérmico com histoplasmina.

Posteriormente, uma nova espécie, *Histoplasma duboisii*, foi descrita como agente etiológico da histoplasmose desde que sua forma miceliana era indistinguível da apresentada pelo *H. capsulatum* (Vanbreuseghem, 1952), porém as grandes células leveduriformes encontradas em tecido eram morfológicamente distintas das pequenas células do *H. capsulatum*.

O conhecimento atual da distribuição geográfica da histoplasmose humana é determinado pelos inquéritos epidemiológicos realizados com histoplasmina e isolamento do fungo a partir de solos e de animais (Wheat et al., 1981). Logo, a evidência em diferentes regiões, tanto do microrganismo quanto do índice de infecção, fundamenta o conceito de que a histoplasmose é considerada uma doença cosmopolita (Mantovani et al., 1968; Ajello, 1971; Hoff e Bigler, 1981).

No Brasil, os estudos sobre histoplasmose se iniciaram com Almeida e Lacaz (1939) que isolaram o *H. capsulatum* de lesões de pacientes com cromoblastomicose. Também em 1941, esses mesmos autores descreveram o segundo isolamento de *H. capsulatum* no Brasil, em cultura de escarro de um paciente internado em um sanatório para tuberculosos, em Campos do Jordão (SP) (Almeida e Lacaz, 1941). Em 1941 foi publicado por Vilela & Pará o primeiro caso fatal de histoplasmose disseminada, diagnosticada por exames histopatológicos de fígado de uma criança de 3 anos de idade, procedente da localidade de Recreio, Estado de Minas Gerais, com suspeita de febre amarela (Vilela e Pará, 1941).

No Estado do Rio de Janeiro, Duarte, (1945) relatou o primeiro caso de histoplasmose. Tratava-se de um caso de doença disseminada cujo diagnóstico só foi esclarecido pela necropsia. Posteriormente, foram relatados mais dois casos de histoplasmose, disseminada e localizada (Kane et al., 1966; Bevilacqua e Santos, 1968), um caso de histoplasmose pulmonar crônica (Paula, 1959) e três casos de histoplasmose aguda (Pereira, 1975; Paula e Aidé, 1977; Paula e Aidé, 1979). Numa revisão de histoplasmose no Brasil em 1978 foram citados um total de 34 casos publicados de histoplasmose humana, dos quais 25 sob a forma disseminada, 8 sob a forma pulmonar crônica e apenas 1 de

histoplasmose aguda, ressaltando o desconhecimento da doença pela maioria dos médicos brasileiros na época (Londero e Ramos, 1978).

1.1.1 Características fenotípicas

O *H. capsulatum* se caracteriza, tanto em parasitismo quanto em cultivo a 37°C, como pequenos elementos leveduriformes unibrotantes, medindo aproximadamente 2 µm. As colônias produzidas durante esta fase são semelhantes a colônias formadas por outras leveduras, com aspecto úmido, liso e de coloração branco-amarelada (Rippon, 1988).

Em seu ambiente natural, o solo, ou quando cultivados abaixo de 35°C, apresentam-se inicialmente como colônias filamentosas brancas, com aspecto algodado, representados microscopicamente como uma trama de hifas hialinas, septadas e ramificadas, além de apresentarem estruturas de propagação, os conídios, que estão presente tanto lateralmente como nas extremidades terminais das hifas. Estes propágulos apresentam-se como estruturas globosas, estruturas essas que possuem de 8 a 16 µm de diâmetro, de parede lisa, que com o envelhecimento da colônia, desenvolvem numerosas projeções, semelhantes a tubérculos, em toda a sua superfície, sendo denominado como macroconídios tuberculados (Pine, 1960); e microconídios, estruturas ovaladas de 2 a 5 µm de diâmetro, com paredes lisas, nascidos na extremidade de curtos conidióforos em ângulo reto com a hifa vegetativa. Estas estruturas de propagação apresentam grande resistência aos fatores adversos do meio ambiente, são facilmente carregados por correntes aéreas, com isso dispersando-se a grandes distâncias (Chick et al., 1981). Os microconídios são os elementos infectantes mais freqüentes, pois possuem tamanhos reduzidos e penetram mais facilmente nos alvéolos pulmonares, além de se destacarem das hifas com mais facilidade (Larsh, 1975).

Quanto à morfologia de colônia, o *H. capsulatum* na sua forma miceliana pode ser dividido em 2 tipos: tipo A ("albino") cujas colônias se apresentam como micélio aéreo algodoso, branco, com pouca produção de estruturas de propagação e o tipo B ("marron"), que possui hifas finas, é pouco filamentoso e possui grande número de macro e microconídeos. Já na sua forma leveduriforme são reconhecidas colônias rugosas ("wild-type colony") e lisas (variante espontânea) (Eissenberg e Goldman, 1991).

H. capsulatum possui dois tipos sexuais ou "mating types" (+ e -) (Kwon-Chung, 1973; Kwon-Chung, 1975), os quais aparecem em igual frequência entre cepas isoladas de solo. Entretanto, entre as cepas isoladas de casos clínicos, o "mating type -" é muito mais comum (Kwon-Chung et al., 1974).

O modelo estrutural da parede celular do *H. capsulatum* e a classificação do *H. capsulatum* em quimiotipos e sorotipos também é baseada na composição da parede celular tanto da forma filamentosa quanto da leveduriforme que serão detalhados no tópico 4.1 Abordagem fenotípica.

1.1.2 Ecologia de *Histoplasma capsulatum*

O *H. capsulatum* tem como seu habitat natural o solo, onde é encontrado em microambientes na sua fase filamentosa. Dois parâmetros de extrema importância, a temperatura e a umidade têm sido associados ao crescimento deste fungo tanto em condições experimentais quanto na natureza. Alguns fatores físico-químicos determinam a distribuição geográfica do *H. capsulatum* na natureza. Estes micronichos geralmente apresentam condições de temperatura, umidade e pH do solo ideais à sobrevivência deste fungo. Portanto, é frequente a associação do isolamento do *H. capsulatum* de microambientes abrigados como cavernas, construções abandonadas, galinheiros, árvores ou quaisquer outros locais onde o solo possa estar enriquecido com fezes de morcegos, galinhas e outras aves gregárias (Cano e Hajjeh, 2001). Esta relação é devida a presença de alto teor de ácido úrico encontrado nas fezes destes animais, sendo este componente utilizado pelo *H. capsulatum* como nutriente e fonte de nitrogênio, imprescindível ao seu crescimento e proliferação (Emmons, 1949; Zeidberg et al., 1955; Goodman e Larsh, 1967; McDonough et al., 1976).

A dispersão eólica é de grande importância na disseminação do *H. capsulatum* a novos microambientes. Já foi claramente estabelecido que as infecções geralmente ocorrem após o revolvimento do solo pelo homem, provocando contato com propágulos fúngicos infectantes (Chick et al., 1981). Entretanto, pássaros e morcegos podem contribuir na disseminação de conídios viáveis. Alguns investigadores (Klite e Diercks, 1965) mostraram que morcegos podem contaminar microambientes com organismos presentes no seu conteúdo intestinal. Surtos epidêmicos ocorrem mais comumente em regiões de maior

endemicidade, embora já tenham sido descritos em áreas onde a frequência de histoplasmose é baixa (Sacks et al., 1986). Em geral, ocorrem como microepidemias que surgem quando um pequeno número de indivíduos se expõe, simultaneamente, a um grande número de microconídios presente na corrente aérea, numa pequena área com solo contaminado. Deste modo, a histoplasmose foi primeiramente associada a ocupações rurais, porém esta infecção não pode ser descartada em residentes de regiões urbanas. Infecções de caráter ocupacional podem acometer trabalhadores com atividades em galinheiros e em cavernas ocupadas por morcegos devido à exposição ao *H. capsulatum*. Microfocos de *H. capsulatum* têm sido detectados em parques e jardins e próximo a edifícios antigos (DiSalvo e Johnson, 1979). Um novo surto epidêmico associado com a atividade de espeleologia foi registrado (Ashford et al., 1999). Outro exemplo de uma epidemia urbana de histoplasmose ocorreu em Indianápolis entre 1978 e 1979 (Wheat et al., 1981). Algumas epidemias de histoplasmose foram detectadas após demolições e limpezas de prédios, como a ocorrida em 1993 em Michigan, numa fábrica de papel após limpeza do local (Stobierski et al., 1996). Dois surtos ocupacionais de histoplasmose em Illinois; 2001 em um depósito de lixo e 2003 durante a construção de uma ponte (Huhn et al., 2005). Eventos associados ao revolvimento de fezes de aves e morcegos durante a limpeza, bem como adição de material orgânico na adubação de canteiros e jardins também estão associados a surtos epidêmicos como o ocorrido envolvendo turistas americanos em um hotel de Acapulco, México (Taylor et al., 2005).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

A histoplasmose é uma micose cosmopolita e a prevalência da infecção pode ser avaliada pelo teste intradérmico com histoplasmina. Embora este teste seja uma excelente ferramenta epidemiológica, por definir áreas endêmicas de histoplasmose, apresenta limitações quanto ao valor diagnóstico, por não distinguir entre infecção passada ou recente. A maior concentração de reatores positivos é encontrada na região central dos Estados Unidos da América, embora casos de histoplasmose também tenham sido relatados nos outros continentes (Wheat et al., 1989; Hajjeh et al., 2001).

No Brasil, a distribuição de *H. capsulatum* no meio ambiente e as características do seu nicho ecológico têm sido muito pouco estudados, podendo ser enumerados os trabalhos

referentes ao isolamento deste fungo do solo (Silva, 1956; Fava Netto et al., 1967; Araujo, 1970; Schmidt et al., 1973; Moraes e Almeida, 1976; Wanke, 1985; Severo et al., 1986; Zancopé-Oliveira e Wanke, 1987; Fernandes et al., 1989; Oliveira et al., 2006), apesar de diversos inquéritos com teste cutâneo com histoplasmina revelarem uma prevalência bastante significativa da histoplasmose-infecção no nosso país. Dados de numerosos inquéritos epidemiológicos realizados com histoplasmina no Brasil baseados em revisão de Fava e Fava Netto (1998) demonstram expressivos índices de positividade e distribuição focal da prevalência da infecção nas diferentes regiões do país - região Sul (6,30-89%) região Nordeste (2,60-61,50%), região Sudeste (4,60-93,20%), região Centro Oeste (9,60-63,10%) e região Norte (12,8-50,1%) (Fig. 1). Convém salientar que o estado do Rio de Janeiro apresenta áreas com altos índices de infecção, sendo consideradas como endêmicas ou hiperendêmicas (Carvalho, 1949; Sandia, 1974; Wanke, 1985; Zancopé-Oliveira e Wanke, 1985).



Fig. 1 - Distribuição de reatores a histoplasmina nas 5 regiões do Brasil (valores mínimos e máximos em porcentagem)

A infecção primária da histoplasmose pode ocorrer em indivíduos de qualquer idade e sexo, sendo muito mais dependente da carga parasitária adquirida. Entretanto, crianças com menos de 1 ano e adultos com mais de 50 anos de idade estão sujeitos a desenvolver formas mais graves, por vezes fulminantes, da histoplasmose. A forma pulmonar progressiva crônica é predominante no adulto do sexo masculino, principalmente naqueles com defeito estrutural nos pulmões. Pacientes com comprometimento de seu sistema imunológico por serem portadores de linfomas, leucemias, Doença de Hodgkin, Síndrome da imunodeficiência adquirida, diabetes e aqueles em terapia com agentes imunossupressivos, desenvolvem doença progressiva, com rápida disseminação pelo organismo. Nestas circunstâncias, o *H. capsulatum* é considerado um fungo oportunista, sendo este, entre os agentes das micoses sistêmicas, o mais comumente associado a infecções fúngicas oportunistas (Capone et al., 1999).

Numerosos animais podem ser hospedeiros do *H. capsulatum*. O cão foi o primeiro animal encontrado naturalmente infectado pelo *H. capsulatum* (DeMonbreun, 1939). Outros mamíferos como bovinos, suínos, eqüinos, roedores e marsupiais, também foram encontrados naturalmente infectados no continente americano (Emmons, 1949; Emmons, 1950; Randall et al., 1951; Menges et al., 1954; Rowley et al., 1954). A histoplasmose animal já foi descrita no Brasil em cães (Pará, 1946; Silva et al., 1961; Madureira, 1963), em cobaias de laboratório (Correa e Pacheco, 1967) e em animais silvestres (Lainson e Shaw, 1975; Wanke, 1985; Zancopé-Oliveira, 1985).

1.3 PATOGENIA e QUADRO CLÍNICO

A patogenicidade deste fungo é um fenômeno acidental e não é essencial para a sobrevivência ou disseminação da espécie envolvida e a infecção primária da histoplasmose pode ocorrer em indivíduos de qualquer idade e sexo. As infecções frequentemente ocorrem após o revolvimento do solo pelo homem, provocando dispersão aérea de elevado número de propágulos infectantes. A inalação de uma grande quantidade de conídios pode causar uma infecção pulmonar em indivíduos imunocompetentes. Embora possa ocorrer rápida disseminação sistêmica no organismo, na grande maioria dos pacientes a infecção é limitada, levando somente à calcificação residual no pulmão e, em alguns casos, no baço (Goodwin e Des Prez, 1978; Kauffman et al., 2007).

Após a inalação das partículas infectantes, os microconídios atingem os alvéolos pulmonares convertendo-se para forma leveduriforme iniciando processo de multiplicação dentro dos macrófagos, causando uma pneumonite focal. O fungo, ao vencer esta barreira de defesa inespecífica, alcança os linfonodos mediastinais por via linfática, constituindo o complexo pulmonar ganglionar primário, semelhante ao que ocorre na tuberculose pulmonar primária (Rippon, 1988). Nesta fase, antes do hospedeiro reagir com imunidade celular específica, ocorre disseminação linfo-hematogênica para fígado, baço, medula óssea, pulmões e outros órgãos, determinando focos secundários. Cerca de 10 a 18 dias após o início da infecção primária ativa-se a imunidade celular, detendo o processo tanto nos focos primários, quanto nos focos secundários. Esta reação granulomatosa é seguida de necrose de caseificação, encapsulamento fibroso e freqüente depósito de sais de cálcio nas lesões residuais. Nos indivíduos imunocompetentes, as subseqüentes re-exposições ao fungo determinam lesões regressivas semelhantes; entretanto, em pacientes com deficiência ou imaturidade da imunidade celular, a infecção pode apresentar caráter progressivo, de gravidade variável. As lesões residuais podem abrigar elementos fúngicos viáveis, responsáveis por reativação endógena da micose.

A forma pulmonar crônica apresenta mecanismo patogênico diverso, resultando da colonização de áreas pulmonares estruturalmente defeituosas, como enfisema centrolobular ou bolhoso, assumindo neste contexto um caráter oportunista; porém, a micose permanece circunscrita aos pulmões.

A histoplasmose apresenta amplo espectro clínico, desde formas leves interpretadas como quadros gripais, até formas graves e disseminadas. A gravidade e o grau de disseminação da micose dependem das condições do hospedeiro e do tamanho do inóculo infectante. As principais formas clínicas são: infecção assintomática (subclínica), histoplasmose aguda, histoplasmose disseminada, histoplasmose disseminada subaguda (tipo juvenil), histoplasmose disseminada crônica (tipo adulto), histoplasmose oportunística e histoplasmose pulmonar crônica. As duas primeiras são formas regressivas observadas em hospedeiros normais e as duas últimas são formas progressivas verificadas em pacientes com deficiência imunológica (histoplasmose disseminada) ou defeito anatômico estrutural pulmonar (histoplasmose pulmonar crônica). Outras formas, decorrentes de resposta imunológica e/ou fibrogênica exacerbada incluem, entre outras, a granulomatose

mediastínica, a fibrose mediastínica, artrite e pericardite. Cada forma clínica mencionada acima está descrita abaixo em maiores detalhes segundo Zancope-Oliveira e colaboradores (2005b)

Infecção subclínica - Atinge indivíduos hígidos nas áreas endêmicas, onde até 95% ou mais das infecções primárias e de reinfecção não são reconhecidas. Diagnostica-se através de: 1) teste cutâneo com histoplasmina positivo; 2) evidências radiológicas, com nódulos pulmonares calcificados, infiltrados pulmonares ou linfadenomegalias hilares ou mediastinais, lesões nas quais se demonstra a presença de *H. capsulatum* em cortes histológicos, 3) reações sorológicas específicas para esta infecção micótica.

Histoplasmose aguda - Gravidade variável em função da faixa etária, da quantidade de partículas infectantes inaladas e do estado prévio de sensibilização do hospedeiro ao fungo. Febre alta, cefaléia, mialgia e astenia sempre estão presentes, geralmente acompanhadas de manifestações respiratórias como tosse seca, dor ou opressão retroesternal, dispnéia de intensidade variável e, ocasionalmente, dor pleural. Nos casos mais graves pode surgir insuficiência respiratória. Radiologicamente esta forma caracteriza-se por pequenas áreas de pneumonite em meio a infiltrado intersticial difuso. Linfonomegalia hilar é achado comum, diferenciando a histoplasmose das pneumonias bacterianas e virais.

Na tomografia observa-se infiltrado intersticial difuso do tipo micronodular, de distribuição aleatória, semelhante àquele que ocorre na tuberculose miliar. Em raras ocasiões, porém, por estímulo antigênico anormal e persistente, ocorre excessivo depósito de fibra colágena na periferia do nódulo. Este processo de reparo anormal determina destruição de parênquima pulmonar circunjacente e lento alargamento da massa fibrosa denominada histoplasmoma.

Histoplasmose disseminada - Esta forma é definida pela presença de foco extra-pulmonar e extra-ganglionar mediastinal de curso progressivo. Dois tipos podem ser identificados, conforme o estado imune do hospedeiro. No hospedeiro sem imunodeficiência, a micose disseminada apresenta-se de evolução aguda, subaguda ou crônica, quadros mais relacionados à idade do paciente; no hospedeiro com deficiência imunológica, caracteriza-se a histoplasmose oportunística.

Histoplasmose disseminada subaguda (tipo juvenil) – Mais comum em adultos jovens. Manifesta-se por febre moderada e intermitente, mal estar, astenia, adinamia e emagrecimento progressivo. Lesões focais destrutivas são muito comuns e freqüentemente dominam o quadro clínico. Estas lesões, em número e localização variável e que surgem em seqüência imprevisível, manifestam-se como doença ulcerativa intestinal, insuficiência supra-renal, meningoencefalite, lesões cutâneas ou subcutâneas. Hepato e esplenomegalia são muito comuns. Radiologicamente podem ser evidenciados sinais de infecção pulmonar primária ou de reinfeção, em cerca de um terço dos casos. Esta forma geralmente evolui para óbito em meses ou anos se não for diagnosticada e tratada.

Histoplasmose disseminada crônica (tipo adulto) - Predomina em adultos acima de 40 anos de idade e apresenta lesões das vias aéreas e digestivas superiores em cerca de 70% dos casos. De evolução arrastada; lesões acompanhadas de febre baixa e intermitente, astenia e emagrecimento, podendo regredir espontaneamente e reaparecer no mesmo ou em outro sítio orgânico. Episódios recorrentes podem ser observados durante 10 anos ou mais, acompanhados de manifestações extrapulmonares, sendo os pulmões raramente atingidos.

Histoplasmose oportunística - Nas áreas endêmicas de histoplasmose são muitos os casos da micose associada à doença de Hodgkin, linfossarcoma, leucemia, lupus eritematoso sistêmico, AIDS ou qualquer outra condição de depressão da imunidade celular, como nos indivíduos transplantados. O uso de drogas imunossupressoras favorece o risco de histoplasmose disseminada. A micose pode originar-se de uma reinfeção endógena (reativação de foco latente) ou exógena. A febre está sempre presente, devendo suspeitar-se da micose em todo indivíduo imunodeprimido com febre de etiologia obscura e que resida em área endêmica.

Hepatomegalia, esplenomegalia, anemia, leucopenia e plaquetopenia podem estar presentes. O pulmão pode ser o único órgão atingido nos quadros iniciais da micose; em casos mais avançados, múltiplos órgãos podem estar envolvidos, levando a quadros polimórficos e atípicos. Esta forma, quando não diagnosticada e tratada precocemente, evolui para o óbito.

Histoplasmose pulmonar crônica – Ocorre em pacientes com enfisema centro-lobular ou bolhoso, defeito anatômico estrutural que favorece a instalação do foco inicial da doença, ocasionando fibrose pulmonar progressiva e agravamento da DPOC (doença pulmonar

obstrutiva crônica) pré-existente. Incide geralmente em homens residentes em áreas endêmicas a partir da terceira década de vida. As manifestações clínicas, as lesões radiológicas e a evolução são praticamente indistinguíveis da tuberculose pulmonar crônica, sendo a associação de ambas um achado comum, tornando obrigatória a investigação de ambas as condições clínicas.

Granulomatose e fibrose mediastínica – Resultam de reação inflamatória e/ou fibroblástica anormal do hospedeiro. Os linfonodos hilar podem apresentar reação inflamatória intensa, com desarranjo da cito-arquitetura ganglionar levando à necrose caseosa, com aumento progressivo de tamanho com compressão de estruturas mediastinais. Outras vezes, formando massas mediastinais com progressiva fibrose, conhecida como mediastinite fibrosante, que pode ocasionar compressão da veia cava superior, artérias pulmonares e brônquios. Raras vezes podem surgir aderências e drenagem por fístula para estruturas como esôfago e brônquios, constituindo a broncolitíase, resultado da erosão da parede brônquica por linfonodos calcificados que drenam para o interior da luz brônquica.

1.4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico clínico da histoplasmose geralmente é baseado em dados epidemiológicos como história de exposição ao ambiente contaminado, paciente com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) preexistente e/ou evidência de lesões radiológicas sugestivas. O diagnóstico definitivo deve ser obtido através de testes laboratoriais utilizando técnicas micológicas, histopatológicas e imunológicas (Rippon 1988).

1.4.1 Diagnóstico micológico

Exame direto. A demonstração da presença de células leveduriformes do *H. capsulatum* em urina, escarro, lavado brônquico, líquido, medula óssea e biópsias, através da microscopia de preparações a fresco ou utilizando-se hidróxido de potássio a 10%, é extremamente difícil. Melhor rendimento nestes casos é obtido através da observação por métodos de coloração tais como Wright, Giemsa e Grocott. Um outro fator limitante ao

exame direto a fresco ou corado é o tamanho reduzido e a similaridade do *H. capsulatum* com outros agentes causadores de micoses e outras parasitoses. Deste modo, torna-se essencial a identificação do fungo através de seu isolamento em cultivo para o diagnóstico definitivo da histoplasmose (Rippon, 1988).

Cultivo. As amostras biológicas provenientes de pacientes com suspeita de histoplasmose devem ser cultivadas em meio de isolamento tais como Ágar Sabouraud, Mycosel, entre outros, com incubação a 25°C durante 6 a 12 semanas (Rippon 1988). As culturas são positivas em 10-15% nos pacientes com doença pulmonar crônica e 84-90% com doença disseminada (Wheat, 1994). O fungo também pode ser isolado após inoculação animal, por via intraperitoneal, do material suspeito.

Fungos sapróbios pertencentes ao gênero *Chrysosporium* podem apresentar estruturas de propagação semelhantes aos macroconídios, recomendando-se, então, a realização da conversão deste fungo à fase leveduriforme em meios enriquecidos a 37°C. O processo de conversão à fase leveduriforme do *H. capsulatum* não é facilmente obtido, pois depende das características fisiológicas de cada cepa (Eissenberg e Goldman, 1991). Quando convertidos à fase leveduriforme observam-se colônias glabras, lisas, branco-amareladas sendo evidenciadas na microscopia como leveduras ovais, unibrotantes.

1.4.2 Método imunológico para identificação de cepas de *Histoplasma capsulatum*

Produção de exoantígenos. Exoantígenos são macromoléculas imunogênicas solúveis produzidas pelos fungos na sua fase inicial de desenvolvimento. Estes antígenos são liberados em meios de cultivo (líquido ou sólido) e prontamente detectáveis pela reação de imunodifusão dupla ou por ensaios imunoenzimáticos.

É uma metodologia simples e rápida para imunoidentificação de fungos patogênicos propiciando resultados específicos em culturas na fase exponencial de crescimento, entre 2 a 5 dias, principalmente nos casos de culturas de formas atípicas ou de difícil conversão à fase leveduriforme (Kaufman e Standard, 1978; Kaufman e Ajello, 1982).

1.4.3 Diagnóstico histopatológico

As células de *H. capsulatum*, embora visíveis à microscopia com lentes de grande resolução em cortes de tecidos corados pela hematoxilina-eosina (HE) devem ser examinadas com objetiva de imersão para o diagnóstico definitivo, diferenciando-os dos protozoários *Leishmania* e *Toxoplasma*, os quais apresentam formas intracelulares semelhantes ao do *H. capsulatum* (Rippon, 1988).

O exame histopatológico de fígado, pulmão, gânglios linfáticos e lesões mucocutâneas, podem apoiar o diagnóstico clínico. O diagnóstico histopatológico pode ser feito quando células leveduriformes são vistas parasitando macrófagos em cortes teciduais corados pela hematoxilina-eosina (HE). As leveduras são observadas como corpúsculos levemente basofílicos, esféricos, rodeados por um halo claro delimitado por uma parede celular fina e hialina (Rippon, 1988). Também é indicada a utilização da impregnação pela prata (Método de Gomori-Grocott). No entanto, a positividade encontrada na utilização de métodos de coloração especiais é somente de 50%. Resultados falso-positivos podem ocorrer quando outros fungos como *Pneumocystis carinii* ou artefatos de coloração estão presentes (Wheat, 1996).

1.4.4 Diagnóstico imunológico

O diagnóstico presuntivo da histoplasmose tem sido centrado em alguns testes sorológicos, uma vez que através da análise da resposta imune humoral torna-se possível fornecer informações relacionadas ao diagnóstico e acompanhamento, bem como auxiliar em estudos epidemiológicos.

A reação de imunodifusão em gel (ID) e a reação de fixação de complemento (RFC) têm sido apontadas como testes de referência para a detecção de anticorpos específicos em material biológico, uma vez que, quando usadas conjuntamente, apresentam alta especificidade e sensibilidade (Kauffman, 1992). Entretanto, estes testes apresentam limitações. A resposta sorológica correlaciona-se com a magnitude da exposição e severidade da doença. Duas a seis semanas após exposição ao *H. capsulatum* são necessárias para o desencadeamento da resposta imune humoral, e conseqüentemente,

técnicas com espectro de detecção baixo como a RFC e ID perdem seu valor diagnóstico em pacientes com histoplasmose aguda no início da infecção. Nos casos de disseminação da doença a produção de anticorpos pode ser bloqueada devido a imunodepressão do pacientes (Sathapatayavongs et al., 1983; Wheat et al., 1990).

O teste intradérmico com histoplasmina é de grande valor em estudos epidemiológicos. Através deste método é possível verificar a presença de indivíduos sensibilizados pelo *H. capsulatum* em uma determinada região. Entretanto, apresenta valor diagnóstico baixo, pois não discrimina entre infecção passada ou recente. Apresenta uma positividade em torno de 50 a 90% em indivíduos residentes em áreas endêmicas para histoplasmose. Em geral a reação positiva apresenta valor diagnóstico somente quando ocorre conversão de uma reação negativa para uma reação positiva. A conversão do teste intradérmico de negativo para positivo em pessoas doentes representa um bom prognóstico, pois indica uma resposta imune celular bem conservada. (Kaufman e Reiss, 1986).

O antígeno mais utilizado no imunodiagnóstico da histoplasmose é o filtrado de cultura do *H. capsulatum* da fase miceliana crescido em meio quimicamente definido. Este filtrado é empregado como antígeno em teste intradérmico e testes sorológicos, tendo a denominação de histoplasmina (HMIN). O primeiro autor a descrever os fatores antigênicos específicos encontrados na HMIN foi Heiner (1958) através do fracionamento desta preparação por técnicas eletroforéticas. Foram observados seis componentes antigênicos, os quais foram denominados de H, M, X, Y, C, N. Duas glicoproteínas termo-lábeis, H e M foram consideradas espécie-específicas. Dentre os componentes antigênicos; o antígeno C, uma galactomanana, não está somente presente no *H. capsulatum*, mas também em outros gêneros de fungos dimórficos, causadores de micoses sistêmicas, sendo responsável pelas reações cruzadas encontradas em diversos testes sorológicos (Reiss et al., 1986; Wheat et al., 1986b).

Vários autores trabalharam na análise da composição química da histoplasmina, e na tentativa da purificação destas frações antigênicas, (Greene et al., 1960; Dickerson e Busey, 1968; Green, 1985). A combinação de dois processos cromatográficos, gel filtração e troca iônica, foi utilizada por Bradley e colaboradores (1974) porém não foi possível a total purificação destes componentes. Em análise feita sobre o antígeno M, demonstrou-se a associação de aproximadamente 55% de carboidrato, enquanto que no antígeno H, 32%

(Reiss et al., 1986). Desta forma, sugeriu-se a natureza glicoprotéica destes antígenos. Trabalhando com antígeno tratado com metaperiodato de sódio, Brock e colaboradores (1984), indicaram um aumento na especificidade da reação da ELISA de inibição utilizando estes reagentes. O antígeno H, através da avaliação pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), apresentou massa molecular relativa de 120 kDa. Já o antígeno M apresentou massa molecular relativa de 94 kDa (Zancope-Oliveira et al., 1993). Posteriormente, Zancope-Oliveira e colaboradores (1994a; 1994b), trabalhando na caracterização imunológica dos antígenos H e M do *H. capsulatum* demonstraram que a utilização da glicoproteína M deglicosilada aumenta a especificidade e sensibilidade do teste de Western blot (WB) na detecção de anticorpo e ainda sugerem que processos cromatográficos de alta eficiência por troca iônica seqüencial é a metodologia adequada para obtenção dos antígenos imunodominantes H e principalmente M, livres de outras proteínas e carboidratos contaminantes (Zancope-Oliveira et al., 1993). O teste de "Western blot" utilizando antígeno filtrado na forma deglicosilada, Pizzini e colaboradores (1999) demonstraram excelente especificidade e sensibilidade nas formas agudas e disseminadas da histoplasmose, onde reside o maior problema diagnóstico quanto à detecção de anticorpos, quando se utilizam técnicas de imunodifusão dupla e fixação de complemento. Recentemente, outro imunoenensaio foi desenvolvido utilizando os mesmos antígenos em sua forma nativa e deglicosilada apresentando sensibilidade de 93 e 96%, respectivamente (Guimaraes et al., 2004). Embora a reatividade cruzada deste ensaio imunoenzimático (EIA) não tenha sido abolida na sua totalidade, verificou-se um aumento na especificidade do teste de 57 para 92%.

Um teste de Elisa de inibição (ELISA) para a detecção em soro de um antígeno específico de *H. capsulatum* de 69 a 70-kDa e o seu potencial uso no acompanhamento de pacientes com histoplasmose foi investigado (Gomez et al., 1999). Títulos de antígenos em soro de 16 pacientes apresentando diferentes formas clínicas de histoplasmose foram monitorados em intervalos regulares por cerca de 80 semanas. Soros de quatro em cinco pacientes com a forma aguda da doença mostraram queda rápida na antigenemia, tornando-se negativo em 14 semanas (entre 10 a 16 semanas). Soros de quatro pacientes com histoplasmose disseminada mostraram quedas em níveis de antígeno; três deles se tornaram negativo para o antígeno antes de semana 32; o quarto paciente ficou negativo antes da

semana 48. Em contraste, título de antígenos em quatro de seis pacientes com AIDS com a forma disseminada da doença permanecia positivo ao longo do acompanhamento. Um paciente apresentando a forma crônica da doença se tornou negativo ao antígeno antes de 9 semanas. Concluindo assim, que o teste de ELISA de inibição mostrou-se interessante para o monitoramento de pacientes não AIDS com as formas agudas e disseminadas da doença e pode complementar os métodos existentes de acompanhamento.

O radioimunoensaio (RIA) tem sido amplamente utilizado no “Histoplasmosis Reference Laboratory” (HRL) em Indianápolis, USA, na detecção de antígeno polissacáride de *H. capsulatum* em espécimes de urina, sangue, lavado bronco-alveolar e líquor. Estudos realizados em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida e histoplasmose disseminada demonstraram uma sensibilidade de 92%. O antígeno é menos detectável nas formas pulmonar aguda (25-75%) e crônica (15%) (Wheat e Kauffman, 2003). Resultados falso-positivos têm sido observados em pacientes com blastomicose, paracoccidiodomicose e infecção por *P. marneffei* e, menos frequentemente, em pacientes com coccidiodomicose (Wheat, 2001). Os títulos de antígeno diminuem com o tratamento, desaparecendo nos casos dos pacientes curados ou em casos de doença autolimitada, e aumentam nos casos de recaídas (Wheat et al., 2002).

2. *Histoplasma capsulatum*

2.1 Etiologia

A histoplasmose humana pode ser dividida em 2 categorias distintas, a histoplasmose clássica também conhecida como Doença de Darling, Doença das Cavernas, causada pelo *H. capsulatum* var. *capsulatum* e a histoplasmose africana que tem como agente etiológico o *H. capsulatum* var. *duboisii*. O agente etiológico de interesse neste estudo é o *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* pelo fato de ser encontrado mundialmente e estar presente em nosso país, acometendo tanto indivíduos imunocompetentes, bem como aqueles com depressão imunológica (Londero e Wanke, 1988).

2.2 Taxonomia e filogenia

H. capsulatum foi inicialmente classificado como pertencente ao filo Deuteromycota, classe Hyphomycetes, também conhecidos como *Fungi Imperfecti*, devido a se conhecer somente sua fase anamórfica (assexuada) (Chandler, 1980). Atualmente esta classificação se apresenta mais completa, por ter-se reconhecido sua fase teleomórfica. Este estágio foi primeiramente referido por Ajello e Cheng (1967), sendo denominado de *Gymnoascus demonbreunii*, mas posteriormente suspeitou-se ser esta forma um contaminante queratinofílico de solo. Coube a Kwon-Chung (1972) a demonstração da fase sexuada do *H. capsulatum*, a qual denominou de *Emmonsia capsulata*, pertencente ao filo Ascomycota, classe Plectomycetes e família Gymnoascaceae. McGinnis e Katz (1979), reestudando esta forma sexuada, concluíram que *E. capsulata* deveria ser transferida para o gênero *Ajellomyces*, com denominação atual de *Ajellomyces capsulatus*, pertencente a família Onygenaceae (Kwon-Chung, 1973). Constatou-se, ainda, que o agente da histoplasmose africana, *Histoplasma duboisii*, apresenta a mesma forma de reprodução sexuada do *H. capsulatum*, com o qual faz cruzamento genético (Kwon-Chung, 1975) pertencendo ambos a uma única espécie, a qual admiti-se possuir duas variedades anamórficas: *H. capsulatum* var. *capsulatum*, agente da histoplasmose capsulata ou clássica, e *H. capsulatum* var. *duboisii*, agente da histoplasmose africana (Chandler, 1980). Atualmente, com base na análise de seis genes: 18S *rRNA*, 28S *rRNA*, 5.8S *rRNA*, *EF1 α* (fator de alongação-1 α), *RPB1* e *RPB2* (subunidades da RNA polimerase II), se têm proposto que a espécie *H. capsulatum* seja classificada no *Phylum Ascomycota*, dentro da classe Eurotiomycetes, ordem Onygenales, famílias Onygenaceae e/ou Ajellomycetaceae (James et al., 2006; Hibbett et al., 2007; Hoog et al., 2007)

Várias análises filogenéticas por técnicas moleculares da ordem Onygenales têm fornecido dados sobre a relação taxonômica entre os fungos dimórficos. Estudos iniciais baseados em genes codificadores da subunidade 18S do RNA ribossomal demonstraram uma relação filogenética muito próxima entre o *H. capsulatum* e o *B. dermatitidis* utilizando três métodos moleculares, seqüenciamento de DNA ribossômico, avaliação dos perfis do DNA nuclear ("*melting profiles*") e hibridização DNA/DNA, com construção de uma árvore filogenética para esta ordem, onde um ramo abrange somente o gênero *Histoplasma*, separando-o dos outros agentes das micoses sistêmicas (Gueho et al., 1997).

Um estudo de 46 amostras do gênero *Histoplasma*, baseado no seqüenciamento de quatro genes codificadores das proteínas ARF, H ANTI, OLE e TUB sugerem que *H. capsulatum* poderia ser considerado como 6 espécies ao invés de 3 variedades (Kasuga et al., 1999).

3. FATORES DE VIRULÊNCIA

Seres humanos estão constantemente expostos a vários microrganismos, entre eles os fungos, mas somente um número limitado entre os últimos pode causar doença. Vários fatores de virulência responsáveis pela sobrevivência destes microrganismos em parasitismo têm sido descritos na literatura especializada, sendo alguns bem determinados, como parede celular e estruturas complementares responsáveis pela adesão aos tecidos dos hospedeiros, a produção de fosfolipases, proteases e elastases capazes de causar dano tecidual e quebrar as defesas do hospedeiro; a produção de catalases, enzimas que decompõem H_2O_2 em H_2O e O_2 atuando contra os mecanismos oxidativos, tornando a fagocitose por células efectoras dos hospedeiros mais eficiente (Brummer e Stevens, 1984). Além disso, a capacidade de fazer “switch” a várias vias metabólicas fundamentais para a sobrevivência intracelular e a termotolerância (capacidade de crescer a $37^\circ C$) é pré-requisito para a disseminação hematogênica e são fatores fundamentais. Fungos dimórficos, entre eles o *H. capsulatum*, fazem morfogênese conforme o ambiente em que se encontram (Ignatov e Keath, 2002).

3.1 Determinantes moleculares da virulência

Em face da vasta gama de defesas pulmonares, patógenos fúngicos dimórficos são marcadamente efetivos no estabelecimento de infecção e causadores de doenças, delineando assim uma necessidade de um entendimento maior dos mecanismos moleculares da patogênese denominados fatores de virulência.

Para os fungos dimórficos, um fator de virulência pode ser funcionalmente definido como um efeito na sua sobrevivência e crescimento no interior do hospedeiro, sendo também afetados por fatores responsáveis pela transição da fase saprofítica para a fase parasitária (Woods et al., 2002).

3.2 Fatores de virulência comprovados

H. capsulatum na fase leveduriforme sobrevivem e se replicam no interior de macrófago hospedeiro, necessitando de mecanismos de virulência projetados para controlar as defesas de macrófagos. Até o presente, os aspectos moleculares que norteiam esta característica são motivos de estudos de numerosos laboratórios.

3.2.1 CBP “Calcium Binding Protein”

O primeiro fator de virulência demonstrado para *H. capsulatum* é uma proteína ligante de cálcio e seu gene codificante *CBPI* (Batanghari & Goldman, 1997) A demonstração do papel de CBP na patogênese da histoplasmose representa o clímax de muitos anos de desenvolvimento de ferramentas moleculares, incluindo um sistema de transformação eficiente, marcadores de seleção e plasmídeos teloméricos (Magrini e Goldman, 2001). Estas ferramentas permitiram a realização de experimentos de interrupção gênica com a deleção do locus *CBPI* em 66% dos isolados examinados, demonstrando que a proteína CBP favorece a sobrevivência do fungo no interior de células fagocíticas (Sebghati et al., 2000).

3.2.2 $\alpha(1,3)$ -glucana

Estudos de depleção de gene codificador de $\alpha(1,3)$ -glucana também demonstraram que *H. capsulatum* requer $\alpha(1,3)$ -glucana, um polisacáride de parede celular comum para a maioria dos fungos de importância médica, como fator de virulência. Este fator foi evidenciado por Rappleye e colaboradores (2004) após desenvolverem um sistema para interferência de RNA (RNAi) em *Histoplasma* com inibição da síntese de $\alpha(1,3)$ -glucana (AGS1). Redução da atividade de AGS1 por RNAi ou substituição alélica tradicional reduziu substancialmente a colonização pulmonar por *H. capsulatum* e a habilidade de proliferar e destruir macrófagos em cultura. $\alpha(1,3)$ -glucana parece ser um determinante de virulência designado especificamente para sobrevivência e replicação no pulmão porque a

perda de $\alpha(1,3)$ glucana não prejudica o crescimento de *H. capsulatum in vitro*. Perda espontânea de $\alpha(1,3)$ -glucana em outros fungos dimórficos também está correlacionada com a diminuição da virulência nestes microrganismos, sugerindo que este pode ser um mecanismo conservado de patogenicidade dos fungos (San-Blas et al., 1977; Klimpel e Goldman, 1988; Hogan e Klein, 1994). Como β -glucanas são componentes essenciais da parede celular, $\alpha(1,3)$ glucana pode contribuir para sobrevivência da levedura através da proteção da camada de β -glucan da detecção por células do hospedeiro. Consistente com isto, frações de parede de *Histoplasma* e *Paracoccidioides* contendo β -glucan promovem recrutamento de células e estimulam produção de citocinas pro inflamatória incluindo TNF α (Figueiredo et al., 1993; Silva et al., 1994; Medeiros et al., 1999; Anjos et al., 2002; Medeiros et al., 2004).

3.2.2 Candidatos a fatores de virulência

Moléculas extracelulares e de superfície também atuam na fase leveduriforme de *Histoplasma* funcionando potencialmente em sua virulência. Enquanto ligada à superfície da célula, a HSP60 “Heat Shock Protein” atua como suporte para anexar a levedura ao macrófago hospedeiro; $\alpha(1,3)$ glucana um polissacáride, protege as β -glucanas da parede celular evitando a detecção pelo receptor de macrófago. Em algumas cepas de *Histoplasma*, YPS3 “Yeast Specific Phage” promove disseminação da levedura no sítio de infecção pulmonar (Holbrook e Rappleye, 2008).

Ainda pouco se sabe sobre os genes necessários para a replicação intracelular no hospedeiro. A habilidade para obtenção de ferro do hospedeiro é importante para a virulência de muitos patógenos. Foi investigada também a função da aquisição de ferro na patogênese do *H. capsulatum* e foi verificado que o *Histoplasma* necessita de *SID1*, um membro de um grupo de gene siderósforos regulado por ferro, para colonização do hospedeiro. *H. capsulatum* adquire ferro através da ação da enzima férrico redutase e produção de siderósforos, mas os genes responsáveis por estas atividades e sua função na virulência ainda não foram determinados. Os grupos de genes estudados incluíam (*SID1*) gene que codifica a enzima L-ornithine monooxygenase, catalizadora do primeiro passo na produção de siderósforos em outros fungos. Disrupção no gene *SID1* resultou em pobre crescimento sob baixa condição de ferro, bem como a perda da produção de siderósforos.

Cepas deficientes em *SIDI* mostraram um defeito significativo no crescimento em macrófagos murinos derivados de medula óssea e conseqüente atenuação da infecção. Estes dados indicaram que *H. capsulatum* utiliza sideróforos, além de outros mecanismos de aquisição ferro para crescimento durante o processo infeccioso (Hwang et al., 2008).

Genes adicionais e produtos de gene com provável papel na patogenicidade de fungos dimórficos foram identificados por uma variedade de técnicas biológicas, bioquímicas e moleculares. Com o desenvolvimento e adaptação de novas ferramentas moleculares deveriam ser avaliadas as contribuições de tais genes como candidatos a virulência do fungo. Muitos destes candidatos foram identificados pela análise das características de infecção ou através de estudos de expressão para catalogar genes expressos especificamente na fase parasitária. Portanto, a análise de expressão de genes nas diferentes fases do ciclo evolutivo dos fungos pode ser valiosa como um primeiro passo na descoberta de genes de virulência.

3.3.1 Melanina

As melaninas são polímeros hidrofóbicos que conferem proteção aos fungos contra condições adversas à sua sobrevivência tais como fagócitos e radiações ionizantes e ainda, pode proteger o patógeno contra a ação de agentes antifúngicos (Gomez e Nosanchuk, 2003; Ikeda et al., 2003). A produção de melanina é uma característica amplamente utilizada para a identificação de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* em laboratório. Este pigmento é revelado pela cor escura (marrom a preto) das colônias, quando o fungo cresce em meios que contêm compostos fenólicos ou difenólicos na sua composição, como ágar semente de girassol (*Helianthus annuus*), ágar alpiste (*Guizotia abyssinica*), ágar batata e cenoura, e meios quimicamente definidos, como ágar L-dopa e ágar ácido caféico. A enzima fenol-oxidase ou lacase presente na levedura atua sobre esses substratos, gerando quinonas como produtos, que sofrem um processo de autopolimerização, transformando-se em melanina. Esta fica retida na parede celular do fungo, sendo responsável pela expressão do pigmento escuro mostrado pelas colônias (Casadevall et al., 2000)

Entre os fungos que tem a capacidade de produzir melanina durante a infecção estão os dimórficos *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *P. brasiliensis*, *Sporothrix schenckii*

(Gomez et al., 2001; Nosanchuk et al., 2002; Morris-Jones et al., 2003; Nosanchuk et al., 2004). Melanização de leveduras de *P. brasiliensis* reduz a fagocitose por macrófagos em cultivo (da Silva et al., 2006).

No *H. capsulatum*, quando crescido em meio quimicamente definido ocorre a produção de conídios e leveduras escuras. Na presença de -3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) ou (-)-epinefrina produz células melanizadas, sendo estas ainda reconhecidas em ensaios utilizando soros monoclonais e policlonais, indicando que a melanina pode ter um papel muito importante na patogenia da histoplasmose (Nosanchuk et al., 2002).

3.3.2 Dimorfismo

O dimorfismo é um aspecto importante na patogênese, pois a forma filamentosa é infecciosa, mas é a forma leveduriforme que sobrevive intracelularmente e causa doença (Nemecek et al., 2006). A mudança de temperatura de 25°C para 37°C é estímulo suficiente para o dimorfismo, mas outras condições ambientais como presença de cisteína e cAMP pode influenciar na morfogênese de *H. capsulatum*. Este dimorfismo é essencial para a virulência, como evidenciado em culturas mantidas a 25°C tratadas quimicamente, incapazes de fazerem a conversão para a fase leveduriforme que se tornam avirulentas (Medoff et al., 1986b).

O dimorfismo é um dos sistemas mais bem estudados na regulação gênica de *H. capsulatum* e sua patogênese, com reflexão na mudança em sua morfologia e no seu estilo de vida. O dimorfismo que regula a cinase *DRK1* e o *RYP1* homólogo de *WOR1* “White–Opaque Regulator 1” de *Histoplasma* modula a transição induzida pela temperatura. Os genes expressos como parte deste regulon influenciam a interação parasito-hospedeiro favorecendo a virulência do *Histoplasma* (Holbrook & Rappleye, 2008)

3.3.3 Defesas oxidativas

Um dos mais importantes fatores de virulência em fungos patogênicos é a capacidade de resistir a **reativos oxigenados (ROS)** e aos **reativos de nitrogênio (RNS)**. O envolvimento de mecanismos oxidativos na patogênese de fungos tem sido demonstrado

em ensaios *in vitro*, bem como o papel da catalase na inibição da fagocitose por células efectoras dos hospedeiros contra alguns fungos (Brummer e Stevens, 1995).

Catalases são importantes na proteção contra peróxidos. Foram descritas três catalases diferentes em *H. capsulatum* e cada gene destas catalase está presente em uma única cópia codificando catalases CATA, CATB, CATP (Johnson et al., 2002). Durante o crescimento de *H. capsulatum* CATB, CATP são constitutivamente expressas. Já CATA está presente na fase filamentosa e ou quando exposta a H₂O₂ (Johnson et al., 2002). Tem sido sugerido que CATP pode facilitar a detoxificação ao peróxido de hidrogênio durante o metabolismo (Johnson et al., 2002). Recentemente, nosso grupo sugeriu que a atividade de catalase do *H. capsulatum* seja devida principalmente ao antígeno M (CATB) uma vez que este se localiza na superfície celular em ambas as fases do ciclo evolutivo sendo responsável pela evasão ao stress oxidativo, permitindo a conversão do fungo da fase miceliana para a leveduriforme (Guimaraes et al., 2009)

Entretanto, estas hipóteses devem ser confirmadas em futuros experimentos utilizando ferramentas de disrupção gênica.

Mecanismos de defesa de *H. capsulatum* a RNS são identificados como uma oxidase alternativa, as quais são resistentes ao óxido nítrico e podem contribuir para a resistência a RNS. O gene *AOX1* de *H. capsulatum* codifica uma oxidase alternativa como evidenciado por experimentos de expressão heteróloga em *Saccharomyces cerevisiae* (Johnson et al., 2003). A expressão de *AOX1* em *H. capsulatum* aumenta a resposta ao RNS assim como ao stress por H₂O₂ (Nittler et al., 2005). *H. capsulatum* também expressa NOR1 (óxido nítrico redutase P450) o qual é induzida em leveduras expostas a RNS (Nittler e cols., 2005)

3.3.4 Adesinas – HSP60

Fungos patogênicos, como a maioria dos microrganismos, possuem prováveis adesinas específicas que os permitem a adesão à célula hospedeira ou matrix extracelular. No caso de patógenos intracelulares, adesinas permitem a entrada ideal em células hospedeiras que poderiam conduzir a ativação de defesas dos fagócitos.

Leveduras e conídios de *Histoplasma* se ligam a macrófago via CR3 (CD11/CD18) (Bullock e Wright, 1987; Newman et al., 1990). Usando CR3 em extrato de parede celular de *Histoplasma*, Long e colaboradores identificaram HSP60 (Proteína de choque térmico com massa molecular de aproximadamente 60 kDa) como um ligante e potencial adesina (Long et al., 2003). HSP60 poderia ser detectada na superfície da célula da levedura sendo que adição exógena de HSP60 diminuiu a ligação de *Histoplasma* ao macrófago.

HSP60 são amplamente distribuídas e são moléculas imunogênicas altamente conservadas que atuam como chaperonas e aumentam a sobrevivência celular sob condições de stress fisiológico. O fungo *H. capsulatum* exibe uma HSP60 em sua superfície celular que é o alvo chave da resposta imune celular durante histoplasmose, e imunização com esta proteína é protetiva. Entretanto a função da resposta imune humoral para HSP60 não foi completamente elucidada. Recentemente foram produzidos anticorpos monoclonais, isotipo imunoglobulina G (IgG), para HSP60 do *H. capsulatum*. Vacinação com estes monoclonais IgG1 e IgG2a prolongou significativamente a sobrevivência de camundongos infectados com *H. capsulatum*. O monoclonal protetor reduziu a sobrevivência fúngica intracelular e aumentou a fusão do fagolisossomo do macrófago *in vitro*. Exame histológico de camundongos infectados mostraram que monoclonais protetivos reduziram a carga fúngica e danos tissulares. Órgãos de animais infectados tratados tiveram aumento significativo dos níveis de interleucina 2 (IL-2), IL-12 e TNF α e diminuição dos níveis de IL-4 e IL-10. Conseqüentemente, monoclonais IgG1 e IgG2a para Hsp60 podem modificar a patogênese de *H. capsulatum* em parte alterando o destino intracelular do fungo e induzindo a produção de citocinas de perfil T helper 1 (Th1) (Guimaraes et al., 2009).

4. TIPAGEM MOLECULAR

4.1 Abordagem fenotípica

Estudos pioneiros baseados em abordagens fenotípicas foram desenvolvidos visando um melhor entendimento da biologia do *H. capsulatum* (Kaufman e Kaplan, 1961; Kaufman e Blumer, 1966; Reiss et al., 1986). Similar a parede celular de *B. dermatitides* e *P. brasiliensis*, a parede celular da fase leveduriforme do *H. capsulatum* contém α -glucana,

e a parede celular da fase miceliana contém β -glucana. A parede celular da levedura é uma estrutura laminar que tem aproximadamente 100 nm em espessura, mas a parede da hifa é de aproximadamente 30 nm de espessura. Com base em estudos de microscopia eletrônica, tem-se proposto um modelo estrutural de parede celular da forma leveduriforme do *H. capsulatum* onde galactomananas formam uma camada externa, α -1,3 glucanas se apresentam como fibrilas curtas embebidas em proteínas, formando a camada intermediária, e a camada interna é composta por rede fibrilar de quitina (Reiss et al., 1986). A principal hexose nas formas filamentosas se apresenta como polímeros β -1,3 glucana, diferenciando a composição da parede celular nas duas formas evolutivas deste fungo.

A classificação do *H. capsulatum* em quimiotipos e sorotipos também foi baseada na composição da parede celular deste fungo. O quimiotipo 1 apresenta elevado conteúdo de quitina, níveis raramente detectáveis de α -1,3 glucana e alta concentração de proteínas quando comparados ao quimiotipo 2 que apresenta reduzida taxa de quitina e alta concentração de glicose como polímero α -1,3 glucana (Domer et al., 1967; Domer, 1971). Quatro fatores e cinco sorotipos (1,2; 1,4; 1,2,3; 1,2,4; 1,2,3,4) foram demonstrados, através de reações de imunofluorescência e adsorção. Os fatores 1 e 4 são compartilhados com o *B. dermatitidis* e provavelmente estão associados a galactomanana, enquanto que os outros são específicos para o *H. capsulatum* (Kaufman e Kaplan, 1961; Kaufman e Blumer, 1966).

Ainda que os métodos fenotípicos, como a sensibilidade a antifúngicos e a eletroforese de enzimas multilocus (MLEE), tenham sido utilizados para classificar alguns fungos como *Candida* e *Cryptococcus*, no modelo *Histoplasma* foram menos utilizados.

Gaur e colaboradores (1981) foram os pioneiros na classificação fenotípica do *H. capsulatum*, ao introduzir o estudo de isoenzimas com o propósito de analisar sua variação em 369 isolados obtidos de solos coletados em quatro sítios dos Estados Unidos da América (EUA), dois localizados em Missouri e os restantes em Kentucky e Michigan. Com base na frequência de alelos dos isolados obtidos nas quatro áreas, os autores encontraram uma grande variação nos padrões enzimáticos. Posteriormente, uma importante diversidade fenotípica foi revelada pelo método de isoenzimas utilizando seis

enzimas em isolados de *H. capsulatum* procedente dos EUA obtidos a partir de excretas de aves (Hamrick et al., 1986).

Este método geralmente fornece ampla informação genética para diversas aplicações, sua técnica é relativamente barata e acessível. Embora em número limitado, vários locos isoenzimáticos podem ser analisados rápida e simultaneamente. Por isso, mesmo hoje, com técnicas mais modernas, as isoenzimas continuam sendo uma classe de marcadores muito útil para análises genéticas. Alelos isoenzimáticos são co-dominantes, isto é, genótipos heterozigotos e homozigotos de um determinado loco são facilmente identificados, permitindo estimar parâmetros tais como frequências genótípicas e alélicas e a partir destes, coeficientes de diversidade gênica.

4.2 Abordagem genotípica

Atualmente, os métodos moleculares têm permitido estabelecer marcadores que facilitem a separação e caracterização genética dos diferentes indivíduos com base no polimorfismo do DNA. Estes marcadores têm sido utilizados para determinar a variabilidade genética de muitos fungos, para classificar isolados da mesma espécie, além de estudar a origem e evolução. Além disso, também tem sido utilizado em análises epidemiológicas ou em provas que facilitem a elaboração de mapas genéticos e a melhor identificação de isolados.

4.2.1 Sondas para *H. capsulatum*

A primeira geração de sondas moleculares com aplicação em estudos epidemiológicos foram obtidas de seqüências específicas de DNA mitocondrial (mtDNA) e ribossomal (rDNA) da fase leveduriforme de uma cepa virulenta (G217B) (Spitzer et al., 1989). Posteriormente, Keath e colaboradores (1989b) clonaram e caracterizaram genes com expressão especificamente na fase leveduriforme da cepa G217-B. O produto da clonagem do gene *YPS-3* demonstrou ser importante na classificação deste fungo, já que a expressão variável deste gene foi observada em algumas cepas de *H. capsulatum* que diferiam em termotolerância e virulência (Medoff et al., 1986a; Keath et al., 1989a). Em

1996, Weaver e colaboradores isolaram um cDNA de 519 pares de base (pb) do gene *YPS-3* e os fusionaram ao gene *TRP-E* de *Escherichia coli*, construindo um peptídeo híbrido e o utilizaram na produção de um anticorpo monoclonal (mAb 7.1) que foi utilizado para a imunolocalização da proteína codificada pelo gene *YPS-3*, que se encontra na parede da célula fúngica e possivelmente está envolvido no processo de sinalização e adesão do fungo a célula hospedeira (Weaver et al., 1996).

Outras sondas foram desenvolvidas posteriormente para aplicação comercial na identificação molecular do *H. capsulatum* (Keath et al., 1989a; Sandhu et al., 1995).

4.2.2. Eletroforese em Gel de Campo Pulsado

O DNA cromossomal de quatro cepas de *H. capsulatum* foi analisado pela eletroforese em gel de campo elétrico homogêneo (CHEF) e de campo invertido (FIGE) (Steele et al., 1989). Entre os isolados incluídos neste estudo, a denominada cepa “Down” obtida de uma úlcera vaginal de uma paciente com histoplasmose disseminada (Gass e Kobayashi, 1969) e que tinha uma característica de ser avirulenta para camundongos, foi a que apresentou maior número de cromossomos (sete). O mesmo grupo também encontrou variabilidade na mobilidade das bandas de outras cepas estudadas o que as diferenciava da cepa “Down”, apresentando 3 a 4 cromossomos. Ainda que este trabalho tenha se orientado na identificação do cariótipo do fungo, os métodos empregados poderiam ser considerados como úteis para a tipagem molecular de cepas tipo “Down”.

Recentemente Romero-Martinez (2004) estudou a variabilidade cromossômica intraespecífica em fungos patogênicos humanos, especialmente em *H. capsulatum*. O estudo envolvia a ploidia, cariótipo e polimorfismo do comprimento de cromossomo (CLP) de fungos patogênicos humanos com ênfase no *H. capsulatum*. Atualmente, estão sendo usados sistemas diferentes de eletroforese para determinar eletrocariótipo do fungo (EK). Através da cinética de renaturação e reconstrução genômica em cepas *H. capsulatum* (G-186AS e Down); tamanhos do genoma estimados entre 23 e 32 Mb foram determinados para ambas as cepas, respectivamente. O estado de haploidia foi proposto para ambas as cepas, embora aneuploidia foi sugerida para cepa Down. A presença de seis a sete cromossomos nas cepas Down (baixa virulência) e de quatro cromossomos na cepa de alta virulência G-186B foram demonstradas através de eletroforese em gel de campo elétrico

homogêneo (CHEF), eletroforese em gel de campo invertido (FIGE) e *Southern blot* usando diferentes sondas. O uso destes métodos nas três cepas de referência principais de *H. capsulatum* (G-217B e Down dos Estados Unidos de América, G-186B do Panamá) revelou distintos tamanhos de cromossomo, de 0.5 a 5.7 Mb, com CLP associado ao tamanho de cromossomos e mobilidade. Recentemente, 19 *H. capsulatum* isolados na Latino-América e a cepa G-186B foram analisadas por CHEF e cinco a sete cromossomos com 1.1 a 11.2 Mb foram revelados, sugerindo novamente CLP em *H. capsulatum*. Porém, mais estudos são necessários para entender os mecanismos que controlam variabilidade de ploidia e elucidar o polimorfismo de EKs em *H. capsulatum* e sua relação com o fenótipo isolado (Romero-Martinez et al., 2004).

4.2.3 Polimorfismo dos fragmentos gerados por endonuclease de restrição (RFLP) e análises de DNA cromossomal por *Southern blot*

O método de RFLP foi aplicado por Vincent e colaboradores (1986) em estudos epidemiológicos de *H. capsulatum*. Vinte e um *H. capsulatum* isolados de humanos e de animais foram agrupados em três classes, com base no polimorfismo de seus mtDNA e rDNA. Cepa Down foi classificada como Classe 1. Classe 2 foi formada por 14 amostras de *H. capsulatum* var. *capsulatum* isolados da América do Norte e dois *H. capsulatum* var. *duboisii* isolados da África; a Classe 3 incluiu 4 isolados das Américas Central e do Sul.

Spitzer e colaboradores ampliaram os estudos de tipagem de cepas de *H. capsulatum* através de RFLP de seus mtDNA e rDNA, agrupando isolados clínicos e de solo em quatro classes (Spitzer et al., 1989). As Classes 1 e 3 corresponderam à classificação de Vincent e colaboradores (1986), enquanto que os isolados de solo, procedentes de sete sítios geográficos diferentes nos EUA, foram indistinguíveis da maioria dos *H. capsulatum* provenientes de pacientes com histoplasmose e foram incluídas na Classe 2, (Spitzer et al., 1989). Somente um isolado de solo da Flórida, representou a Classe 4.

Estudo posterior de isolados de *H. capsulatum* procedentes de pacientes com histoplasmose disseminada associada a AIDS na cidade de St. Louis, Missouri onde a cepa Down foi isolada há muitos anos atrás (Gass e Kobayashi, 1969), demonstrou padrões de RFLP do mtDNA hibridizados com sonda yps-3 idênticos aos observados na cepa Down

(Classe 1), fenômeno confirmado pelas características fenotípicas destes isolados, onde como na cepa Down, também foram incapazes de crescer a 40°C. Por outro lado, as amostras de *H. capsulatum* isolados de histoplasmose disseminada ou pulmonar crônica em pacientes com comprometimento do seu sistema imune, mas não portadores do HIV, foram agrupados na Classe 2, onde se incluem a maioria dos isolados clínicos de diferentes regiões dos EUA.

Em 1992, Keath e colaboradores ampliaram o conhecimento em torno da epidemiologia molecular da histoplasmose em indivíduos imunocomprometidos. Isolados de um surto epidêmico de histoplasmose em pacientes com AIDS ocorrido em Nova York, EUA, onde a histoplasmose não é endêmica, foram estudados com o objetivo de determinar se a histoplasmose destes pacientes resultava da reativação endógena de uma infecção previamente adquirida. Os autores utilizaram para classificar os isolados, os padrões de RFLP do DNA genômico e do Southern blot gerado por duas sondas para *H. capsulatum*, uma de mtDNA e outra de um fragmento de 1.85kb obtido por digestão do gene *YPS-3* com a enzima *HindIII*. Tantos os isolados obtidos de pacientes com AIDS bem como os procedentes de outras fontes foram agrupados em diferentes classes. Cinco amostras de *H. capsulatum* isolados de pacientes com AIDS residentes em Nova York e procedentes de Porto Rico foram agrupados na Classe 5, com base no polimorfismo revelado pela sonda *yps-3*. Estes isolados originaram dois padrões diferentes de mtDNA designados como Subclasses 5b e 5c. Além disso, um isolado de um paciente residente em Missouri e procedente da América Central foi sub-classificado como 5d, enquanto que os isolados do Panamá foram também incluídos na Classe 5, mas mostraram um perfil distinto de mtDNA, que constituíram a subclasse 5a (Keath et al., 1992). Este estudo permitiu ampliar as classificações anteriores (Vincent et al., 1986; Spitzer et al., 1989), inserindo também uma sexta classe que foi obtida de um paciente com AIDS do Panamá que tinha um perfil único. Além disso, sugeriu a existência da reativação endógena em casos de histoplasmose associada a AIDS diagnosticadas em áreas não endêmicas.

4.2.4 Reação em cadeia de polimerase utilizando “primers” arbitrários – (RAPD)

Devido às limitações encontradas no método RFLP, como a baixa sensibilidade na distinção de isolados individuais, e a necessidade de preparar DNA com alto grau de pureza, o método de polimorfismo do DNA amplificado randomicamente pela reação em cadeia de polimerase (RAPD) foi desenvolvido para o sistema *H. capsulatum* (Kersulyte et al., 1992; Woods et al., 1993). Este método demonstrou ser mais sensível e de fácil execução, já que utiliza menores concentrações de DNA não necessariamente puro. Os autores puderam selecionar seqüências nucleotídicas iniciadoras (“primers”) que foram úteis para discriminar *H. capsulatum* dentro de uma mesma classe e obter resultados reproduzíveis. Vinte e nove isolados clínicos dos fungos agrupados na classe 2 apresentaram maior diversidade por RAPD que a demonstrada por RFLP.

A análise por RAPD de 12 isolados de *H. capsulatum* de pacientes da Tailândia e um dos Estados Unidos utilizando três “primers” dividiu os isolados entre 2 a 4 grupos genotípicos, sendo os procedentes da Tailândia muito similares entre si, e claramente diferentes do isolado da América do Norte incluído no estudo (Poonwan et al., 1998). Além do mais, os autores identificaram um fragmento de DNA comum de 700 pares de bases (pb), o qual foi seqüenciado e possibilitou o desenho de “primers” para serem usados em uma reação de polimerase em cadeia, onde se observou 100% de efetividade na identificação de *H. capsulatum* de origem tailandesa.

Diversos estudos utilizando RAPD têm sido desenvolvidos no México com o intuito de se conhecer a diversidade/similaridade dos isolados daquele país. Isolados clínicos de *H. capsulatum* obtidos de pacientes com AIDS, e que referiam ter residência definida, foram caracterizados (Reyes-Montes et al., 1998). Os resultados da genotipagem demonstraram 94% de similaridade entre os incluídos nesta amostragem. Estes mesmos autores analisaram novos isolados de *H. capsulatum* obtidos de pacientes mexicanos com histoplasmose associada a AIDS, comparando-os com isolados de casos clínicos da Guatemala, Colômbia, Panamá e Estados Unidos, assim como com isolados de diferentes fontes na natureza procedente do México. Os perfis genotípicos, obtidos por RAPD, permitiram agrupar a maioria dos isolados clínicos procedentes do México em um único grupo. Este método demonstrou que os isolados de pacientes mexicanos com histoplasmose associada a AIDS

formavam um grupo muito relacionado e independente de sua origem geográfica, mas mesmo assim, RAPD ainda detectou diversidade entre alguns isolados, o que não foi revelado por métodos fenotípicos tais como o perfil de eletrotipos determinados por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e a presença de proteínas antigênicas específicas reconhecidas por soro imune em imunoblot (Reyes-Montes et al., 1999). Em outro estudo, *H. capsulatum* isolados de morcegos infectados em diferentes regiões do país foram genotipados por RAPD onde se observou um perfil genotípico comum na maioria dos isolados, sugerindo que o mesmo poderia funcionar como marcador fúngico para a infecção de morcegos e para definir as áreas geográficas de dispersão do fungo (Taylor et al., 2000).

No Brasil, em estudos pioneiros, utilizando a técnica de RAPD, foi verificada a relação dos perfis genotípicos de *H. capsulatum* isolados no estado do Rio de Janeiro, oriundos de solos e animais capturados em uma mesma região geográfica (Muniz et al., 2001). Estes isolados foram agrupados no mesmo subtipo clonal, sugerindo que estes micronichos poderiam estar atuando como fonte de infecção aos animais e a população local. Neste mesmo estudo, todos os isolados provenientes de pacientes HIV+, em diferentes coletas de espécimes clínicos, apresentaram os mesmos genótipos e possivelmente estes indivíduos foram parasitados por uma única população genética. Os perfis genotípicos gerados pela reação em cadeia de polimerase, dos isolados previamente classificados nos EUA, mostraram grande polimorfismo quando comparados com os isolados do estado do Rio de Janeiro, sugerindo que a proveniência de diferentes regiões geográficas tenha influência na diversidade genética (Muniz et al., 2001).

Parâmetros demográficos e clínicos de pacientes com AIDS e histoplasmose de um estado brasileiro foram comparados com uma população semelhante nos EUA (Karimi et al., 2002). Neste estudo, a tipagem molecular do gene nuclear *YPS-3* revelou que isolados brasileiros se classificavam entre os sul americanos Classe 5 e 6, e o RAPD mostrou 18 perfis genéticos distintos em 20 isolados. Lesões de pele na histoplasmose são mais associadas com isolados Classe 5 e 6 do que com isolados Classe 2. Com isso, sugeriu-se que diferenças genéticas poderiam estar associadas a manifestações clínicas (Karimi et al., 2002).

4.2.5 Seqüenciamento de DNA

Várias são as utilidades desta metodologia, podendo ser aplicada para análises taxonômicas, filogenéticas e de identificação de microrganismos, entre outros. No que se refere ao *H. capsulatum* importantes inferências foram obtidas por essa metodologia. Em estudos objetivando associar intercâmbios genéticos com o ciclo evolutivo do *H. capsulatum*, bem como correlacionar subpopulação com a severidade da doença e/ou estado imunológico do hospedeiro foram desenvolvidos marcadores bialélicos por AP-PCR/RAPD (Reação em cadeia de polimerase utilizando primers arbitrários) e submetidos à análise do polimorfismo na conformação de cadeia simples (SSCP). Bandas polimórficas foram sequenciadas, onde se demonstrou que cada isolado apresentava um genótipo multilocus único, sugerindo recombinação freqüente dentro da população de *H. capsulatum* (Carter et al., 1996). Posteriormente, os mesmos autores utilizaram 11 marcadores bialélicos obtidos mediante a análise de fragmentos alélicos gerados pela amplificação de seqüência polimórfica do DNA com oligonucleotídeos específicos (Carter et al., 1997). Estes marcadores foram utilizados na análise da diversidade genética entre populações de *H. capsulatum* procedentes dos EUA e de outros países, onde se observou que no caso de cepas isoladas nos EUA estes marcadores mostraram polimorfismos ao serem digeridos com enzimas de restrição. Simultaneamente, os autores encontraram três marcadores multialélicos que tinham a característica de ser hipervariáveis e, portanto altamente polimórficos, devido à variação no tamanho das seqüências de seus produtos de amplificação. Além disso, apresentavam seqüências repetitivas e conservadas (microsatélites). Estes três marcadores multialélicos foram adequados na tipagem e determinação dos níveis de variação genética de isolamento do fungo, proveniente de regiões de EUA e de outros países (Carter et al., 1997). Até o momento já foram encontrados cinco microsatélites no genoma do *H. capsulatum*, os quais são capazes de discriminar isolados com características muito peculiares (Carter et al., 2001). Este estudo suporta a separação de *H. capsulatum* da América do Norte e Sul como espécies diferentes, o qual tem sido uma proposta sob o ponto de vista filogenético.

Jiang e colaboradores (2000) tiparam 24 isolados de *H. capsulatum* através de variação na seqüência nucleotídica das regiões dos espaços intergênicos transcritos ITS1,

ITS2 e do gene 5.8S rRNA. Neste estudo, 10 diferentes padrões de seqüências designadas como tipos A com representantes A-1, A-2, A-3; B até H, foram encontrados. Doze isolados de Indianápolis se classificaram em quatro tipos diferentes (A-1, A-2, A-3, F) dois de Nova York foram agrupados no tipo G, três de distintas cidades dos EUA no Tipo F, e os restantes se agruparam em tipos diferentes. Neste estudo a cepa "Down" (Classe 1) se agrupou com dois isolados, tipo F, um de Indianápolis e outro de Houston (Classe 2). Baseado nestes resultados os autores sugeriram uma nova classificação de *H. capsulatum* diferente das outras descritas até aquele momento (Jiang et al., 2000).

O seqüenciamento está presente de maneira expressiva na validação de técnicas como PCR aninhada (Nested-PCR) direcionadas ao diagnóstico da histoplasmose em espécimes clínicos. Um produto de amplificação (Nested-PCR) de *H. capsulatum* direcionado ao gene codificador de uma proteína fúngica de 100 kDa foi detectada em 20 biopsias com estruturas compatíveis com *H. capsulatum* na análise histopatológica e em nenhuma das amostras controle. O seqüenciamento destes produtos de amplificação (210 pb) revelou que todos eram idênticos às seqüências de *H. capsulatum* depositadas em bancos de dados. Em contraste, o método de nested PCR direcionado ao gene 18S do rRNA fúngico amplificou produtos em 26 amostras positivas histopatologicamente, mas também em 18 biopsias negativas microscopicamente. Contudo, o sequenciamento revelou que somente 20 destes 44 produtos de PCR (231 pb) foram idênticos a seqüência de *H. capsulatum*. As 24 seqüências restantes foram homólogas a vários Euscomycetes. Estes produtos de PCR foram detectados somente em tecidos possivelmente colonizados por fungos não patogênicos, causando ampliações não específicas. O limite de detecção de ambos os nested-PCR para *H. capsulatum* foi de 1 a 5 células fúngicas por amostra (Bialek et al., 2002).

Além de propostas voltadas à análise de seqüências que possam ser utilizadas no diagnóstico, o sequenciamento possibilita a concretização de estudos revolucionários voltados à análise filogenética permitindo sugerir propostas inovadoras. Até recentemente, acreditava-se que *H. capsulatum* abrigava 3 variedades, variedade *capsulatum* (um patógeno do novo mundo), var. *duboisii* (um patógeno humano africano) e var *farciminosum* (um patógeno de animais do velho mundo), as quais eram responsáveis por manifestações clínicas diferentes e também por sua distribuição geográfica. A relação

filogenética de 137 representantes das três variedades de 6 continentes usando variação na seqüência de DNA de genes codificadores de 4 (quatro) proteínas independentes foram analisadas. Pelo menos 8 (oito) clados foram identificados: (i) Clado Norte americano classe 1; (ii) Clado Norte americano classe 2; (iii) Clado Latino americano grupo A (iv) Clado Latino americano grupo B; (v) Clado Australiano; (vi) Clado Netherlands (Indonesian?); (vii) Clado Eurásia; e (viii) Clado Africano. Sete dos oitos ramos filogenéticos representaram grupos geneticamente isolados que poderiam ser reconhecidos como espécies filogenéticas. A única exceção foi o clado da Eurásia o qual foi classificado dentro do ramo latino americano grupo A. *H. capsulatum* var. *capsulatum* distintos foram encontrados em todos os oitos clados. O clado Africano incluíram todos os *H. capsulatum* var. *duboisii* bem como as outras variedades. Os 13 isolados, da variedade *farcinosum*, estavam distribuídos entre as 3 espécies filogenéticas. Estes achados sugerem que as três variedades de *Histoplasma* são filogeneticamente sem sentido. Em vez disso, deve-se reconhecer a existência de populações geneticamente distintas ou espécies filogenética. Combinando a média de substituições dos genes codificadores com a filogenia sugeriu-se que a irradiação do *H. capsulatum* começou entre 3 e 13 milhões de anos atrás na América Latina (Kasuga et al., 2003).

A análise utilizada nessa metodologia baseia-se em pontos de mutação, ou simples substituição de base, isto é, um tipo de mutação que causa a substituição de um único nucleotídeo por outro nucleotídeo no material genético, (ADN ou RNA). Pode se categorizar pontos de mutações como segue: (1) Transições: substituição de uma base de purina (A, G) por outra purina ou substituição de uma pirimidina (T, C) com outra pirimidina; (2) Transversão: substituição de uma purina com uma pirimidina ou vice-versa. Comumente as transições ocorrem sem uma ordem de magnitude mais comum que transversões.

Funcionalmente ponto de mutação pode ser caracterizado como mutações nonsense onde codifica para um codon stop que interrompe a produção da proteína; mutações de *missense* codificam um aminoácido diferente e mutações *silent* que codifica para o mesmo ou para um aminoácido diferente, mas sem qualquer mudança funcional na proteína. Pontos de mutações que acontecem em seqüências não codificantes freqüentemente não apresentam conseqüências, embora haja exceções. Se o par de bases estiver em uma

seqüência de um promotor de um gene, então a sua expressão poderá mudar. Também, se a mutação acontecer no sítio de *splicing* de um intron, isto pode interferir com o correto *splicing* do pré-mRNA transcrito.

Às vezes o ponto de mutação se dá através de inserções ou deleções de um único par de bases (que tem mais de um efeito adverso na proteína sintetizada devido ao nucleotídeo ainda sendo lido em triplets, mas em diferentes *frames*: uma mutação chamada uma mutação de *frameshift*).

Os pontos de mutações podem surgir de mutações espontâneas que acontecem durante o processo de replicação do DNA. A taxa de mutação pode ser aumentada através de mitógenos, que podem ser físico, como radiação de raios UV, Radiografias ou calor extremo, ou substância química (moléculas que perdem pares de bases ou rompem a forma helicoidal de DNA). Mitógenos associados com cânceres são frequentemente estudados para aquisição de conhecimento e prevenção do câncer (Watson, 2000).

5. EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

O uso potencial de ferramentas moleculares para estudos epidemiológicos é importante para a compreensão da dinâmica de um microrganismo patogênico na população humana através dos quais torna-se possível o acesso a informações inter e intra específicas, permitindo auxiliar para (i) decifrar a complexa relação entre comensalismo e infecção; (ii) identificar a origem de uma infecção; (iii) monitorar o surgimento de cepas resistentes a antifúngicos; (iv) identificar novos alvos antigênicos para ação de futuras vacinas; e para (v) acessar as relações genéticas (Soll, 2000), que é o especial interesse deste trabalho. Permite também, ajudar na maior compreensão do fungo e seu comportamento e a sua relação com o seu ambiente. Durante a década de 80 as técnicas moleculares complementaram a anatomia, morfologia, embriologia, fisiologia comparativa, incluindo a análise de componentes químicos e principalmente a caracterização de macromoléculas.

O desenvolvimento de marcadores moleculares, os quais são baseados em polimorfismos encontrados em proteínas ou DNA, contribuiu para a pesquisa em várias disciplinas como taxonomia, filogenia e genética. A molécula de DNA tem sido o principal

alvo de estudos quando se necessita de informações a respeito dos polimorfismos, pois a sequência é única para cada indivíduo e essa sequência pode ser explorada para estudo de diversidade genética e correlação entre indivíduos (Weising et al., 1995).

6. RELEVÂNCIA DO ASSUNTO E IMPACTO

A histoplasmose é endêmica em toda América e tem se tornado um sério problema entre hospedeiros imunocomprometidos, principalmente entre os portadores de HIV. Aproximadamente 500.000 novos casos ocorrem anualmente nos EUA, onde 200.000 desenvolvem manifestações clínicas e 4.000 requerem hospitalização devido à gravidade da doença (Cano e Hajjeh, 2001).

A histoplasmose foi descrita em 60 países e o aumento de casos de AIDS tem aumentado a frequência desta infecção fúngica em diversas regiões do globo terrestre. Nos EUA, pacientes infectados pelo vírus HIV, que residem em áreas endêmicas de histoplasmose estão mais propensos a desenvolver histoplasmose disseminada e esta infecção foi utilizada com indicador de AIDS em 446 pacientes em 1992 (Centers for Disease Control and Prevention HIV/AIDS Surveillance Report, Feb 1993: 1-23).

No Brasil, a histoplasmose é uma das micoses sistêmicas mais frequentes, mas sua incidência real é desconhecida. Trabalhos de revisão recentes relataram muitos casos de histoplasmose em diferentes regiões do nosso país, verificando-se um aumento significativo em sua frequência (Fava e Fava Netto, 1998). Isto se deve, provavelmente, ao maior conhecimento dos médicos em relação aos aspectos clínicos e epidemiológicos desta micose, bem como aos avanços obtidos no diagnóstico laboratorial das doenças fúngicas nos últimos anos. Particularmente, em estudos realizados em dois estados brasileiros, Rio de Janeiro (Leimann et al., 2005) e Rio Grande do Sul (Unis et al., 2004), demonstrou-se uma alta associação entre histoplasmose e pacientes com AIDS. Além disso, até o presente foram documentados 161 surtos epidêmicos de histoplasmose ocorridos em diferentes regiões brasileiras, entre os quais 14 ocorreram no estado do Rio de Janeiro (Zancopé-Oliveira et al., 2005 b).

As diferenças genéticas previamente observadas entre *H. capsulatum* isolados de diferentes regiões geográficas do continente americano permitiram especular que genótipos

distintos estão associados com as formas clínicas da enfermidade nas áreas endêmicas presentes na América Central e do Norte bem como no Cone Sul do continente americano. Estudar os genótipos autóctones de *H. capsulatum* nos permitiria conhecer o fluxo das cepas em nossa região e avaliar a introdução de possíveis genótipos exóticos.

Tem sido sugerido que variações genéticas entre isolados fúngicos poderiam influir no desenvolvimento clínico de diversas micoses entre elas a histoplasmose. As diferenças clínicas na histoplasmose entre América do Norte e Brasil alertaram a investigação da infecção experimental com cepas representativas. Foi observado neste estudo que a mortalidade foi mais elevada com cepas latino-americanas, e a patologia do pulmão mostrou grande quantidade de granulomas necrosados e infiltrados neutrofílicos proeminente (Durkin et al., 2004). No estudo de Karimi e colaboradores (2002), parâmetros clínicos e demográficos entre pacientes com histoplasmose associados a AIDS no Brasil e Estados Unidos foram comparados e avaliados utilizando técnicas moleculares demonstrando diferenças entre as duas populações estudadas. Entretanto, novas investigações são necessárias uma vez que as cepas brasileiras incluídas no estudo eram provenientes somente do estado de São Paulo. Para tanto, é nosso principal propósito analisar o possível polimorfismo genético e/ou variabilidade genética de cepas provenientes de diferentes regiões do Brasil com o intuito de contribuir com informações que possam garantir um maior entendimento das várias nuances que norteiam o tema epidemiologia molecular da histoplasmose, de maneira a promover o estabelecimento de estratégia de prevenção e controle da histoplasmose; foco principal de nosso trabalho e linha de pesquisa nos últimos anos.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivos gerais

Devido à natureza eucariótica deste fungo e a enorme complexidade de sua genética demonstrada através do grande polimorfismo cromossômico, é quase impossível uma caracterização genética precisa utilizando-se uma única metodologia. Portanto, nossa intenção é combinar estudos moleculares utilizando várias metodologias: RAPD, M13 DNA fingerprinting, sequenciamento em nível de ácidos nucleicos e análise de expressão gênica, com a finalidade de se estabelecer um perfil mais amplo do *H. capsulatum*.

Nossa proposta permitirá novas contribuições no conhecimento da ecologia do *H. capsulatum* e epidemiologia da histoplasmose no Brasil de maneira a promover novos conhecimentos relacionados à circulação de cepas/linhagens do *H. capsulatum* relacionando-os com as diferentes regiões geográficas.

7.1 Objetivos específicos

1. Avaliar o polimorfismo genético dos isolados de *H. capsulatum* de diferentes origens e áreas geográficas brasileiras.
2. Comparar o perfil genotípico de *H. capsulatum* de estados brasileiros com os previamente obtidos no estado do Rio de Janeiro.
3. Correlacionar a capacidade discriminatória de 3 técnicas moleculares de tipagem
4. Realizar análise filogenética em *H. capsulatum* isolados no Brasil e comparar a filogenia com isolados em outros continentes.
5. Desenvolver nova metodologia de tipagem utilizando a expressão de alguns genes envolvidos no processo de virulência.
6. Correlacionar os resultados obtidos na nova metodologia com os métodos de genotipagem.

8. Artigo nº 1



FEMS Immunology and Medical Microbiology 45 (2005) 443–449



Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains in Brazil

Rosely M. Zancopé-Oliveira *, Patrícia Morais e Silva Tavares, Mauro de Medeiros Muniz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz.), Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro 21045-900, Brazil

Received 2 May 2005; accepted 27 May 2005

First published online 19 July 2005

Publicado na revista FEMS Immunology and Medical Microbiology em Julho de 2005,
Vol. 45 (2005) p. 4815-1817

Este estudo estabelece a relação genética entre amostras de *Histoplasma capsulatum* brasileiras obtidas de diferentes fontes. Um estudo de PCR-RAPD foi usado para delinear o polimorfismo entre isolados de diversas regiões geográficas no Brasil. RAPD *fingerprinting* revelaram distintos perfis promovendo um alto nível de discriminação entre cepas *H. capsulatum* de locais diferentes. Grupo I foi composto de *H. capsulatum* isolados da região Nordeste. A maioria de cepas da região Sudeste e Sul foram categorizados como Grupo II. A cepa 84564 de Estado de Rio de Janeiro não mostrou nenhuma correlação genética a qualquer dos isolados do mesmo estado. Os padrões de RAPD de *H. capsulatum* de Goiás (Grupo III) não foram relacionados com nenhum perfil genotípico observado entre os outros *H. capsulatum* incluídos no estudo apresentando somente 48% de similaridade. Este é o primeiro estudo que estratifica e agrupa *H. capsulatum* isolados no Brasil através de tipagem molecular associando os com a origem geográfica.



Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains in Brazil

Rosely M. Zancopé-Oliveira *, Patrícia Morais e Silva Tavares, Mauro de Medeiros Muniz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz.), Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro 21045-900, Brazil

Received 2 May 2005; accepted 27 May 2005

First published online 19 July 2005

Abstract

This study establishes the genetic relatedness among Brazilian *Histoplasma capsulatum* samples obtained from different sources. A PCR-based random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay was used to delineate polymorphisms among isolates in geographically diverse regions in Brazil. RAPD fingerprints revealed distinct DNA profiles and provided a high level of discrimination among *H. capsulatum* strains from different locations. Cluster I was composed of *H. capsulatum* isolates from the northeast region. The majority of strains from southeast and south were categorized as major cluster II. The strain 84564 from Rio de Janeiro State showed no genetic correlation to any of the isolates from the same state. The RAPD patterns of *H. capsulatum* isolates from Goiás (Cluster III) were unrelated to DNA fingerprints observed among the other *H. capsulatum* strains (48% similarity). This study is the first report that stratifies the clusters of *H. capsulatum* strains from Brazil by molecular typing and associates them with the geographical origin.

© 2005 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Molecular epidemiology; *Histoplasma capsulatum*; Typing; Brazil

1. Introduction

Histoplasmosis, a systemic fungal disease caused by *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, is an important health problem worldwide and a very common infection in endemic regions of North and Latin America [1–4]. Histoplasmosis is a serious community-acquired endemic mycosis among immunocompetent hosts in some countries. In addition, it has become a serious problem in immunocompromised hosts; such AIDS patients who develop a rapidly progressive disseminated disease that requires prompt diagnosis and treatment [5]. *H. capsulatum* usually grows in enriched soils, and the human infection frequently occurs after inhalation of dust generated from disturbance of *H. capsulatum* micro niches. The risk of infection depends on

the activity performed such as soil excavation, spelunking, construction, renovation, demolition, and cleaning sites harboring the fungus [4] and the period of soil contact.

Histoplasmosis has long been recognized as a common recreational disease among cavers in North America, but recent reports indicate an increase in the number of cases in individuals who engage in other forms of adventure tourism and ecotourism. Outbreaks of histoplasmosis were reported among traveling US residents after trips to Central and South America [6]. Histoplasmosis is one of the most common systemic mycoses in Brazil where epidemiological surveys carried out using the histoplasmin skin test indicate that this mycosis is endemic in all surveyed areas (Fig. 1) [7]. Up to now, 161 cases of *H. capsulatum* infection were associated with outbreaks that occurred in different Brazilian regions (Table 1). Of these, 14 outbreaks were identified in Rio de Janeiro State. Although the epidemiology of histoplasmosis has been well studied in here, cases of

* Corresponding author. Tel.: +55 21 3865 9557; fax: +55 21 2590 9988.

E-mail address: zancope@ipecc.fiocruz.br (R.M. Zancopé-Oliveira).

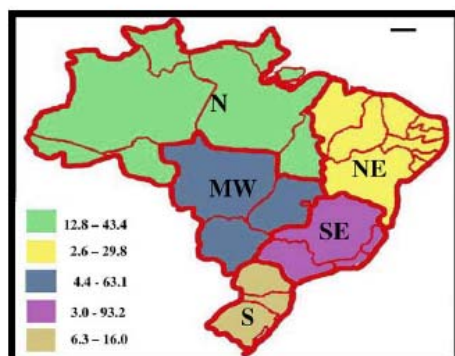


Fig. 1. Distribution of histoplasmosis within Brazil as indicated by general prevalence (%) range of histoplasmin skin test positivity. Adapted from C.C. Rodrigues, PhD thesis.

histoplasmosis in Brazil may be underestimated, suggesting that the endemic areas are more widespread than previously thought.

Genome typing has classified distinct genotypes and varieties of *H. capsulatum* correlating clinical manifestations with geographical distribution. Retallack and Woods, in recent review about molecular epidemiology of the *H. capsulatum*, summarize the methodologies applied to demonstrate the genetic diversity of this fungus [19]. More recently, the analysis of the phylogenetic relationship of *H. capsulatum* from six continents using DNA sequence variation in four independent protein-coding genes demonstrated the existence of genetically distinct geographical populations or phylogenetic species [20].

The molecular epidemiology of histoplasmosis has been poorly studied in Brazil. Brazilian isolates of *H. capsulatum* from AIDS-related infections, community-acquired histoplasmosis in immunologically intact hosts, and those from soil and animals have been compared by DNA fingerprinting just in the Rio de Janeiro State [1]. More recently, it was demonstrated genetic polymorphism among *H. capsulatum* strains from patients with AIDS from São Paulo State when compared with isolates from US [21]. However, the molecular epidemiology of histoplasmosis is unknown in other Brazilian regions. It has been hypothesized that genetic differences among strains of *H. capsulatum* could be correlated with the pathogenesis and clinical manifestations of histoplasmosis. Therefore, it will be important to elucidate the molecular characteristics of *H. capsulatum* isolates from different geographical areas in order to understand the clinicopathological features of this fungal disease.

In this study, we review the epidemiology of histoplasmosis in Brazil and analyze the genetic polymorphism of *H. capsulatum* isolates from different geographical regions areas in our country using a RAPD assay.

2. Materials and methods

2.1. Microorganisms

Twenty-two *H. capsulatum* isolates were included in this study. Seven *H. capsulatum* strains were obtained from the Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

Table 1
Outbreaks of histoplasmosis in Brazil

Location	Source of infection	Cases (n)	Authors	References
Paraíba do Sul, RJ	Bat Cave	13	Paula (1959)	[7]
Santa Teresa,	Watertank	07	Tufe Simão (1959)	[8]
Ubatuba, SP	Attic	08	Fava Neto et al. (1967)	[9]
Vassouras, RJ	Bat Cave	05	Paula & Pomp (1972)	[8]
Brasília, DF	Bat Cave	14	Schmidt et al. (1973)	[10]
Rio de Janeiro, RJ	Bat Cave	05	Rego et al. (1976)	[8]
Ubatuba, SP	Bat Cave	10	Fava Neto et al. (1976)	[11]
Angra dos reis, RJ	Cave	08	Mello et al. (1978)	[8]
Angra dos Reis, RJ	Cave	08	Peçanha et al. (1981)	[8]
São Gonçalo, RJ	Bat Cave	10	Wanke (1981)	[12]
São Gonçalo, RJ	Bat Cave	04	Wanke (1981)	[12]
Itaipava, RJ	Bat Cave	10	Wanke (1981)	[12]
Itaipava, RJ	Bat Cave	05	Wanke (1981)	[12]
Niterói, RJ	Bat Cave	06	Wanke (1981)	[12]
Tinguá, RJ	Old Chicken House	10	Bethlem et al. (1984)	[8]
Pendotiba, RJ	Trench under Bridge	10	Paula & Aidé (1977)	[13]
Borborema, PB	Sewer	06	Fernandes et al. (1987)	[14]
Manaus, AM	Bat Cave	08	Suzaki et al. (1995)	[15]
Jequiú, BA	Basement	04	Martins et al. (2000)	[16]
Pedro Leopoldo, MG	Bat Cave	04	Cury et al. (2001)	[17]
Rio de Janeiro, RJ	Old Building	03	Faria (2004)	[18]
Itacuruçá, RJ	Old Building	03	Faria (2004)	[18]

Table 2
List of *Histoplasma capsulatum* analyzed in this study

Strain	State of isolation, region	Year	Source	Clinical sample
RE 5646	Pernambuco, NE	2000	Unknown	Unknown
RE 9463	Pernambuco, NE	2000	Unknown	Unknown
JIEF	Ceará, NE	2000	Unknown	Unknown
GO 764	Goiás, MW	1999	Unknown	Unknown
GO 1820	Goiás, MW	1999	Unknown	Unknown
MS 365 BG	Mato Grosso do Sul, MW	2000	Human	Biopsy of lymph node
SP 49	Sao Paulo, SE	2000	Human	Bronchial washing
SP 2414	Sao Paulo, SE	2004	Human	Oral lesion
ES55	Espírito Santo, SE	Unknown	Human	Bone marrow
ES56	Espírito Santo, SE	Unknown	Human	Bone marrow
ES60	Espírito Santo, SE	Unknown	Human	Bone marrow
ES62	Espírito Santo, SE	Unknown	Human	Bone marrow
RPS51	Rio de Janeiro, SE	1984	Soil	NA
IGS 4/5	Rio de Janeiro, SE	1981	Soil	NA
RS09	Rio de Janeiro, SE	1984	Rat	Liver, spleen
3237	Rio de Janeiro, SE	1988	Human	Sputum
9414	Rio de Janeiro, SE	1993	Human	Blood
9305	Rio de Janeiro, SE	1993	Human	Bronchial washing
84564	Rio de Janeiro, SE	1998	Human	Skin lesion
157-CS	Rio Grande do Sul, S	2002	Human	LCR
187-LCT	Rio Grande do Sul, S	2002	Human	Biopsy of lymph node
190-CLC	Rio Grande do Sul, S	2002	Human	Oral secretion

– Fundação Oswaldo Cruz. The other 15 Brazilian isolates were donated by Zoilo Camargo (UNIFESP), Luzinete A. de Queiroz (UFPE), Marilene R. Chang (UFMS), Maria do Rosário Rodrigues Silva (UFG), Terezinha Silva Leitão (UFCE) e Luiz Carlos Severo (UFRS). Their sources and geographical origins are listed in Table 2. Fungal identification was done by conventional mycological methods, including morphology and the exoantigen test.

2.2. DNA isolation

DNA was extracted from yeast-phase organisms grown for five days at 37 °C in GYE broth medium (2% glucose and 1% yeast extract) by a procedure that involves spheroplasting, enzymatic cell lyses, RNase and proteinase K treatment, and phenol/chloroform/isoamyl alcohol extraction [22]. Each preparation was checked for DNA concentration in a Gene Quant *pro* RNA/DNA Calculator (Amersham–Pharmacia Biotech, Cambridge, UK), and integrity by agarose gel electrophoresis.

2.3. PCR–RAPD

For the RAPD analysis each strain was tested with four primers obtained from Amersham Biosciences INC. The primers were chosen based on a previous study developed by our group [Zancopé-Oliveira, R.M. Genetic diversity of *H. capsulatum* strains isolated in Brazil by a PCR-based random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. Proceedings of 2002 IUMS Congress, 10th International Congress of Mycology, Paris, France

2002], and all of them presented a G+C content of 60%. The DNA amplification reaction was carried out in a 25 µl volume containing 20 ng of *H. capsulatum* DNA, 10× PCR buffer containing 500 mM KCl, 100 mM Tris–HCl, pH 8.3, 3 mM MgCl₂, 400 µM of deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 25 pmol of primer and 1 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen). The PCR was performed according to the primer used in the reaction. For amplification with primers 2 (5'-d [GTTTCGCT-CC]-3'), 3 (5'-d [GTAGACCCGT]-3'), 4 (5'-d [AA-GAGCCCGT]-3') and 5 (5'-d [AACGCGCAAC]-3') the thermal cycler (Eppendorf Mastercycler) was programmed for 1 denaturation cycle at 95 °C for 5 min followed by 45 cycles of the succeeding steps: denaturation 95 °C for 1 min, annealing at 36 °C for 1 min., and extension at 72 °C for 2 min and a final extension period of 72 °C of 10 min. The randomly amplified DNA fragments were analyzed by electrophoresis on a 1% agarose gel in TBE buffer (0.89 M Tris, 0.89 M boric acid, 0.02 M EDTA disodium, pH 8.4) stained with ethidium bromide (Roche Molecular Biochemicals, Germany) 0.5 µg ml⁻¹ final concentration.

The RAPD profiles were defined by bands that were present in different amplification reactions. The relative mobility position of all the bands visualized on the gel was calculated by automated analysis using ImageMaster 1D Image Analysis Software (Amersham Biosciences) and data matrix were scored for the presence (1) or absence (0) of amplification products. The reproducibility of this method was confirmed when identical electrophoretic profiles were observed in PCR assays under the same conditions repeated at least three times.

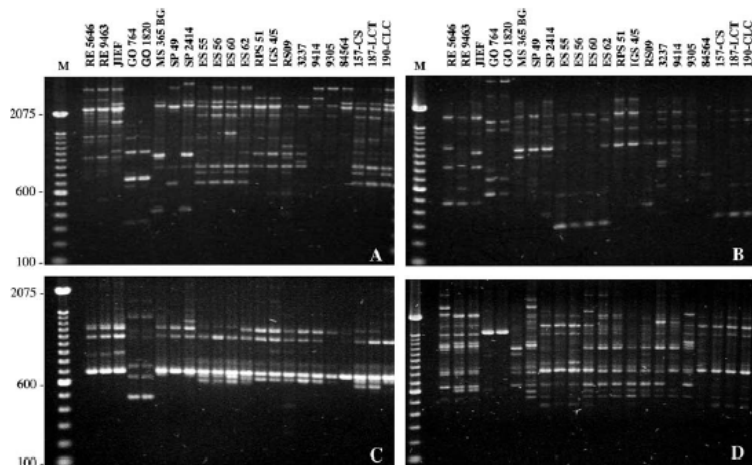


Fig. 2. RAPD profiles of *H. capsulatum* isolated in Brazil. Panel A: Primer 2, Panel B: primer 3, Panel C: primer 4, and Panel D: primer 5. M: DNA molecular marker (DNA ladder, Invitrogen).

2.4. Computer-assisted data analysis

The similarity coefficient or Dice index was determined for each isolate, in RAPD analysis, by using the NTSYSpc version 2.02 Applied Biostatistics Inc. The same statistic program was used to perform common principal components analysis (CPCA) and the cophenetic value (COPH). For clustering, the unweighted pair-group method with arithmetic means (UPGMA) was used.

3. Results

The *H. capsulatum* strains, and the geographic location, data of isolation, the origin, and the clinical specimen are described in Table 2. Representative RAPD profile obtained with all primers from total of 22 *H. capsulatum* samples, including 1 animal, 2 environmental, and 19 clinical isolates are shown in Fig. 2. Amplification reactions generated profiles composed of one to 17 bands ranging from approximately 257 to 2976 bp.

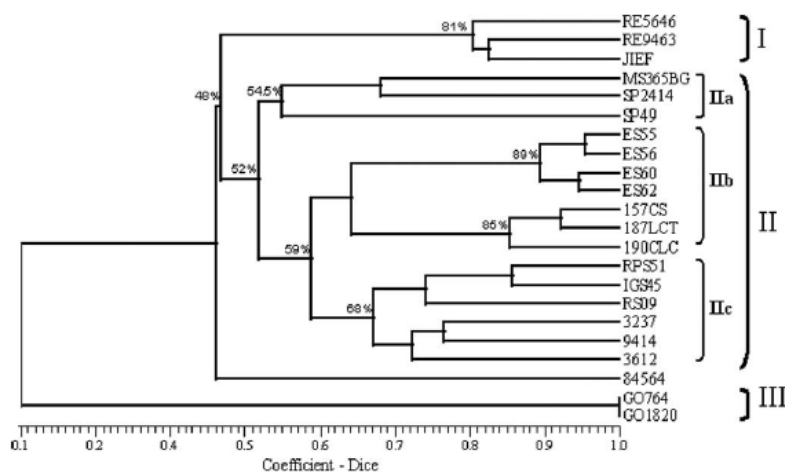


Fig. 3. Dendrogram of *H. capsulatum* strains based on the UPGMA method derived from analysis of the RAPD profiles of genomic DNA generated by using combined primers. Distinct RAPD clusters are designated by roman numerals. The numbers on the right are strain designations.

The combination of the RAPD fingerprint obtained for the 22 *H. capsulatum* isolates with primers 2, 3, 4, and 5 resulted in 21 RAPD patterns, indicating a high discrimination among the *H. capsulatum* strains isolated in different geographical regions of Brazil.

Genetic relationships obtained with the UPGMA method are represented as a dendrogram (COPH = 0.951) (Fig. 3). Two major clusters containing 19 of the 22 strains were distinguished at a similarity distance of 0.48. Cluster I (the upper branch in Fig. 3) was composed of three *H. capsulatum* isolates from the northeast region (NE, States of Pernambuco and Ceará) exhibiting 81% relatedness among them. The major cluster II included 16 strains, all of them from Southeast (SE) and Southern (S) regions of Brazil. A clear separation into three subgroups (IIa, IIb, IIc) was observed within this cluster. There was 52% similarity among the isolates. Subgroup IIa accounted for two isolates from São Paulo State (SE), and one from Mato Grosso do Sul State (MW). The isolates from the States of Espírito Santo (SE), with a high degree of relatedness among them (89%), and Rio Grande do Sul (S) (85% relatedness) were subclustered in a subgroup denoted IIb in Fig. 3. Six isolates from Rio de Janeiro State (SE) comprised subgroup IIc. Among these strains, the nonclinical isolates (RPS51, IGS 4/5, RS09) were subclustered in a separated sub-branch and exhibited 68% similarity. *H. capsulatum* strain 84564, isolated from a patient in the Rio de Janeiro State, differed from those of the same State by manifesting only 46% similarity to all of the primers.

The RAPD patterns of *H. capsulatum* isolates from Goiás (MW, GO 764, GO 1820) (Cluster III), with identical DNA profiles between them (Figs. 2 and 3), were completely different from the DNA Fingerprints observed among the other *H. capsulatum* strains analyzed

by this methodology. The percentage of similarity was only 48%.

The data matrix generated from the RAPD profiles was transformed to perform common principal components analyses to determine if meaningful subgroupings were detectable. The CPCA analyses demonstrated the *H. capsulatum* isolates were subgrouped according to the geographical region (Fig. 4).

4. Discussion

Molecular epidemiology is based mainly on chromosomal polymorphisms. Information about the genetic diversity of *H. capsulatum* associated to geographic distribution would be very useful to public health authorities in designing and implementing prevention and intervention strategies based on that information. The DNA fingerprinting of Brazilian *H. capsulatum* isolates was carried out as an initial effort to identify molecular types within some of the geographic regions of the country. These data illustrate for the first time a general overview regarding the molecular type distribution of *H. capsulatum* in various regions of Brazil.

The primers chosen for this study presented a G+C content of 60%. Although the choice of other primers with higher discriminatory power could be applied to this study, many arbitrary oligonucleotides can serve as informative primers. It has been demonstrated that 50% G+C primers generally provide better amplification with the larger and more complex genomes of eukaryotes [23] as *H. capsulatum*. Analysis of our findings with primers 2, 3, 4, and 5 showed that the majority of *H. capsulatum* isolates included in this study had 48% similarity, and despite this genetic diversity, they could be separated into three major clusters.

Genetically distinct geographical populations or phylogenetic species among *H. capsulatum* isolates from six continents have been classified into eight clades: (i) North American class 1 clade; (ii) North American class 2 clade; (iii) Latin American group A clade; (iv) Latin American group B clade; (v) Australian clade; (vi) Netherlands (Indonesia) clade; (vii) Eurasian clade and (viii) African clade [20]. A previous study demonstrated that the RAPD profiles of *H. capsulatum* isolated from Rio de Janeiro State also exhibited considerable polymorphism and could be distinguished from those of the US strains included in that study [1] suggesting they could be environmentally and/or geographically distinct strains even in the same state/country. Our data corroborated this hypothesis since the majority of *H. capsulatum* isolates included in this study tended to cluster together according to their geographical origin (Fig. 4). Although the RAPD profiles of the MS365BG sample (isolated from Mato Grosso do Sul, MW) were clustered into subgroup IIa, with other two *H. capsulatum*

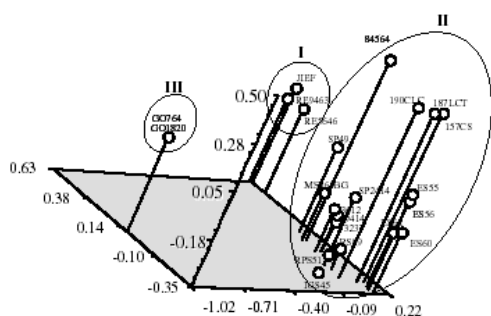


Fig. 4. Spatial position of *Histoplasma capsulatum* isolates based on principal components analysis (PCA). The clusters are designated by roman numerals. Cluster I includes *H. capsulatum* isolates from Northeast region; Cluster II is composed for isolates from Southeast and Southern, and Cluster III grouped two isolates from Goiás state situated in MW region of Brazil.

from São Paulo, a southeast region, it showed only 45% similarity to other isolates. However, we cannot rule out the possibility of migration of this patient to another geographically distinct location. It has been suggested that genetic differences among strains of *H. capsulatum* may alter the pathogenesis and/or clinical manifestations of histoplasmosis [21]. The *H. capsulatum* strain 84564, the only strain obtained from skin lesion of a patient with disseminated histoplasmosis, manifested high genetic diversity when compared with those isolated in the Rio de Janeiro State and could not be included in any of the major clusters. Although the association of genetic differences with pathogenesis and clinical presentation requires further study, our finding supports this hypothesis.

The ecology of *H. capsulatum* in Brazil has been the subject of several investigations (Table 1). The fungus has been isolated from soil in different geographic areas suggesting that *H. capsulatum* micro niches exist in these localities and could be acting as the source of infection for animals and the local human population [8]. The clustering of *H. capsulatum* isolated from the same Brazilian states, some with high similarity favors that hypothesis. *H. capsulatum* isolates from Goias were grouped into Cluster III with 100% identity. Similar results were observed in isolates from Espírito Santo and Rio do Grande do Sul showing a close genetic relationship with 89% and 85% similarity, respectively. The high percentage of genetic similarity between these isolates suggests the possibility that only one virulent genetic population was present in those environments. However, new comparative studies with additional *H. capsulatum* isolates from these locations using RAPD and other molecular typing methods cannot be ruled out.

Although a small number of isolates were included in the present investigation, they comprised samples recovered from 80% of the regions of Brazil. This information is of special value since this is the first study of the molecular epidemiology of histoplasmosis in Brazil. The data obtained suggest that the application of RAPD methodology could be a useful tool for *H. capsulatum* typing. This method of strain identification and analyses of genome diversity is sensitive, reliable, fast, requires much less DNA than is needed for Southern blot, and avoids the need for restriction endonuclease cleavage which is often difficult with DNA extracted from *H. capsulatum* [24]. There is a potential interest to determine molecular markers for characteristic genotypes from different Brazilian regions. New comparative studies using RAPD and other molecular typing methods such as sequencing of some genes are in development to delineate the polymorphism present in *H. capsulatum* isolates from all geographic regions in Brazil in order to provide more information and new insight into the population genetics and epidemiology of histoplasmosis.

Acknowledgments

We thank Z.P. Camargo (UNIFESP), L.A. de Queiroz (UFPE), M.R. Chang (UFMS), M.R.R. Silva (UFG), T.S. Leitão (UFCE) and L.C. Severo (UFRS) for supplying the *Histoplasma capsulatum* isolates and clinical information's; and George S. Deepe for suggestions and review.

Financial support for this work was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Grant Proc. 400175/98-3).

References

- [1] Muniz, M.M., Pizzini, C.V., Peralta, J.M., Reiss, E. and Zancopé-Oliveira, R.M. (2001) Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains isolated from soil, animals, and clinical specimens in Rio de Janeiro State, Brazil by a PCR-based random amplified polymorphic DNA assay. *J. Clin. Microbiol.* 39, 4487–4494.
- [2] Rios-Fabra, A., Restrepo, A. and Isturiz, R. (1994) Fungal infection in Latin American countries. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 8, 129–154.
- [3] Suarez, M., Fernandez, A., Estrada, A. and Cisneros, D. (1992) Reactividad a la histoplasmina em trabajadores de granjas avícolas em la provincia de Ciego de Ávila, Cuba. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 34, 329–333.
- [4] Cano, M. and Hajjeh, R.A. (2001) The epidemiology of histoplasmosis: a review. *Semin. Respir. Infect.* 16, 109–118.
- [5] Wheat, L.J. and Kauffman, C.A. (2003) Histoplasmosis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 17, 1–19.
- [6] Panackal, A.A., Hajjeh, R.A., Cetron, M.S. and Warnock, D.W. (2002) Fungal infections among returning travelers. *Clin. Infect. Dis.* 35, 1088–1095.
- [7] Paula, A. (1959) Microepidemia de histoplasmoze. *Rev. Serv. Nac. Tuberc.* 3, 11–20.
- [8] Rodrigues, C.C. (2004) Avaliação da infecção por *Histoplasma capsulatum* por meio de reações intradérmicas em moradores da zona urbana e rural do Município de Pratânia (SP) 171 p. Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP, Botucatu, SP.
- [9] Fava Netto, C., Silva, U.A., Chammass, F. and Lacaz, C.S. (1967) Histoplasmoze epidêmica. Estudo clínico, radiológico, micológico e imunológico de surto ocorrido no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 9, 222–232.
- [10] Schmidt, S., Machado, O.P. and Galvão, A.B. (1973) Microepidemia de histoplasmoze na zona rural de Brasília, DF. II. Estudo epidemiológico e parasitológico da fonte de infecção. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 7, 107–115.
- [11] Fava Netto, C., Almeida Netto, J.M.A., Guerra, M.A.G. and Costa, E.O. (1976) Histoplasmoze epidêmica. Novos surtos ocorridos no litoral norte do Estado de São Paulo. Inquérit com histoplasmina e paracoccidioidina. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 18, 108–112.
- [12] Wanke, B., Ferreira da Cruz, M.F., Lazera, M.S. and Bretas, G. (1983) Microepidemia de histoplasmoze no Estado do Rio de Janeiro. In: *Anais do 19º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro, RJ.
- [13] Paula, A. and Aidé, M.A. (1977) Histoplasmoze urbana. *Med. Hoje* 3, 677–684.
- [14] Fernandes, F., Costa, W., Wanke, B. and Zancopé-Oliveira, R.M. (1989) Microepidemia de *histoplasmoze capsulata*: clínica e epidemiológica do primeiro surto ocorrido no Estado da Paraíba. *Cienc. Cult Saúde* 11, 189–199.

9. Artigo nº 2

Comparison of different DNA-based methods for molecular typing of *Histoplasma capsulatum*

Running Title: Molecular typing of *Histoplasma capsulatum*

Mauro de Medeiros Muniz*, Patrícia Morais e Silva Tavares, Wieland Meyer, Joshua Daniel Nosanchuk and Rosely Maria Zancope-Oliveira

Submetido à revista Applied and Environmental Microbiology (AEM) MS # AEM02004-09 - Version 1 em Agosto de 2009.

Histoplasma capsulatum é altamente prevalente no ambiente e é uma das mais comuns causas de micoses em humanos e em diversos animais no Brasil. Muitos métodos de tipagem têm sido desenvolvidos para o estudo da epidemiologia do *H. capsulatum*, entretanto existe limitada informação comparando resultados obtidos de diferentes metodologias aplicadas a uma mesma amostragem. Para explorar a diversidade do *H. capsulatum* no Brasil e determinar a correlação entre três diferentes técnicas de tipagem molecular, foram examinados 51 isolados de *H. capsulatum* isolados do meio ambiente, de animais e de pacientes com histoplasmose por M13 PCR *fingerprinting*, análise por PCR-RFLP da região do gene do rDNA e análise de polimorfismos nas seqüências parciais de quatro genes codificadores das proteínas ARF, H-ANTI, OLE e TUB. Cada método identificou três grandes grupos com uma alta concordância entre si. Notavelmente, o método de sequenciamento parcial dos genes resultou em altos valores de *bootstrap*, sugerindo que o método apresenta grande sensibilidade. Além disso, uma análise filogenética, comparando as seqüências de 51 isolados brasileiros com as demais seqüências de *H. capsulatum* publicadas em GeneBank, demonstrou agrupamento genético de maneira singular do fungo, demonstrando a natureza diversa e complexa do *H. capsulatum*.

Comparison of Different DNA-Based Methods for Molecular Typing of *Histoplasma capsulatum*[∇]

Mauro de Medeiros Muniz,^{1*} Patrícia Morais e Silva Tavares,¹ Wieland Meyer,²
 Joshua Daniel Nosanchuk,³ and Rosely Maria Zancope-Oliveira¹

*Laboratório de Micologia, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil*¹;
*Molecular Mycology Research Laboratory, Centre for Infectious Diseases and Microbiology, Westmead Millennium Institute,
 Westmead Hospital, Westmead, New South Wales, Australia*²; and *Departments of Medicine (Division of Infectious Diseases) and
 Microbiology and Immunology, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York*³

Received 20 August 2009/Accepted 16 April 2010

Histoplasma capsulatum is very prevalent in the environment and is one of the most common causes of mycoses in humans and diverse animals in Brazil. Multiple typing methods have been developed to study *H. capsulatum* epidemiology; however, there is limited information concerning comparisons of results obtained with different methods using the same set of isolates. To explore the diversity of *H. capsulatum* in Brazil and to determine correlations between the results of three different molecular typing techniques, we examined 51 environmental, animal, and human isolates by M13 PCR fingerprinting, PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the internal transcribed region 1 (ITS1)-5.8S-ITS2 region of the rDNA locus, and DNA sequencing and phylogenetic analysis of parts of four protein-encoding genes, the *Arf* (ADP ribosylation factor), *H-anti* (H antigen precursor), *Ole* (delta-9 fatty acid desaturase), and *Tub1* (alpha-tubulin) genes. Each method identified three major genetic clusters, and there was a high level of concordance between the results of the typing techniques. The M13 PCR fingerprinting and PCR-RFLP analyses produced very similar results and separated the *H. capsulatum* isolates included in this study into three major groups. An additional approach used was comparison of our Brazilian ITS1-5.8S-ITS2 sequences with the sequences deposited previously in NCBI data banks. Our analyses suggest that *H. capsulatum* can be divided into different molecular types that are dispersed around the world. Our results indicate that the three methods used in this study are reliable and reproducible and that they have similar sensitivities. However, M13 PCR fingerprinting has some advantages over the other two methods as it is faster, cheaper, and more user friendly, which especially increases its utility for molecular typing of *Histoplasma* in situations where laboratory facilities are relatively limited.

Histoplasmosis is a serious community-acquired infection in the United States (28) and in certain countries of Latin America, where it is an especially significant problem in patients with AIDS (14). This disease is one of the most common systemic mycoses in Brazil, where epidemiological surveys carried out using the histoplasmin skin test have indicated that it is endemic in all areas surveyed (15). Data suggest that the numbers of cases of histoplasmosis in Brazil may be underestimated and that the areas where it is endemic are more widespread than previously thought.

Histoplasma capsulatum is a dimorphic fungus that grows as a mold and produces aerial hyphae at 25 to 30°C, but it undergoes morphogenesis to a yeast phase at 37°C. The filamentous phase of this organism is usually found in soil enriched with several compounds, such as nitrogen and phosphate compounds. When conidial or hyphal fragments are inhaled by humans or animals, *H. capsulatum* changes to the yeast form and continues to replicate as a yeast. Although *H. capsulatum* has been recognized as an important fungal pathogen in im-

munocompromised hosts, particularly AIDS patients (27), there are significant gaps in our knowledge of this species' epidemiology and pathogenesis. For instance, systemic histoplasmosis has been found in patients with AIDS who do not reside in regions where it is endemic (29), leading to the suggestion that the disease can result from reactivation of a previously acquired *H. capsulatum* infection. The clinical manifestations of histoplasmosis range from asymptomatic infections, mild flu-like symptoms, or pneumonia to a systemic disease involving the skin, brain, intestine, adrenal glands, and/or bone marrow (6). Importantly, diverse strains of *H. capsulatum* have been identified worldwide, and the strains vary in virulence. In addition to classical biochemical assays, distinctions between strains may be based on colony morphology or polymorphism of the genome (19).

Multiple typing methods have been developed to study the epidemiology of *H. capsulatum*. These methods are based on phenotypic characteristics, such as antigenic profiles (13) and multilocus enzyme electrophoresis results (2), or on DNA-based analysis. Most recently, typing has been accomplished by analysis of fatty acid profiles of *H. capsulatum* (34). Molecular typing methods are generally considered to have advantages over phenotypic methods in terms of the stability of genomic markers and greater levels of typeability. Several genotype-based methods, such as hybridization of target genes (probes),

* Corresponding author. Mailing address: Setor de Imunodiagnóstico do Laboratório de Micologia do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Mangueiras, Rio de Janeiro 21045-900, Brazil. Phone: (55-21) 3865 9640. Fax: (55-21) 3865 9557. E-mail: mauro.muniz@ipecc.fiocruz.br.

[∇] Published ahead of print on 7 May 2010.

chromosomal DNA typing, restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis, random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis, and sequencing, have been described for *H. capsulatum* (4, 5, 7, 8, 11, 17, 19). Despite the abundance of previously developed molecular techniques, there is limited information concerning comparisons of the results obtained with different methods using the same set of isolates. In *H. capsulatum*, no single approach based on DNA assays has been the dominant method.

The current study was done to explore the diversity of *H. capsulatum* in Brazil and to determine the correlation between the results of three different molecular typing techniques. For this analysis, we used M13 PCR fingerprinting, PCR-RFLP analysis of the internal transcribed spacer 1 (ITS1)-5.8S-ITS2 region of the rDNA gene, and analysis of the nucleotide sequence polymorphism of four partial genes. M13 PCR fingerprinting (25) is based on generation of multiple PCR products with different electrophoretic mobilities. PCR fingerprinting primers are typically designed using repetitive DNA sequences (31), and the products facilitate detection of two types of genetic variations: (i) differences in the length of DNA and (ii) alterations in the sequence of the priming regions. PCR-RFLP analysis of the ITS1-5.8S-ITS2 region of the rDNA gene (9) involves use of a gene-specific PCR in combination with restriction digestion in order to generate highly stable and reproducible markers. Analysis of the nucleotide sequence polymorphism is based on the sequences of four partial protein-encoding genes (*Arf*, the H-anti gene, *Ole*, *Tub1*) (4). Additionally, to assess the utility of an assay to study the global epidemiology of the fungus, we performed a DNA sequencing analysis of the ITS1-5.8S-ITS2 region to compare the Brazilian *H. capsulatum* ITS1-5.8S-ITS2 sequences with sequences obtained for *H. capsulatum* strains isolated in other countries.

MATERIALS AND METHODS

Cultures. Fifty-one *H. capsulatum* strains were obtained from the culture collection of the Laboratório de Micologia of the Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. The sources and geographical origins of these strains are shown in Table 1. Fungi were identified by using a conventional mycological method, including assessment of morphology on potato dextrose agar (PDA) slants and microscopic observation of fungal fragments after 15 days of incubation at room temperature. All isolates were tested for conversion to the yeast phase on brain heart infusion (BHI) medium and/or Ham's F-12 medium at 37°C for at least 7 days. Culture supernatants from each isolate were subjected to exoantigen testing (20).

DNA extraction. Yeast cells were recovered from Ham's F-12 medium and used for DNA extraction (30), which involved spheroplasting, enzymatic cell lysis, phenol-chloroform-isoamyl alcohol protein precipitation, ethanol precipitation, and enzymatic treatments. After RNase and proteinase K treatment, DNA was purified by phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) extraction and ethanol precipitation. The integrity of DNA was verified by electrophoresis on a 1% agarose gel in TBE buffer (0.89 M Tris, 0.89 M boric acid, 0.02 M disodium EDTA; pH 8.4) and staining with ethidium bromide (Roche Molecular Biochemicals) at a final concentration of 0.5 µg/ml. DNA was quantified spectrophotometrically.

M13 PCR fingerprinting. The minisatellite-specific core sequence of wild-type phage M13 (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3') was used as a single primer in the PCR. According to Vassart and colleagues (25), this method using a phage M13 sequence detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA (25). The amplification reactions were performed with a 50-µl mixture containing 25 ng of genomic DNA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM (each) dATP, dCTP, dGTP, and dTTP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 3 mM magnesium acetate, 30 ng of primer, and 2.5 U AmpliTaq DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA). PCR was performed in a Perkin-Elmer thermal cycler (model 480), and the program

consisted of 35 cycles of 20 s of denaturation at 94°C, 1 min of annealing at 50°C, and 20 s of extension at 72°C, followed by a final extension for 6 min at 72°C. Amplification products were removed, concentrated to approximately 20 µl, separated by electrophoresis on 1.4% agarose gels (stained with ethidium bromide [final concentration, 0.5 µg/ml]) in 1× TBE buffer at 60 V for 14 cm, and visualized under UV light. All visualized bands on the gels were counted independent of the intensity, and the presence or absence of the amplified DNA bands was recorded (10).

PCR RFLP analysis (rDNA gene). PCR analysis of the ITS1-5.8S-ITS2 region of the rDNA gene was performed using 50-µl (final volume) reaction mixtures. Each reaction mixture contained 50 ng of DNA, 1× PCR buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂; Applied Biosystems, Foster City, CA), 0.2 mM (each) dATP, dCTP, dGTP, and dTTP (Roche Diagnostics GmbH), 3 mM magnesium acetate, 1.5 U AmpliTaq DNA polymerase (Applied Biosystems), 50 ng of primer SR6R (5'-AAGTARAAGTCGTAACAAGG-3'), and 50 ng of primer LR1 (5'-GGTTGGTTTCTTTTCCT-3'). The PCR was performed in a Perkin-Elmer thermal cycler (model 480) with the following program: initial denaturation at 94°C for 2 min, followed by 35 cycles of denaturation for 45 s at 94°C, annealing for 1 min at 61°C, and extension for 2 min at 72°C and then a final extension at 72°C for 10 min. The PCR products (20 µl) were double digested with Sau96I (10 U/µl) and HhaI (20 U/µl) for 3 h or overnight at 37°C, and the amplification products were mixed with 0.2 volume of loading buffer and separated by 3% agarose gel electrophoresis at 100 V for 5 h. RFLP patterns were assigned visually based on the fragments obtained after electrophoresis.

Statistical analysis. BioloMICS version 7.5.80 (BioAware, Hannut, Belgium) was used to determine the genetic relationship of the strains. The DNA bands of each fingerprinting pattern were defined manually with a band position tolerance of 0.9%, a setting shown in a previous study (data not shown) to optimally define molecular size marker bands as 100% identical. Similarity coefficients were calculated by using the Dice coefficient, and cluster analyses were performed using the neighbor-joining (NJ) algorithms by using the "Fuzzy Logic" and "Area Sensitive" options of the BioloMICS software. The same statistical program was used to determine the cophenetic correlation coefficient.

Sequencing. Partial DNA sequences of four nuclear genes and of a region of the rDNA locus (ITS1-5.8S-ITS2) (4) were used for phylogenetic analyses. Table 2 shows the primer sequences and the predicted sizes of the amplified products. PCRs were performed with 100 ng of a genomic DNA template using 50-µl reaction mixtures. The reaction mixtures consisted of each primer at a concentration of 0.45 mM, 1.0 U of AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer), 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, and 0.2 mM deoxynucleotide triphosphates, and the following temperature profile was used: 32 cycles of DNA denaturation for 15 s at 94°C, annealing for 30 s, and extension for 1 min at 72°C, followed by a final extension for 5 min at 72°C. The annealing temperature was 65°C in the first cycle and was reduced at a rate of 0.7°C/cycle for the next 12 cycles; thereafter, the PCR was continued using an annealing temperature of 56°C for the remaining 20 cycles (touchdown PCR) (1). Automated sequencing was done using the Sequencing Platform at Fundação Oswaldo Cruz-PDTIS/FIOCRUZ in Brazil and the Sequencing Facility of the Albert Einstein College of Medicine in New York. Sequences of both strands were generated, edited with the Sequencer version 4.6 software package (Genes Codes Corporation, United States), and aligned by using the Mega version 4.0.2 software. The following settings were used for Clustal W: slow/accurate; gap opening penalty, 15.00; gap extension penalty, 6.66; delay divergent sequences, 30%; DNA transition weight, 0.50; DNA weight matrix, IUB; and negative matrix, OFF. The same set of *H. capsulatum* isolates was compared with sequences available from the NCBI/GenBank database in order to define the levels of relatedness among the Brazilian isolates and isolates from other countries.

Final data analysis for partial sequences of four protein-encoding genes. The nucleotide diversity (π) and divergence for the four gene regions were estimated for the *H. capsulatum* isolates studied as described by Nei and Li (12). The evolutionary history was inferred using the neighbor-joining method (16). The percentages of replicate trees in which associated taxa clustered as determined by bootstrap analysis (500 replicates) are indicated below (22). The evolutionary distances were computed using the maximum composite likelihood method (21) and were expressed as numbers of base substitutions per site. All positions containing gaps and for which there were missing data were eliminated from the data set (complete deletion option). There were a total of 1,432 positions in the final data set for the combined analysis of the four genes. Phylogenetic analyses were conducted using MEGA 4.0.2.

Nucleotide sequence accession numbers. All of the sequences generated in this study have deposited in the GenBank database under accession numbers GU320834 to GU321088.

TABLE 1. Genotypes of 51 *H. capsulatum* isolates from Brazil determined by three molecular methods

Isolate	State	Year isolated	Source	M13 group	PCR-RFLP molecular type	Clade based on combined sequencing data	
						NJ method	MP method
AC02	Rio de Janeiro	1985	Soil	1	I	BrHc1	BrHc1
AC05	Rio de Janeiro	1985	Soil	1	I	BrHc1	BrHc1
B670	Rio de Janeiro	1990	Human	1	I	BrHc1	BrHc1
CADAM	Rio de Janeiro	1984	Dog	1	I	BrHc1	BrHc1
CAO4	Rio de Janeiro	1984	Dog	1	I	BrHc1	BrHc1
EP02	Rio de Janeiro	1981	Soil	1	I	BrHc1	BrHc1
IGS4/5	Rio de Janeiro	1981	Soil	1	I	BrHc1	BrHc1
IGS19	Rio de Janeiro	1981	Soil	1	I	BrHc1	BrHc1
IT04	Rio de Janeiro	1983	Soil	1	I	BrHc1	BrHc1
RPS45	Rio de Janeiro	1984	Soil	1	I	BrHc1	BrHc1
RPS51	Rio de Janeiro	1984	Soil	1	I	BrHc1	BrHc1
RPS86	Rio de Janeiro	1984	Soil	1	I	BrHc1	BrHc1
RS01	Rio de Janeiro	1981	Rat	1	I	BrHc1	BrHc1
RS09	Rio de Janeiro	1981	Rat	1	I	BrHc1	BrHc1
RS36	Rio de Janeiro	1981	Rat	1	I	BrHc1	BrHc1
TI01	Rio de Janeiro	1984	Soil	1	I	BrHc1	BrHc1
TI05	Rio de Janeiro	1984	Soil	1	I	BrHc1	BrHc1
TI14	Rio de Janeiro	1984	Soil	1	I	BrHc1	BrHc1
3237	Rio de Janeiro	1988	Human	1	I	BrHc1	BrHc1
3356	Rio de Janeiro	1988	Human	1	I	BrHc1	BrHc1
3416	Rio de Janeiro	1989	Human	1	I	BrHc1	BrHc1
3612	Rio de Janeiro	1989	Human	1	I	BrHc1	BrHc1
3688	Rio de Janeiro	1989	Human	1	I	BrHc1	BrHc1
4334	Rio de Janeiro	1990	Human	1	I	BrHc1	BrHc1
4631	Rio de Janeiro	1990	Human	1	I	BrHc1	BrHc1
6406	Rio de Janeiro	1991	Human	1	I	BrHc1	BrHc1
6503	Rio de Janeiro	1991	Human	1	I	BrHc1	BrHc1
9291	Rio de Janeiro	1993	Human	1	I	BrHc1	BrHc1
78642	Rio de Janeiro	1995	Human	1	I	BrHc1	BrHc1
84476	Rio de Janeiro	1998	Human	1	I	BrHc1	BrHc1
84502	Rio de Janeiro	1998	Human	1	I	BrHc1	BrHc1
84564	Rio de Janeiro	1998	Human	1	I	BrHc1	BrHc1
ES62	Espírito Santo	Unknown	Human	1	III	BrHc2	BrHc2
JIEF	Ceará	2000	Human	1	III	BrHc3	BrHc1
RE5646	Pernambuco	2000	Human	1	I	BrHc3	BrHc1
RE9463	Pernambuco	2000	Human	1	I	BrHc3	BrHc1
385BG	Mato Grosso do Sul	2000	Human	2	I	BrHc1	BrHc1
SP2414	São Paulo	2004	Human	2	I	BrHc1	BrHc1
SP49	São Paulo	2000	Human	2	II	BrHc4	BrHc3
MS53	Mato Grosso do Sul	2000	Human	3	I	BrHc2	BrHc2
9414	Rio de Janeiro	1993	Human	3	I	BrHc1	BrHc1
ES55	Espírito Santo	Unknown	Human	3	III	BrHc2	BrHc2
ES56	Espírito Santo	Unknown	Human	3	III	BrHc2	BrHc2
ES60	Espírito Santo	Unknown	Human	3	III	BrHc2	BrHc2
GO764	Goiás	1999	Human	3	III	BrHc2	BrHc2
GO1820	Goiás	1999	Human	3	III	BrHc2	BrHc2
157CS	Rio Grande do Sul	2002	Human	3	III	BrHc2	BrHc2
187LCT	Rio Grande do Sul	2002	Human	3	III	BrHc2	BrHc2
190CLC	Rio Grande do Sul	2002	Human	3	III	BrHc2	BrHc2
184PRS	Rio Grande do Sul	2002	Human	3	III	BrHc2	BrHc2
177CS	Rio Grande do Sul	2002	Human	3	III	BrHc2	BrHc2

* Bold type indicates the 15.7% of the *H. capsulatum* isolates without total pairwise concordance but with similar topology as determined by all methods used in this study.

RESULTS

A total of 51 *H. capsulatum* isolates, including 34 clinical, 5 veterinary, and 12 environmental isolates, were subjected to molecular typing. Data lists of the characteristics of the isolates studied included the state, the laboratory code, the clinical, veterinary, or environmental origin, and the isolation history (Table 1).

M13 PCR fingerprinting. A total of 32 reproducible PCR fingerprinting profiles were obtained with primer M13 for the 51 *H. capsulatum* samples, indicating that there was a high level of genetic diversity among the *H. capsulatum* strains isolated from different geographic regions of Brazil. The genetic relationships determined with the unweighted-pair group method using average linkages (UPGMA) were represented by a dendrogram (cophenetic correlation coefficient, 0.942), and the

TABLE 2. PCR primers used for the *Arf*, H-anti, *Ole*, and *Tub1* genes and the ITS region

Locus	Encoded protein or region	Primer	Nucleotide sequence (5'-3')	Length of product (bp)	GenBank accession no.
<i>Arf</i>	ADP ribosylation factor	arf1 arf2	AGAATATGGGGCAAAAAGGA CGCAATTCATCTTCGTTGAG	459	L25117
H-anti gene	H antigen precursor	H-anti3 H-anti4	CGCAGTCACCTCCATACTATC GCGCCGACATTAACCC	408	U20346
<i>Ole</i>	Delta-9 fatty acid desaturase	ole3 ole4	TTTAAACGAAGCCCCACGG CACCACCTCCAACAGCAGCA	424	X85962
<i>Tub1</i>	Alpha-tubulin	tub1 tub2	GGTGGCCAAATCGCAAACCTC GGCAGCTTCCGTTCTCAGT	278	M28358
ITS	Internal transcribed spacers plus rRNA genes	ITS4 ITS5	TCCTCCGCTTATTGATATGC GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG	600	U18363

discriminatory index calculated by using Simpson's index of diversity was 0.915 (3) (Fig. 1). Clustering of the 32 fingerprinting profiles resulted in three major groups (designated groups 1 to 3). The major group, group 1, was composed of 36 *H. capsulatum* isolates from different regions that exhibited higher levels of polymorphism. This group was divided into two subgroups, subgroups 1A and 1B. Subgroup 1A was composed of four *H. capsulatum* isolates from Rio de Janeiro and three isolates (JIEF, RE5646, and RE9463) from the northeast region of Brazil. Subgroup 1B was composed of *H. capsulatum* isolates from southeastern Brazil, including 28 isolates from Rio de Janeiro State obtained during several histoplasmosis outbreaks and epidemiological studies (18, 32, 33) and one isolate from Espírito Santo (ES62). Three isolates from southeastern Brazil comprised group 2. Strains SP 2414 from São Paulo and 385BG from Mato Grosso do Sul were closely related. However, *H. capsulatum* SP49, also from São Paulo State, had a completely different PCR fingerprinting profile than the other *H. capsulatum* strains included in this group. Group 3 included 12 strains, including 4 isolates (9414, ES60, ES56, and ES55) from the southeastern region of Brazil, 5 isolates (157CS, 187LCT, 190CLC, 184PRS, and 177CS) from the southern region, and 3 isolates (MS53, GO764, and GO1820) from the central region (Fig. 1).

PCR-RFLP analysis. PCR-RFLP amplification of the ITS region of the rDNA gene cluster with primers SR6R and LR1 generated an approximately 600-bp PCR product for all *H. capsulatum* isolates (26). Sau96I and HhaI were selected for RFLP analysis based on the presence of at least one cleavage site for *H. capsulatum* and on generation of several fragments that should be easily distinguished on a conventional agarose gel. Examination of the 600-bp PCR product containing the ITS1-5.8S-ITS2 sequence revealed species-specific variations in restriction enzyme (RE) cut sites. Double digestion with Sau96I and HhaI cut the ITS1-5.8S-ITS2 PCR product of *H. capsulatum*, and based on visual analysis of the results the isolates were divided into three molecular types, which were designated molecular types I, II, and III (Fig. 1B). Digestion produced 200-, 120-, 93-, 53-, and 30-bp fragments for molecular type I isolates, 200-, 150-, 120-, 53-, and 30-bp fragments for molecular type II isolates, and 200-, 170-, 120-, 93-, 5-, and

30-bp fragments for molecular type III isolates. The majority of the patterns obtained in the ITS region analysis corresponded to the results for the three genetic groups generated by M13 PCR fingerprinting. Of the 38 *H. capsulatum* RFLP molecular type I isolates, 36 were classified as group 1 isolates by M13 PCR fingerprinting. The exceptions, *H. capsulatum* SP2414 and 385BG, clustered in group 2. *H. capsulatum* JIEF and ES62 (group 1 as determined by M13 PCR fingerprinting) were classified as molecular type III isolates. This cluster also included *H. capsulatum* SP49, which was in group 2 as determined by M13 PCR fingerprinting. Group 3 corresponded to molecular type III, except for isolates 9414 and MS53, which were in group 3 as determined by M13 PCR fingerprinting but were molecular type I isolates as determined by PCR-RFLP analysis. Of the 51 isolates, 74.5% were molecular type I isolates, 5.9% were molecular type II isolates, and 19.6% were molecular type III isolates (Table 1).

DNA polymorphism and phylogenetic analyses of protein-encoding genes. The DNA of 51 Brazilian *H. capsulatum* isolates was amplified using previously described standardized conditions (11). As determined by the BLAST 2 program (24), all of the partial sequences of the *Arf*, H-anti, *Ole*, and *Tub1* genes of Brazilian *H. capsulatum* isolates showed high levels of similarity with sequences previously deposited in the NCBI databank, which ranged from 97% to 100%, and the insertions and/or deletions observed in the sequences demonstrated that there were some genome changes in the partial sequences of the four genes studied in our isolates. Eighty-eight informative sites were distributed among the protein-encoding genes as follows: 20 positions in the *Arf* gene, 28 positions in the H-anti gene, 19 positions in the *Ole* gene, and 21 positions in the *Tub1* gene.

The phylogenetic tree for the four genes analyzed by either the neighbor joining (NJ) or maximum parsimony (MP) method (Fig. 2) contained the following three distinct clades: BrHc1 (with subclades BrHc1A, BrHc1B, BrHc1C, and BrHc1D), BrHc2, and BrHc3 (Fig. 2). Bootstrap values less than 70% are not shown in Fig. 2. The majority of the *H. capsulatum* soil and animal isolates from Rio de Janeiro were grouped in subclade BrHc1A. The majority of the clinical *H. capsulatum* isolates from the same locality also were in this

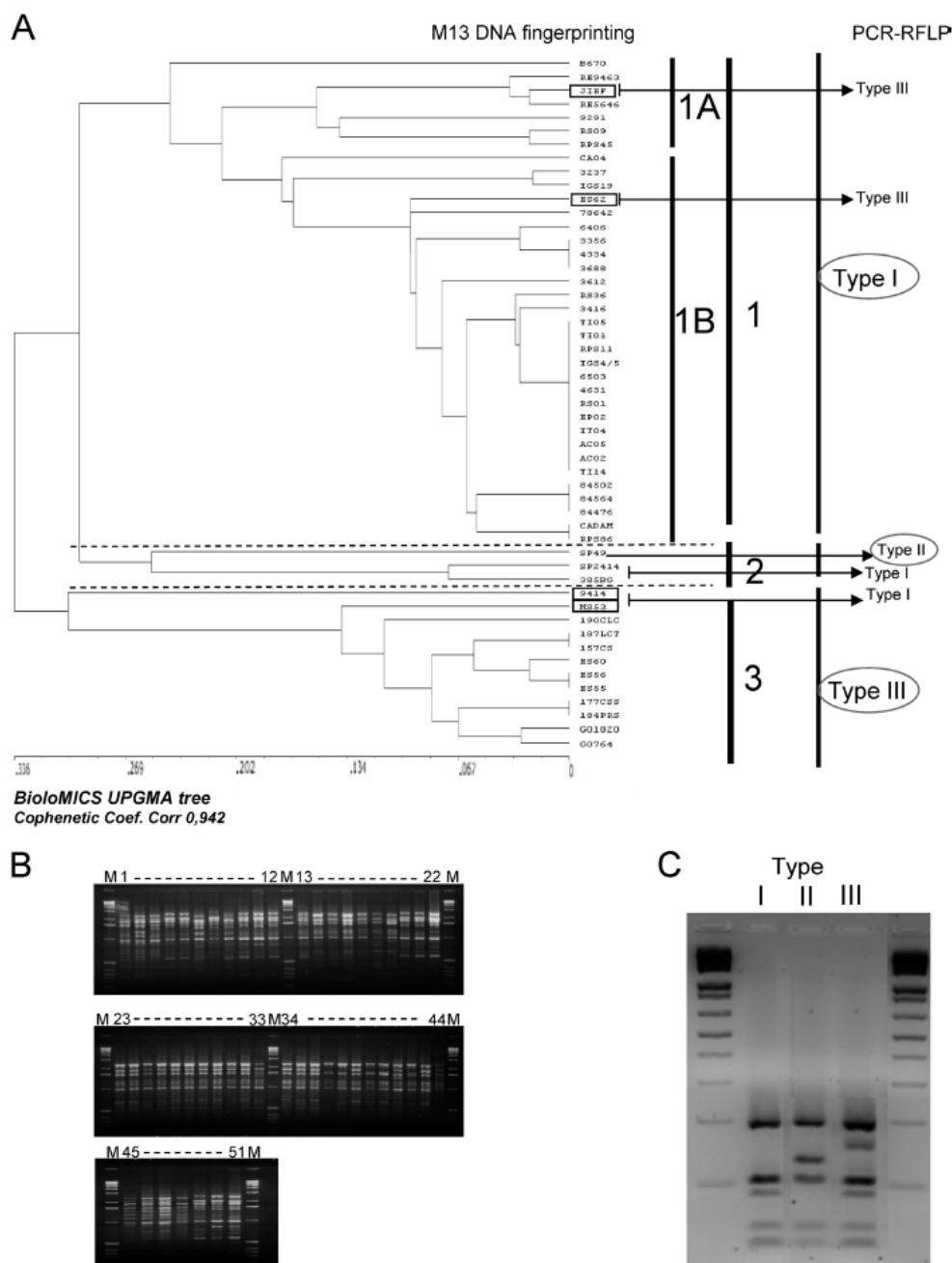


FIG. 1. (A) M13 fingerprints of 51 *H. capsulatum* isolates generated by BioMICS version 7.5.80 (BioAware, Hannut, Belgium). (B) Electrophoretic profiles of 51 *H. capsulatum* isolates subjected to M13 PCR fingerprinting. (C) DNA banding patterns obtained for *H. capsulatum* isolates by PCR-RFLP analysis.

clade or subclade. Subclade BrHc1B was comprised of two clinical isolates from Rio de Janeiro (78642 and B670). Three clinical isolates, also from Rio de Janeiro (84476, 84502, and 84564) formed subclade BrHc1C, which was the same topology

found by M13 PCR fingerprinting. Subclade BrHc1D was represented by two isolates recovered from Mato Grosso do Sul (385BG) and São Paulo (SP 2414). Clade BrHc2 included 12 strains, including 4 isolates (ES55, ES56, ES60, and ES62)

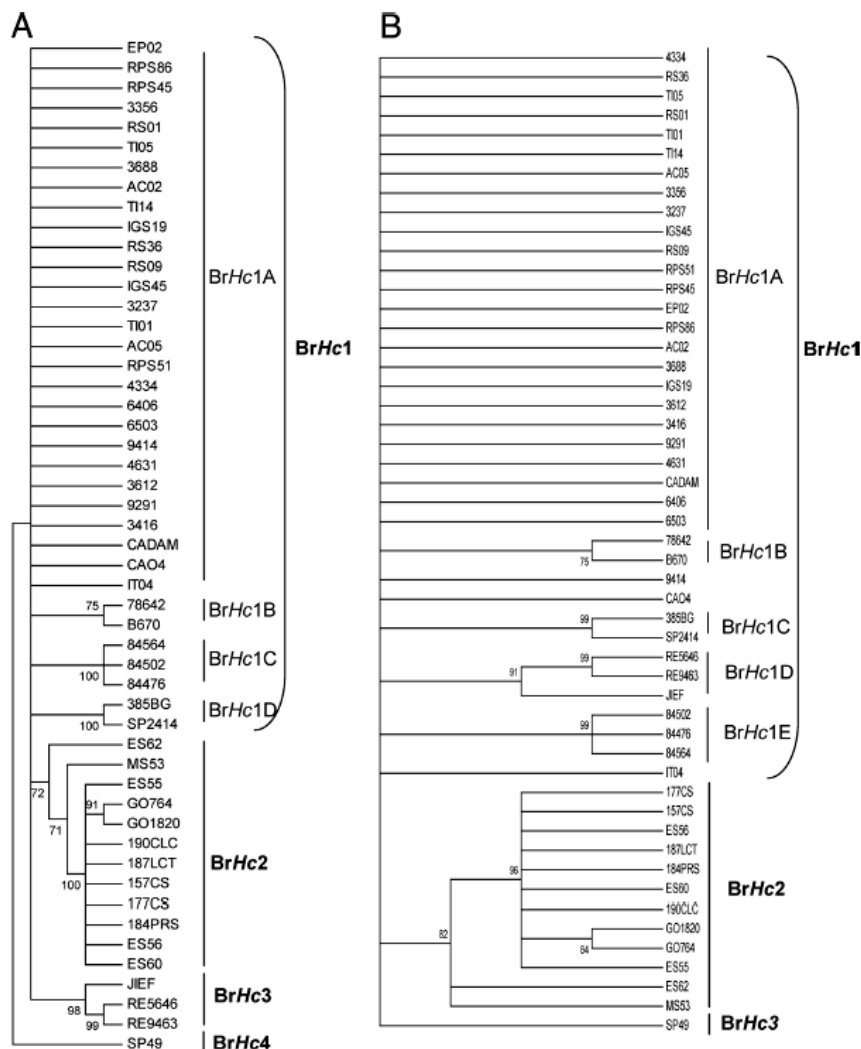


FIG. 2. Evolutionary relationships of 51 taxa. (A) NJ tree based on analysis of combined data for the four loci. The branch lengths are proportional to distance. The evolutionary distances were computed using the maximum composite likelihood method. (B) Strict consensus for 176 MP trees derived from analysis of the same data for the four loci. The MP tree was obtained using the close-neighbor interchange algorithm. The numbers at the nodes are percentages and indicate the levels of support based on 500 bootstrap replications of the parsimony procedure; only values greater than 70% are shown. There were a total of 1,432 positions in the final data set. Phylogenetic analyses were conducted using MEGA4.

from the Espírito Santo states (southeast), 5 isolates (157CS, 187LCT, 190CLC, 184PRS, and 177CS) from Rio Grande do Sul (south), and 3 isolates (MS53, GO764, and GO1820) from central Brazil. Interestingly, the grouping of all of these isolates was similar to the grouping in PCR-RFLP molecular type III, except for MS53 from Mato Grosso do Sul (molecular type I). Three isolates from the northeast region, JIEF from Ceará and RE5646 and RE9463 from Pernambuco, were closely related genetically to clade BrHc1 only in the NJ analysis and formed clade BrHc3. All isolates were grouped in the three clades described above, except for *H. capsulatum* SP49 from São Paulo, which was considered a unique representative of another clade, clade BrHc4 (Fig. 2).

Relatedness among Brazilian ITS1-5.8S-ITS2 sequences and other sequences from a public data bank. We subjected the ITS1-5.8S-ITS2 sequences that we generated to BLAST analysis with data sets for *H. capsulatum* sequences in the NCBI public databank in order to assess the relationship between our Brazilian isolates and *H. capsulatum* isolates from other countries. We selected sequences that provided 100% query coverage and exhibited maximum similarity. The analysis of the evolutionary relationship of the 70 taxa (Brazilian isolates plus isolates from other countries) was conducted using Mega 4. The gene tree contained three distinct major clades designated clades A, B, and C. Analysis of the data sets identified demonstrated that the sequences of isolates from other

countries comprised clade A (Fig. 3). Twenty-one of our Brazilian isolates were also included in this clade. Twenty-four of our isolates from Rio de Janeiro State were in clade B, and they shared 100% similarity with a previously described Brazilian isolate (accession no. AB055234) (5, 23) (Fig. 3). Six additional Rio de Janeiro State isolates were distinctly categorized as members of clade C.

DISCUSSION

This study of *H. capsulatum* isolates from different Brazilian regions was undertaken in an attempt to set up a network of mycology laboratories to study the distribution of this fungus and to determine if specific molecular genotypes predominate in the participating states of Brazil, as previously described for *Cryptococcus neoformans* isolates (9). We used three different molecular typing techniques with a set of 51 Brazilian environmental, animal, and human *H. capsulatum* isolates. Three major clusters were formed when M13 PCR fingerprinting, PCR-RFLP analysis of the ITS1-5.8S-ITS2 region of the rDNA locus, and phylogenetic analysis of four protein-encoding genes were used.

We reported previously that RAPD analysis was a useful tool for identifying molecular types of *H. capsulatum* in different geographic regions of Brazil (32). However, we show here that a different PCR-based typing method, M13 PCR fingerprinting, revealed high levels of polymorphism for isolates in a specific region. Furthermore, the relationship among the *H. capsulatum* isolates was not uniform in terms of geographical region. Although the DNA fingerprinting analysis also divided the set of Brazilian *H. capsulatum* isolates into three major groups (groups 1, 2, and 3), the groups exhibited a high level of polymorphism, especially groups 2 and 3, which were composed of *H. capsulatum* isolates from different Brazilian regions. Interestingly, *H. capsulatum* strain SP 49 from São Paulo formed a separate group. These data suggest that more than one genotype can be present in a geographic region. Meanwhile, we cannot eliminate the possibility that patients who initially acquired the fungus in one geographically distinct location migrated to another geographic location. The M13 PCR fingerprinting analysis revealed distinct polymorphic DNA profiles with high levels of discrimination. An exception was the *H. capsulatum* soil and animal isolates from Rio de Janeiro, since in both M13 PCR fingerprinting and PCR-RFLP analyses these isolates clustered in the same clade or group. These data suggested that these isolates could be autochthonous isolates and could be used as molecular markers for autochthonous strains from a region.

Similar results were obtained when a PCR-RFLP analysis was performed with this set of isolates. Three molecular types were generated. Of the 51 isolates examined by using PCR-RFLP, 6 (11.7%) grouped differently than they grouped when the M13 PCR fingerprinting method was used. The SP2414 isolate from São Paulo and the 365BG isolate from Mato Grosso do Sul were molecular type I isolates (based on PCR-RFLP profiles), but they clustered with group 2 when M13 PCR fingerprinting was used. The MS53 (Mato Grosso do Sul) and 9414 (Rio de Janeiro) isolates were molecular type I isolates (based on PCR-RFLP profiles); however, they were classified in group 3 when M13 PCR fingerprinting was used.

Despite this disagreement between the M13 and PCR-RFLP typing results, these isolates were distinctly different from the other isolates when either method was used. A similar situation was observed with the ES62 and JIEF isolates, as they were categorized as molecular type III isolates by the PCR-RFLP method but were in group 1 when M13 PCR fingerprinting was used. These findings suggested that *H. capsulatum* molecular types are dispersed around the country. Thus, the previous hypothesis that a specific genotype is present exclusively in each Brazilian region (32) should be abandoned.

We previously reported that the population structure of *H. capsulatum* as determined by analysis of DNA sequences of partial protein-encoding genes (*Arf*, the H-anti gene, *Ole*, and *Tub1*) (5) was phylogenetically diverse in Brazil. The Brazilian isolates were placed in clade Lam A. It was also suggested that *H. capsulatum* comprises at least seven phylogenetic species, including two Latin American species (4). In this study, the phylogeny of 51 geographically diverse *H. capsulatum* isolates from different Brazilian states was evaluated using nucleotide sequences of the *Arf*, H-anti, *Ole*, and *Tub1* genes. Phylogenetic analyses did not reveal differences in NJ and MP tree topologies and even showed that there was clustering of isolates RE5646, RE9463, and JIEF, which were closely related to clade BrHc1 in the NJ analysis. This finding was obtained in an MP analysis as well, although the topology was slightly different. In fact, this clustering corroborates the similar results obtained with all methods used in this work. This study allowed robust analysis of a set of Brazilian *H. capsulatum* isolates from different geographic regions, and there were three major clusters (clades BrHc1, BrHc2, and BrHc3), as well as clade BrHc4, in each of the four protein-encoding gene trees examined. These data corroborated our initial findings that demonstrated that the phylogenetic population in Brazil is varied (32). Although the genetic separation among the three major clades is considerable, certain isolates exhibited geographic clonality, suggesting that there is partial clonal spread of *H. capsulatum* within Brazil. However, migration, trips, and tourism could be responsible for some of the diversity identified. Interestingly, all of the *H. capsulatum* isolated in Rio de Janeiro State were classified as clade BrHc1 isolates.

The relatedness among Brazilian ITS1-5.8S-ITS2 sequences and other sequences obtained from the public data bank revealed that the majority of Rio de Janeiro *H. capsulatum* isolates ($n = 30$) were genetically distinct from the isolates from other Brazilian states, as well from isolates from other Latin American countries or other continents. The high level of genetic similarity among these isolates suggests that only one genetic population is present in the Rio de Janeiro's microenvironment. As noted above, we cannot rule out migration of patients to other geographically distinct locations as a possible explanation of the clustering of the ITS1-5.8S-ITS2 sequences of the four clinical *H. capsulatum* isolates (84502, 84476, 84564, and 9414) from Rio de Janeiro in clade A. Our analyses suggest that *H. capsulatum* can be divided into different molecular types that are dispersed around the world. Another interesting aspect was the finding that clades B and C exhibited some geographic specificity, which agrees with previous reports (23).

In general, 84.3% concordance was found for the results obtained with the three molecular typing methods used for our 51 isolates, M13 PCR fingerprinting, PCR-RFLP analysis, and

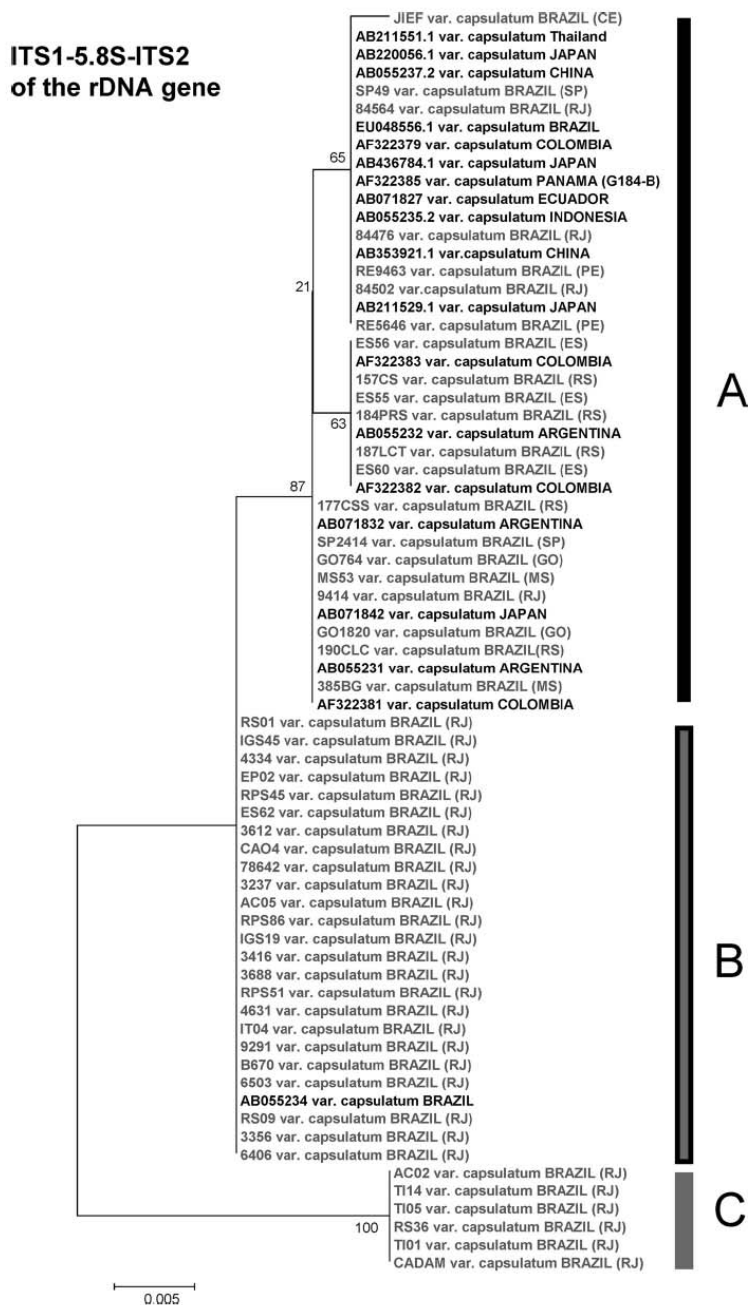


FIG. 3. Evolutionary relationships of 70 taxa (linearized) based on analysis of ITS1-5.8S-ITS2 of the rDNA gene. The evolutionary history was inferred using the neighbor-joining method. The percentages of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (500 replicates) are indicated at the nodes. The phylogenetic tree was linearized by assuming that the evolutionary rates in all lineages were equal. The tree is drawn to scale, and the branch lengths are in the same units as the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the maximum composite likelihood method and were expressed as the number of base substitutions per site. There were a total of 418 positions in the final data set. Abbreviations: RJ, Rio de Janeiro; SP, São Paulo; PE, Pernambuco; ES, Espírito Santos; CE, Ceará; RS, Rio Grande do Sul. All Brazilian *H. capsulatum* sequences are indicated by normal type, and sequences of isolates from other countries are indicated by bold type. Phylogenetic analyses were conducted using MEGA4 (4).

analysis of the sequences of four partial genes encoding proteins (Table 1), suggesting that each of these approaches or combinations of these approaches can be used in future analyses of the genetic diversity of *H. capsulatum* populations.

It has been reported that comparisons of methods should be based on several parameters, such as typeability, reproducibility, and the index of discrimination, in order to assess which typing method is the most efficient (3). The cophenetic correlation coefficient (0.942) and the excellent discriminatory index (0.915) obtained in the M13 PCR fingerprinting analysis indicate the efficiency of this method. The cophenetic correlation for a cluster tree is defined as the linear correlation coefficient for the cophenetic distances obtained from the tree and the original distances (or dissimilarities) used to construct the tree. Thus, it is a measure of how faithfully the tree represents the dissimilarities among observations. This value should be very close to 1 for a high-quality solution. This measure can be used to compare alternative cluster solutions obtained using different algorithms. The bootstrap analysis of the four genes in Brazilian *H. capsulatum* isolates supported the data obtained with the other methods, and the analysis showed the stability of the individual clades.

The methods produced complementary results and grouped all isolates into three major genetic clusters. In addition, the phylogenetic analysis of the relationship of 70 strains from different regions of Brazil ($n = 51$) and other countries ($n = 19$) using DNA sequence analysis of the ITS region provided information useful for understanding fungal dissemination, the genotypes in Latin America, and evidence for autochthonous or imported cases. Finally, this information confirmed that there is not just one specific genotype in distinct regions of Brazil.

The analysis of our results indicates that the three methods used in this study are reliable and reproducible and have similar sensitivities. Hence, these techniques can be used in a standardized approach for typing *H. capsulatum*. As noted previously, there has not been a consensus concerning the most effective method for molecular typing of *H. capsulatum* (31). We demonstrated that the M13 PCR fingerprinting method has important advantages compared to the other methods tested in this work. M13 PCR fingerprinting is more rapid, less expensive, and requires less technical expertise than PCR-RFLP and sequencing analyses. Furthermore, these advantages are especially valuable in situations where laboratory facilities are relatively limited.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support for this work was provided by PAPES IV Program (Fiocruz/CNPq) grant Proc. 400175/98-3. R.M.Z.-O. was supported in part by CNPq grant 350338/2000-0. This work was also supported by research grant 352303 from the National Health and Research Council of Australia to W.M. M.D.M.M. was supported in part by Fogarty International Center Interhemispheric Research Training Grant in Infectious Diseases NIH D43-TW007129. J.D.N. was supported in part by NIH grant AI056070-01A2 and by the Center for AIDS Research at the Albert Einstein College of Medicine and Montefiore Medical Center (NIH grant AI-51519).

We thank A. L. Q. Torres (IPEC/CNPq) for help with illustrations.

REFERENCES

- Don, R. H., P. T. Cox, B. J. Wainwright, K. Baker, and J. S. Mattick. 1991. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 19:4008.
- Hamrick, J. L., R. W. Lichtwardt, and C. Lan. 1986. Levels of isozyme variation within and among *Histoplasma capsulatum* localities. *Trans. Kans. Acad. Sci.* 89:49-56.
- Hunter, P. R., and M. A. Gaston. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26:2465-2466.
- Kasuga, T., J. W. Taylor, and T. J. White. 1999. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. *J. Clin. Microbiol.* 37:653-663.
- Kasuga, T., T. J. White, G. Koenig, J. McEwen, A. Restrepo, E. Castaneda, C. Da Silva Lacaz, E. M. Heins-Vaccari, R. S. De Freitas, R. M. Zancop-Oliveira, Z. Qin, R. Negroni, D. A. Carter, Y. Mikami, M. Tamura, M. L. Taylor, G. F. Miller, N. Poonwan, and J. W. Taylor. 2003. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol. Ecol.* 12:3383-3401.
- Kaufman, C. A. 2007. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. *Clin. Microbiol. Rev.* 20:115-132.
- Keath, E. J., G. S. Kobayashi, and G. Medoff. 1992. Typing of *Histoplasma capsulatum* by restriction fragment length polymorphisms in a nuclear gene. *J. Clin. Microbiol.* 30:2104-2107.
- Keath, E. J., A. A. Painter, G. S. Kobayashi, and G. Medoff. 1989. Variable expression of a yeast-phase-specific gene in *Histoplasma capsulatum* strains differing in thermotolerance and virulence. *Infect. Immun.* 57:1384-1390.
- Meyer, W., A. Castaneda, S. Jackson, M. Huynh, and E. Castaneda. 2003. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg. Infect. Dis.* 9:189-195.
- Meyer, W., K. Marszewska, M. Amirmostofian, R. P. Igreja, C. Hardtke, K. Methling, M. A. Viviani, A. Chindamporn, S. Sukroongreung, M. A. John, D. H. Ellis, and T. C. Sorrell. 1999. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA—a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis* 20:1790-1799.
- Muniz, M. M., C. V. Pizzini, J. M. Peralta, E. Reiss, and R. M. Zancop-Oliveira. 2001. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains isolated from soil, animals, and clinical specimens in Rio de Janeiro State, Brazil, by a PCR-based random amplified polymorphic DNA assay. *J. Clin. Microbiol.* 39:4487-4494.
- Nei, M., and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76:5269-5273.
- Reyes-Montes, M. R., M. Bobadilla-Del Valle, M. A. Martinez-Rivera, G. Rodriguez-Arellanes, E. Maravilla, J. Sifuentes-Osorio, and M. L. Taylor. 1999. Relatedness analyses of *Histoplasma capsulatum* isolates from Mexican patients with AIDS-associated histoplasmosis by using histoplasmin electrophoretic profiles and randomly amplified polymorphic DNA patterns. *J. Clin. Microbiol.* 37:1404-1408.
- Rios-Fabra, A., A. R. Moreno, and R. E. Isturiz. 1994. Fungal infection in Latin American countries. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 8:129-154.
- Rodrigues, C. C. 2004. Avaliação da infecção por *Histoplasma capsulatum* por meio de reações intradérmicas em moradores da zona urbana e rural do Município de Pratania (SP). Ph.D. thesis. Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP Botucatu, São Paulo, Brazil.
- Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Sandhu, G. S., B. C. Klíne, L. Stockman, and G. D. Roberts. 1995. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J. Clin. Microbiol.* 33:2913-2919.
- Silva-Ribeiro, V. L., M. F. Ferreira-da-Cruz, B. Wanke, and B. Galvao-Castro. 1987. Canine histoplasmosis in Rio de Janeiro: natural and experimental infections. *J. Med. Vet. Mycol.* 25:319-322.
- Spitzer, E. D., B. A. Lasker, S. J. Travis, G. S. Kobayashi, and G. Medoff. 1989. Use of mitochondrial and ribosomal DNA polymorphisms to classify clinical and soil isolates of *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* 57:1409-1412.
- Standard, P. G., and L. Kaufman. 1976. Specific immunological test for the rapid identification of members of the genus *Histoplasma*. *J. Clin. Microbiol.* 3:191-199.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596-1599.
- Tamura, K., M. Nei, and S. Kumar. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:11030-11035.
- Tamura, M., T. Kasuga, K. Watanabe, M. Katsu, Y. Mikami, and K. Nishimura. 2002. Phylogenetic characterization of *Histoplasma capsulatum* strains based on ITS region sequences, including two new strains from Thai and Chinese patients in Japan. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 43:11-19.
- Tatusova, T. A., and T. L. Madden. 1999. BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 174:247-250.
- Vassart, G., M. Georges, R. Monsieur, H. Brocas, A. S. Lequarre, and D. Christophe. 1987. A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. *Science* 235:683-684.

26. Vilgalys, R., and M. Hester. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J. Bacteriol.* **172**:4238–4246.
27. Wheat, L. J., P. Connolly, M. Smedema, E. Brizendine, and R. Hafner. 2001. Emergence of resistance to fluconazole as a cause of failure during treatment of histoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency disease syndrome. *Clin. Infect. Dis.* **33**:1910–1913.
28. Wheat, L. J., and C. A. Kauffman. 2003. Histoplasmosis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **17**:1–19, vii.
29. Woods, J. P., E. L. Heinecke, J. W. Luecke, E. Maldonado, J. Z. Ng, D. M. Retallack, and M. M. Timmerman. 2001. Pathogenesis of *Histoplasma capsulatum*. *Semin. Respir. Infect.* **16**:91–101.
30. Woods, J. P., D. Kersulyte, W. E. Goldman, and D. E. Berg. 1993. Fast DNA isolation from *Histoplasma capsulatum*: methodology for arbitrary primer polymerase chain reaction-based epidemiological and clinical studies. *J. Clin. Microbiol.* **31**:463–464.
31. Xu, J. 2006. Fundamentals of fungal molecular population genetic analyses. *Curr. Issues Mol. Biol.* **8**:75–89.
32. Zancope-Oliveira, R. M., P. Morais e Silva Tavares, and M. M. Muniz. 2005. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains in Brazil. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **45**:443–449.
33. Zancope-Oliveira, R. M., and B. Wanke. 1987. Distribution of sources of infection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in Rio da Prata, a municipality of Rio de Janeiro (RJ). *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **29**: 243–250. (In Portuguese.)
34. Zarnowski, R., M. Miyazaki, A. Dobrzyn, J. M. Ntambi, and J. P. Woods. 2007. Typing of *Histoplasma capsulatum* strains by fatty acid profile analysis. *J. Med. Microbiol.* **56**:788–797.

10. Artigo nº 3

Gene expression: A complementary tool for typing *Histoplasma capsulatum* isolates.

Muniz MM¹, Guimarães AJ², Frases S.², Nosanchuk JD² and Zancopé-Oliveira RM¹

¹Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Brazil

²Albert Einstein College of Medicine – Yeshiva University – New York, USA

Manuscrito em revisão final para ser submetido ao J. Clin. Microbiol.

Diferentes procedimentos moleculares promovem informações complementares que pode conduzir a um entendimento mais aprofundado em termos de epidemiologia molecular. Neste trabalho investigamos se medidas quantitativas usando Real time PCR da expressão gênica poderiam ser utilizadas para elucidar a relação entre os isolados brasileiros de *Histoplasma capsulatum* que se agruparam por M13 PCR fingerprinting; por perfis de PCR-RFLP e pela seqüência parcial do gene do antígeno H. A expressão de seis genes associados com a virulência do *H. capsulatum* foi examinada durante a mudança morfológica (37°C) de 17 isolados brasileiros de *H. capsulatum*, e os resultados correlacionados com outros dois métodos de tipagem usados na epidemiologia molecular *H. capsulatum*. Este método permitiu o agrupamento dos isolados altamente relacionados. Além disso, os resultados sugerem que *H. capsulatum* sofra microevolução para facilitar adaptação ao seu ambiente.

Abstract

Different molecular approaches provide complementary information that can lead to a more complete understanding of molecular epidemiology. In this work we investigated whether quantitative real-time measurements of gene expression could be utilized to dissect the relatedness of Brazilian *Histoplasma capsulatum* isolates that cluster by M13 PCR *fingerprinting*, by PCR-RFLP profiling and by sequencing of the H antigen gene. We examined the expression of six genes associated with *H. capsulatum* virulence during the morphologic switching (37°C) among 17 *H. capsulatum* isolates from Brazil, and correlate these results with other two DNA-based typing methods used in molecular epidemiology of *H. capsulatum*. This method allowed for the separation of closely related isolates. Furthermore, the results suggest that *H. capsulatum* undergoes microevolution to facilitate adaptation to its local environment.

Introduction

The dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum* is the etiologic agent of histoplasmosis, one of the most common systemic mycoses around the world. The organism grows in soil as multicellular mold that also produces vegetative spores macroconidia and microconidia. When spores or mold fragments are aerosolized and inhaled by the host, the fungus converts to yeast form specialized for replication within host macrophages. The ability of *H. capsulatum* to switch its morphology in response to the environment can be repeated in culture by changing the incubation to favor the desired form: 25°C for mold or 37°C for yeast (Maresca et al., 1994; Maresca, 1995; Tian e Shearer, 2002). This phenomenon has allowed the identification of genes that are differentially expressed in response to temperature in several studies (Woods, 2002; Klein e Tebbets, 2007). Morphologic changes in organisms represent critical biological transitions governed by transcriptional regulators that initiate a cascade of gene expression in response to the appropriate temporal, spatial, or environmental signal (Adams et al., 1998).

Studies of prokaryotic and eukaryotic systems have identified numerous examples of morphologic responses to external signals. Several genes have been associated with morphogenesis and pathogenesis in *H. capsulatum* (Rappleye e Goldman, 2006). However,

the variability in their expression in different strains of *H. capsulatum* is poorly described. To date, just analysis of expression and interstrain variability of *YPS3* gene of this fungus has been reported (Keath et al., 1989; Bohse e Woods, 2007).

It has been described that the diversity in microorganism's isolates is not reflected only among types of strains circulating in a particular environment, but also the virulence factors associated with them (Cunningham, 2000; Carvalho et al., 2005; Sagar et al., 2008). Over the past decade, genetic tools have been improved, and demonstrated genomic variations between *H. capsulatum* environmental and clinical isolates (Keath et al., 1992; Kersulyte et al., 1992; Kasuga et al., 1999; Muniz et al., 2001; Zancope-Oliveira et al., 2005).

Typing methods are useful for understanding the natural history, epidemiology, mode of transmission, reservoir, and clinical implications of fungal infection. However, the typing methods used so far for *H. capsulatum* have not been very successful when compared with other fungi (Meyer et al., 1999). Actually, no single molecular method has yet emerged as an internationally accepted basis for typing. Diversity among *H. capsulatum* isolates has been reported at many levels (Reyes-Montes et al., 1999; Jiang et al., 2000; McEwen et al., 2000; Taylor et al., 2000; Karimi et al., 2002; Zarnowski et al., 2007). Our group recently reviewed the epidemiology of histoplasmosis in Brazil and analyze the genetic polymorphism of *H. capsulatum* isolates from different geographical regions of the country using a RAPD assay (Zancope-Oliveira et al., 2005). Here, we investigate the level of gene expression of six genes involved as virulence factor during the morphologic switching (37°C) among 17 *H. capsulatum* isolates from Brazil, and correlate these results with other three DNA-based typing methods used in molecular epidemiology of *H. capsulatum*.

Methods

***H. capsulatum* isolates and growth conditions.** Seventeen Brazilian *H. capsulatum* strains namely AC02, EP02, IGS19, IT04, RPS51, RPS86, TI01, TI04, CADAM, RS09, RS36, 3237, 78642, 187LCT, GO1820, JIEF and RE5436 were obtained in the Culture Collection of Laboratory of Mycology, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas -Fundação Oswaldo Cruz, Brazil. Their sources and geographical origins are listed in Table I. Some

of these strains had already been typed by RAPD (Muniz et al., 2001; Zancope-Oliveira et al., 2005). This set allowed us to compare the utility of our new methodology with that previously used by us. Fungal identification was done by conventional mycological methods, including morphology and the exoantigen test (Kaufman e Standard, 1978).

DNA Extraction. DNA was extracted from yeast-phase organisms grown for five days at 37°C in GYE broth medium (2% glucose and 1% yeast extract) by a procedure that involves spheroplasting, enzymatic cell lyses, phenol/chloroform/isoamyl alcohol protein precipitation, ethanol precipitation, and enzymatic treatments (RNase and proteinase K) (Woods et al., 1993). Each preparation was checked for DNA concentration in a Gene Quant pro RNA/DNA Calculator (Amershan Pharmacia Biotech, Cambridge, UK), and integrity by agarose gel electrophoresis.

PCR Fingerprinting: A PCR technique using oligonucleotides of the minisatellite-core sequence of the wild-type phage M13 (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3') was employed as single primer to amplify hypervariable genomic DNA sequences from 17 *H. capsulatum* strains (Meyer et al., 1999). Amplification reactions (50µl) consisted of 25ng of genomic DNA, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM potassium chloride, 1.5 mM magnesium chloride, 0.2 mM (each) dNTPs (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Mannheim, Germany), 3 mM magnesium acetate, 30ng of primer, and 2.5U Amplitaq DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA). PCR was performed for 35 cycles in a Perkin-Elmer thermal cycler (model 480) with 20 s of denaturation at 94°C, 1 min annealing at 50°C, and 20 s extension at 72°C, followed by a final extension cycle for 6 min at 72°C. Amplification products were removed, concentrated to approximately 20 µL in order to estimate PCR products size and to perform gel normalization, molecular weight markers consisting of a 100bp DNA ladder (Invitrogen) were electrophoresed concurrently. Amplicons were analyzed on a 1.5% agarose gel containing 0.5 µg of ethidium bromide/ml at 60 V for 5 h, and visualized under UV light. All visualized bands on the gel were counted, and data were scored for the presence or absence of amplification products. All visible bands were included in this analysis regardless of their intensity. The reproducibility of this method was confirmed when identical electrophoretic profiles were observed in PCR assays repeated at least three times under the same conditions.

PCR RFLP (rRNA gene): PCR of the rDNA gene was conducted in a final volume of 50 μ L. Each reaction contained 50 ng of DNA, 1X PCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂; Applied Biosystems, Foster City, CA), 0.2 mM each of dATP, dCTP, dGTP, and dTTP (Roche Diagnostics GmbH), 3 mM magnesium acetate, 1.5 U AmpliTaq DNA polymerase (Applied Biosystems), and 50ng of each primer SR6R 5'-AAGTARAAGTCGTAACAAGG-3' and LR1 5'-GGTTGGTTTCTTTTCCT-3'. PCR was performed in a Perkin-Elmer thermal cycler (model 480) at 94°C for 2-min initial denaturation, and 35 cycles 45 s of denaturation at 94°C, 1 min annealing at 61°C, 2-min extension at 72°C, followed by a final extension cycle for 10 min at 72°C. Amplification products were mixed with one fifth volume of loading buffer, 20 μ L of PCR products were double digested with *Sau*96I (10 U/ μ L) and *Hha*I (20 U/ μ L) for 3 h or overnight and separated by 3% agarose gel electrophoresis at 100 V for 5 h. RFLP patterns were assigned visually by the obtained patterns.

Sequencing of H antigen precursor gene partial sequence: For sequencing and phylogenetic analyses DNA segments from *H. capsulatum* strains, comprising partial sequence of H antigen precursor gene primers H-ANTI3 (5'-CGCAGTCACCTCCATACTATC-3') e H-ANTI4 (5'-GCGCCGACATTAACCC-3'). Amplification reactions (50 μ L) consisted of 100ng genomic DNA, 0.45 mM of each primer, 1.0 U of AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer), 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, and 0.2 mM dNTPs (Perkin Elmer) with the following temperature profile: a 15s DNA denaturation step at 94°C, a 30s annealing step (see below), and a 1 min extension step at 72°C for 32 cycles, followed by a 5min final extension step at 72°C. The annealing temperature in the first cycle was 65°C. This annealing temperature was subsequently reduced by 0.7°C/cycle for the next 12 cycles, and thereafter, the PCR was continued at an annealing temperature of 56°C for the remaining 20 cycles (Touchdown PCR) (Don et al., 1991).

Total RNA extraction and cDNA sybthesis: Seventeen Brazilian *H. capsulatum* isolates (Table I) were chosen in order to obtain the level of gene expression of six genes coding to M antigen, H antigen, HSP60, α (1,3) glucan, CBP1 and SID1 putative virulence factors. The *H. capsulatum* isolates were grown in Ham-F12 broth at 37°C for 72 hours under constant shaking at 120 rpm. The recovered yeast cells were submitted to the total RNA

extraction by using Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. cDNA synthesis was carried out from equal amounts of RNA using SuperScript III First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen).

Real-time reverse-transcribed PCR (qRT-PCR) conditions: The expression of, M antigen gene, H antigen precursor gene, heat shock protein 60 (*HSP60*) gene, hypothetical protein similar to α -1,3-glucan synthase, calcium-binding protein precursor (*CBP1*) and L-ornithine monooxygenase (*SID*) gene was analyzed by real time RT-PCR. The expression of the six genes was examined via RT-PCR with the primers design for each one gene mentioned above (Table II) using Gene Runner Version 3.05 Hasting software Inc. For an internal mRNA control, we used specific primers for the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) gene. To confirm that similar concentrations of cDNA were achieved, the signals from *GADHP* were compared. The genes transcript levels were determined and quantitatively assessed using a Bio-Rad iQiCycler and Cycler iQ software, respectively. The cycling conditions used were 95°C for 5 min and 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 30 s. Next, the samples were cooled to 55°C, and a melting curve for temperatures between 55°C and 95°C with 0.5°C increments was recorded. Real-time expression measurements were normalized against the expression of the reference gene, GAPDH. The relative RNA levels were calculated by using the threshold cycle ($2^{-\Delta\Delta CT}$) Livak method (Livak e Schmittgen, 2001); all primers resulted in amplification efficiencies of at least 95%.

Sequencing. Automated sequencing was done using the Sequencing Facility of Albert Einstein College of Medicine-New York, USA. Sequences were generated from both strands and were assembled and edited by using the Sequencher ver. 4.6 software package (Gene Codes Corporation, USA).

Computational Analysis: - The similarity coefficient for each isolate was calculated using the Dice algorithm, by using the NTSYSpc version 2.02 Applied Biostatistics Inc. For clustering, the unweighted pair-group method with arithmetic means (UPGMA) was used for M13 DNA fingerprinting analysis. The same statistic program was used to perform common principal components analysis (CPCA) and the cophenetic value (COPH) applied in the gene expression analyses.

Phylogenetic analyses for H antigen partial gene were performed by using Mega 4.0 software. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method [1]. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (500 replicates) is shown next to the branches. The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method and are in the units of the number of base substitutions per site. All positions containing gaps and missing data were eliminated from the dataset (Complete deletion option). There were a total of 412 positions in the final dataset.

Statistical analysis. The results of gene expression were subjected to statistical analysis using GraphPad Prism 5 version 5.1 (GraphPad software, INC). P values were calculated by 1 way ANOVA test (analysis of variance), P values of < 0.05 were considered significant.

Results

The identity of all *H. capsulatum* isolates was confirmed by molecular sequencing data of the ITS1-ITS2 and the 5.8S of the rDNA. GenBank search revealed that the sequences showed 98 to 100% similarity with *A. capsulatus* as previously described and deposited in the GenBank supporting thus the morphological identification by mycological procedures.

The geographic origin and source of all *H. capsulatum* strains studied herein are described in Table 1. Representative M13 PCR fingerprinting profile obtained with the primer M13 from all 17 *H. capsulatum* samples, including 3 animal, 8 environmental, and 6 clinical isolates are shown in Figure 1B. Several PCR fingerprinting profiles were generated, indicating a high genetic diversity among the *H. capsulatum* strains isolated from different geographic regions of Brazil. Genetic relationships obtained by UPGMA analysis are represented as a dendrogram, Cophenetic value (COPH=0.987). The 17 *H. capsulatum* isolates were grouped in two clusters. The major Cluster 1 was composed of 15 *H. capsulatum* isolates from different sources (Table 1), exhibiting from 75 to 100% relatedness among them. A clear separation into five subclusters (1A, 1B, 1C, 1D and 1E) was observed within this cluster. Subcluster 1A accounted for two isolates from Northeast; one from Pernambuco (RE5646) and one from Ceará State (JIEF). *H. capsulatum* isolate

IGS19 and isolate 78642 from Rio de Janeiro State (Southeast-SE) were grouped in Subcluster 1B, and 1E, respectively. Eleven isolates from Rio de Janeiro with high degree of relatedness (over 90%) among them formed Subclusters 1C and 1D. Cluster 2 included only two *H. capsulatum* isolates (GO1820 and 187LCT) and its relatedness among the others isolates has shown closer relationship between subcluster 1A (RE5646 and JIEF).

PCR-RFLP amplification of the ITS region of the rDNA gene cluster with the primers SR6R and LR1 generated a PCR product of approximately 600 bp from all *H. capsulatum* isolates (data not shown). The selection of *Sau96I* and *HhaI* for RFLP analysis was based on the presence of at least one cleavage site for *H. capsulatum*, and the generation of several fragments that should easily be distinguishable on a conventional agarose gel. Examination of the 600 bp PCR product containing the ITS1-5.8S-ITS2 sequence revealed species-specific variations of restriction enzymes (RE) cut sites. The double digestion with *Sau96I* and *HhaI* cut the ITS1-5.8S-ITS2 PCR product of *H. capsulatum* producing fragments of type I (200, 120, 93, 53 and 30 bp) and type II (200, 170, 120, 93, 53 and 30 bp). The RFLP patterns generated by digestion with *Sau96I* and *HhaI* divided all isolates into two groups (Fig. 1C), which corresponded exactly with two molecular types generated by PCR fingerprinting. RFLP Type I and II correspond to Cluster 1 and 2, respectively. Over the 17 isolates it was found 82% belonged to type I, and 18% to type II.

We verified the status of *M antigen*, *H antigen*, *HSP60*, $\alpha(1,3)$ *glucan*, *CBP1* and *SIDI* genes expression using a real-time RT-PCR normalized with a reference gene (GAPDH) from the reference *H. capsulatum* G217B strain, and all the values obtained was based on this calibrator. These data generated a logarithmic graphic and statistical analysis conducted by GraphPad Prism v.5. The gene expression of each isolate demonstrated by qRT-PCR a differential expression but it was possible to obtain several different profiles. One-way analysis of variance (ANOVA) has shown a p value of 0,0013 statically significant ($p < 0.05$). In order to establish the relatedness among them a matrix was done using an empiric strategies based on results of logarithmic graphic i.e. lower and higher values by using G-217B gene expression value as a calibrator. Figure 2 shows the gene expression patterns (P) obtained from the 17 *H. capsulatum* included in this analysis. A

dendrogram has been done by NTSYSpc version 2.02 Applied Biostatistics Inc. including Principal Component Analysis (Fig. 3)

The comparison among G217B as a reference strain and Brazilian isolates ratios has shown two types of profile. Pattern 1 exhibited lowest levels of gene expression for M and H antigen, as well CBP gene, and $\alpha(1,3)$ glucan and HSP60 were highest expressed. Four genes [M, H, $\alpha(1,3)$ glucan, CPB] showed highest expression levels in *H. capsulatum* RE5646, GO1820, 187LCT, JIEF forming Pattern 2. The expression of HSP60 was lower in these isolates when compared with Pattern 1. The level of expression for SID1 gene in both Pattern 1 and 2 with exception of *H. capsulatum* IT04 and 187LCT isolate that showed higher expression of SID1 (Fig.2).

Pattern 1 was compound of environmental, and veterinary *H. capsulatum* isolates in the majority and just two isolates obtained from patient, and was divided in four distinct sub-patterns. Five isolates (AC02, EP02, RPS51, TI14, 78642) formed Pattern 1A, one isolate Pattern 1B (IGS19), six isolates (RPS86, TI01, CADAM, 3237, RS09, RS36) Pattern 1C, and one isolate (IT04) Pattern 1D. All of them belong to RFLP Type I. Pattern 2 was composed of four clinical isolates subdivided in the Pattern 2A (RE5646, GO1820, JIEF), and 2B (187LCT).

Partial sequence of H antigen gene was correlated to the results obtained in the molecular typing methods and gene expression levels. The 17 *H. capsulatum* isolates show intravariation at the DNA level (Fig.4), separating the two genotypic groups (HSeq). All *H. capsulatum* isolated at Rio de Janeiro were grouped into HSeq 1A, and did not presented any intravariation. HSeq 1B was formed by JIEF and RE5646 *H. capsulatum* isolates In the other group (Pattern 2) composed by 187LCT and GO1820.

Discussion

For the first time, the level of gene expression of six genes involved as virulence factor were used as a complementary tool for typing *H. capsulatum* isolates. We applied three different molecular typing techniques to a set of 17 environmental, animal, and human Brazilian *H. capsulatum* isolates, and correlated these results with the level of M antigen, H antigen, HSP60, $\alpha(1,3)$ glucan, CBP1 and SID1 genes expression. Two major clusters were formed using PCR *fingerprinting* with the minisatellite specific primer M13,

PCR-RFLP analysis of the ITS1-5.8S-ITS2 region of the rDNA gene cluster, and phylogenetic analyses of six protein's gene expression levels. These findings demonstrate marked interstrain diversity in the expression of these six genes.

We previously reported that the genotyping analysis was a useful tool to identify molecular types of *H. capsulatum* in a set of Brazilian *H. capsulatum* isolates (Zancopé-Oliveira et al., 2005). Now, we show that a phenotypic typing method, the analyses the level of gene expression of six genes, also revealed high polymorphism among isolates within a specific region. Interestingly, in both approaches, genotyping and phenotyping analyses divided the set of Brazilian *H. capsulatum* isolates into two major Groups 1, 2/Molecular Type I and II/ Hseq 1 and 2, and gene expression Pattern 1 and 2. The reason for this polymorphism is not clear, but it could be due mutations points in those genes, and consequently changing the phenotypic expression.

It has been demonstrated in several reports about host-parasite relationship that *H. capsulatum* as an environmental mold found in the soil must participate as a member of a competitive polymicrobial ecosystem and in parasitism faces a variety of environmental changes and must survive under harsh conditions or modulate its microenvironment to achieve success as a pathogen (Woods, 2002). These conditions could be interfering in the highest or lowest expression of some genes associated to virulence. However, it was impossible to associate those changes with the level of the genes expression in this study since it was applied Emmons's protocol (Emmons, 1949) to obtain all *H. capsulatum* isolated from soil, with a animal passage, instead inoculate soil directly onto agar slant media.

The comparison of the gene expression profiles among *H. capsulatum* strain IGS19 from soil of Ilha Grande, RJ and strains RS09 and RS36 isolated from captured animals of the same locality demonstrated different profiles grouped as 1A and 1C, respectively. These data suggested the occurrence of an adaptative process dependent of the environment, and/or microevolution. The lowest expression of $\alpha(1,3)$ glucan by *H. capsulatum* IGS19 among all the isolates studied strongly support the hypothesis suggested above. However, we can not discard the occurrence of two distinct populations sharing the same sites in Ilha Grande, RJ. Notably, this methodology probably would be useful in the detection of

adaptative process. So, new studies should be conducted in order to check the applicability of it in the detection of evolutive process in fungi.

The use of this methodology could be also important on the laboratorial diagnosis of histoplasmosis, since it permits to evaluate *H. capsulatum* isolates with the highest level of M and H antigen expression, considered up to now as pluripotent antigens in the immunodiagnostic of histoplasmosis (Deepe e Durose, 1995; Zancope-Oliveira *et al.*, 1999). These isolates could be used as reference *H. capsulatum* strains for the antigen production allowing interlaboratorial comparisons.

The *H. capsulatum* recovered from soil and animal isolates in Rio de Janeiro included in this study were clustered into the same gene expression Pattern 1, as well in both M13 PCR fingerprinting (Group 1) and PCR-RFLP (Molecular Type I), corroborating again their autochthonous nature, and could be used as molecular marker in typing studies by comparing *H. capsulatum* isolated in Rio de Janeiro State as previously suggested by us (Muniz et al, 2009 SUBMITTED).

Kasuga et al (2003) reported that the population structure of *H. capsulatum* by sequencing of partial gene sequences coding protein *ARF*, *H-ANTI*, *OLE* and *TUB1* was phylogenitically diverse in Brazil. The Brazilian isolates were categorized in the clade Lam A. It was also suggested that *H. capsulatum* comprises at least seven phylogenetic species, including two Latin American species. In this study, phylogeny of 17 geographically diverse *H. capsulatum* isolates from different Brazilian states was evaluated using partial nucleotide sequences of the H-anti gene, grouping this set of Brazilian *H. capsulatum* isolates in two major clusters (HSeq1A, and B and HSeq2). These data corroborated the data generated by the analyses of gene expression, and show pronounced variations on genotypic (Fig.4) and level of gene expression on Pattern 2, and indicate the importance to apply more than one methodology.

The comparison among the Brazilian isolates and the reference strain G217B demonstrated two different profiles among the Brazilian isolates. These differences were expected since in previous studies *H. capsulatum* isolates were clustered into two distinct groups (LAm A and LAm B) (Kasuga et al., 1999; Kasuga et al. 2003). The presence of two different gene expression profiles could be the reason for this event, but future studies should be made to confirm this hypothesis.

Legends

Fig. 1. (A) Dendrogram conducted by NTSYSpc version 2.02 Applied Biostatistics Inc. (B) M13 DNA fingerprinting electrophoretic profile of 17 Brazilian *H. capsulatum* isolates. (C) PCR-RFLP pattern from ITS1-5.8S-ITS2 double digested with *Sau96I* and *HhaI*

Fig. 2. (A) Ratio of expression represented by logarithmic graphic conducted by GraphPad Prism 5. (B) Dendrogram generated by NTSYSpc version 2.02 Applied Biostatistics Inc

Fig. 3. Spatial position of *Histoplasma capsulatum* isolates based on principal components analysis (PCA). The clusters are designated by roman numerals. Profile I includes *H. capsulatum* isolates from soil - animal and clinical isolates; Profile II is composed from clinical isolates

Fig. 4. Correlation between two methodologies. (A) Profile of gene expressions from six genes involved as virulence factors – Coefficient Dice using UPGMA – NTSYS software. (B) H antigen gene partial sequence using Neighbor Joining Method conducted by Mega software Inc. with a 500 replicates bootstrap support index. (C) Informative sites observed in partial sequence of H antigen precursor gene of 17 Brazilian *H. capsulatum* isolates

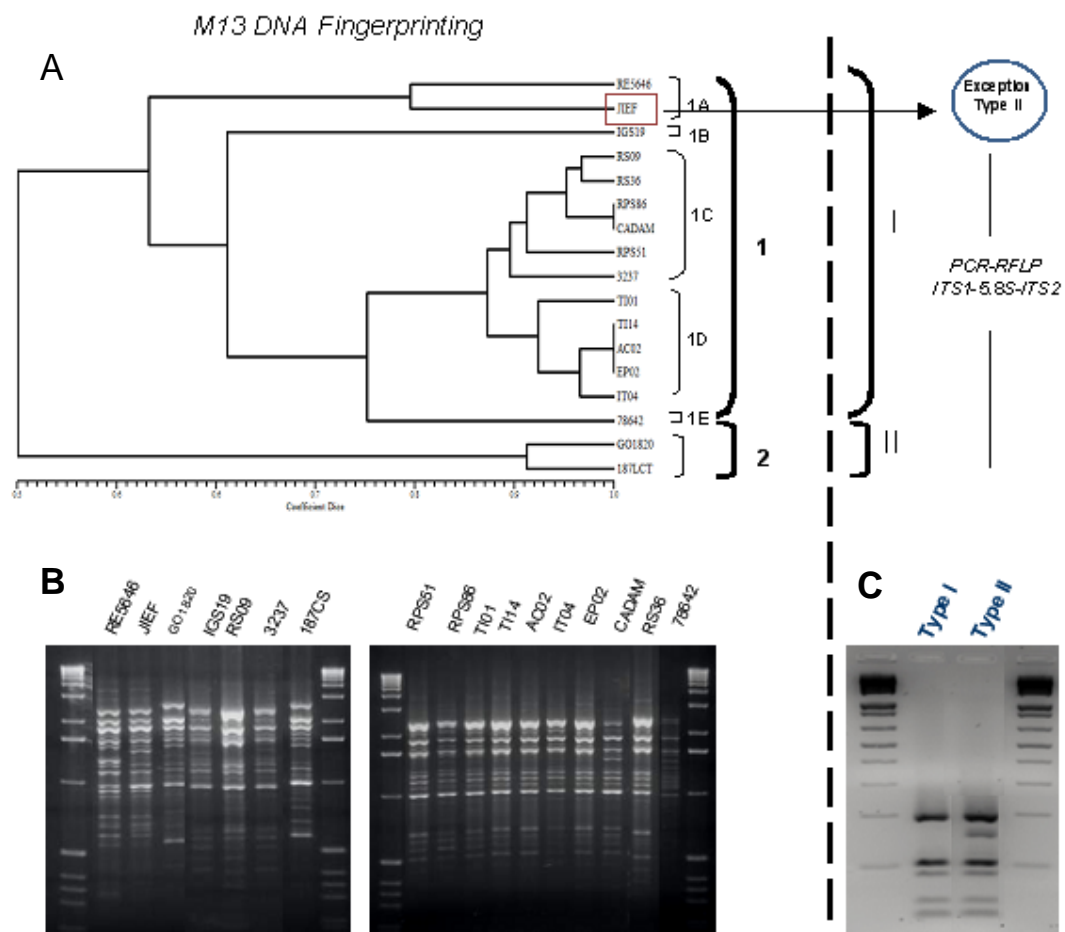
Table 1 - Brazilian *Histoplasma capsulatum* isolates

No.	Strain	Sources	Location
1	AC02	Environmental	Niterói-RJ
2	EP02	Environmental	Itaipava-RJ
3	IGS19	Environmental	Ilha Grande-RJ
4	IT04	Environmental	Itaipava-RJ
5	RPS51	Environmental	Rio da Prata /Campo Grande-RJ
6	RPS86	Environmental	Rio da Prata/Campo Grande-RJ
7	TI01	Environmental	Tinguá-RJ
8	TI14	Environmental	Tiinguá-RJ
9	CADAM	Animal	Campo Grande-RJ
10	RS09	Animal	Ilha Grande-RJ
11	RS36	Animal	Ilha Grande-RJ
12	3237	Clinical	Rio de Janeiro-RJ
13	78642	Clinical	Rio de Janeiro-RJ
14	187LCT	Clinical	Rio Grande do Sul-RS
15	GO1820	Clinical	Goiás-GO
16	JIEF	Clinical	Ceará-CE
17	RE5436	Clinical	Recife-PE

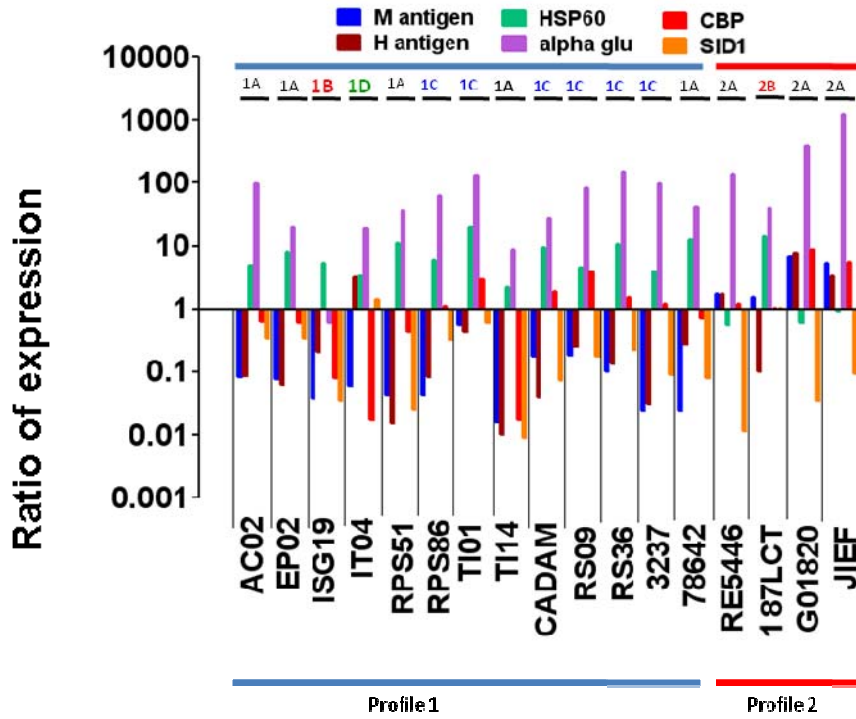
Table 2 - Primers design for Real Time PCR

<i>No.</i>	<i>NCBI databank</i>	<i>Primer Sequence</i>	<i>Encoding Gene</i>	<i>Nt</i>	<i>Fragment generated</i>
1	AF273703	Fwd 5'-CCAAGAGAGAGACCCCGCA-3' Rev. 5'-GCGGTGTAGGAGTGGATGGT-3'	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene, complete cds (House keeping gene)	20 nt 20 nt	318 bp
2	AF026268	Fwd- 5'-GCAATGTCAGGACATGGA-3' Rev.- 5'-CAAGTTCTTCTGGATGA-3'	M antigen gene, complete cds.	18 nt 18 nt	328 bp
3	ACU20346	Fwd 5'-GAAACGGCGCACCTCAAGTAGATT-3' Rev. 5'-GGGTGGGCATGTAGGGTTCAGA-3'	H antigen precursor gene, complete cds.	24 nt 22nt	275 bp
4	L11390	Fwd 5'-GATACGTCTCGCCTTACTTC-3' Rev. 5'-TAACAGCAACACCGCCGAG-3'	Heat shock protein 60 (HSP60) gene, exons 1	20 nt 20 nt	257 bp
5	HCAG_07105 .1	Fwd 5'-CGAGCCTATGACGGTGA-3' Rev 5'- GCACTAAGCCCTGGAATTC- 3'	hypothetical protein similar to α -1,3-glucan synthase (Transcript:HCAT_07105)	19 nt 20 nt	329 pb...
6	AF006209	Fwd 5'-CTCCAAGTTATCGCTCC-3' Rev. 5'-GCAGTAGCAGCGCAAGCG-3'	Calcium-binding Protein Precursor (CBP1)	18 nt 18 nt	282 bp
7	EU253976	Fwd 5'- GACCGTCTCGTTCATTTAC-3' Rev. 5'-CAGTCTGGGTAGGTGTTGC-3'	L-ornithine monooxygenase (SID1) gene, complete cds.	20 nt 20 nt	298 bp

Fig. 1



A



	AC02	EP02	ISG19	IT04	RPS51	RPS86	TI01	TI14	CADAM	RS09	RS36	3237	78642	RE5446	187LCT	G01820	JIEF
M antigen	0,082469	0,074325	0,038473	0,058315	0,042689	0,042689	0,542113	0,015625	0,176777	0,183011	0,101532	0,022876	0,022876	1,741101	1,569168	6,964405	5,278032
H antigen	0,085378	0,060371	0,203063	3,138336	0,015093	0,082469	0,420448	0,009958	0,03983	0,25	0,129408	0,03125	0,277392	1,741101	0,098073	7,727491	3,24901
HSP60	4,924578	8	5,464161	3,363586	11,31371	6,062866	19,69831	2,219139	9,513657	4,594793	10,55606	3,863745	12,55335	0,535887	14,42001	0,594604	0,90125
alpha glu	97,00586	19,69831	0,574349	18,37917	36,75835	64	137,187	8,574188	27,85762	84,44851	152,2185	97,00586	42,22425	142,0249	40,78594	388,0234	1260,692
CBP	0,615572	0,594604	0,076947	0,016746	0,420448	1,109569	2,928171	0,016748	1,866066	3,863745	1,515717	1,231144	0,68302	1,231144	1,035265	8,574188	5,658854
SD-1	0,329877	0,329877	0,034674	1,414214	0,024518	0,31864	0,574349	0,008974	0,071794	0,176777	0,225313	0,088388	0,07966	0,011438	1,035265	0,034674	0,091505

B

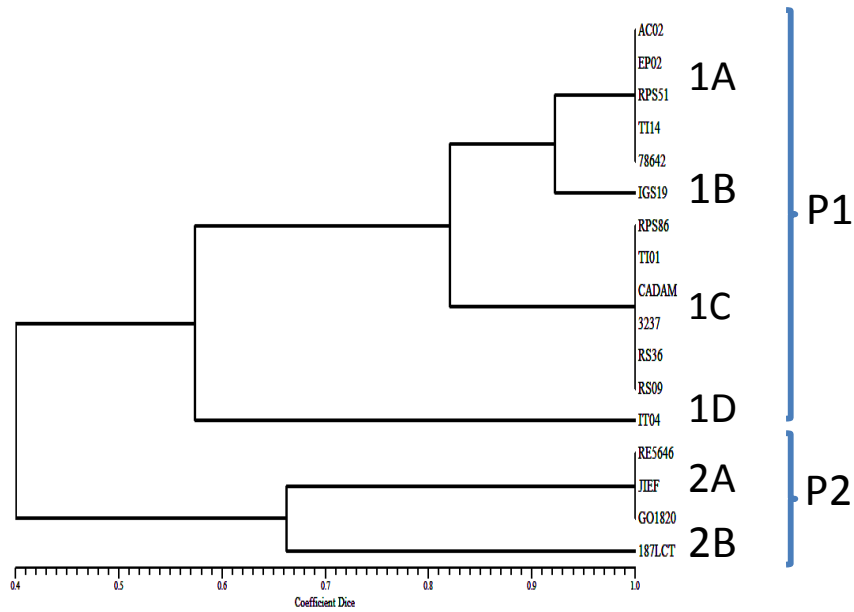


Fig. 3

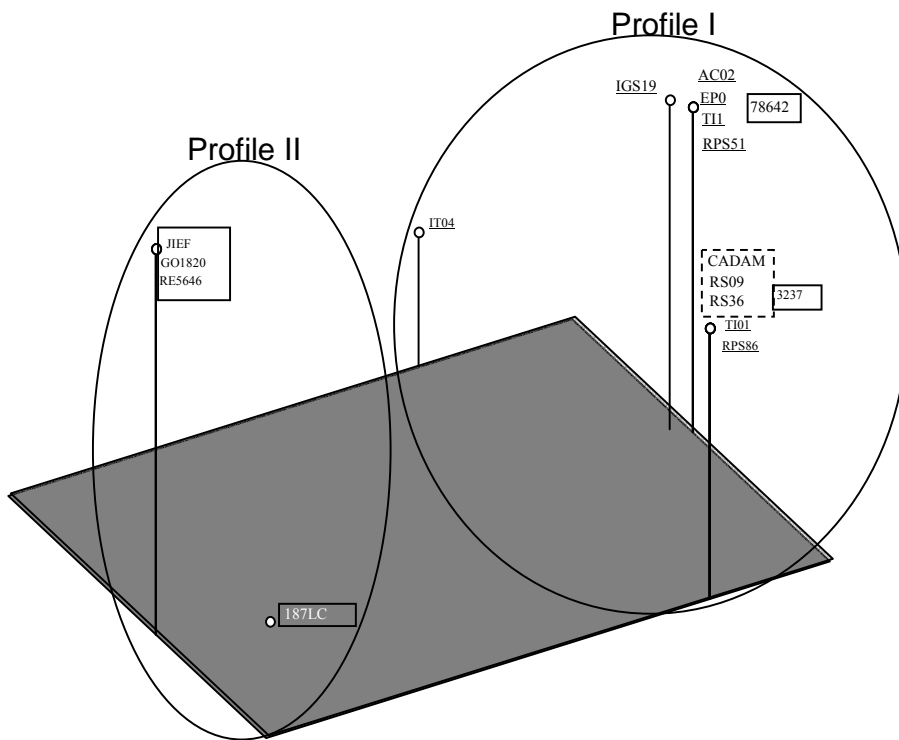
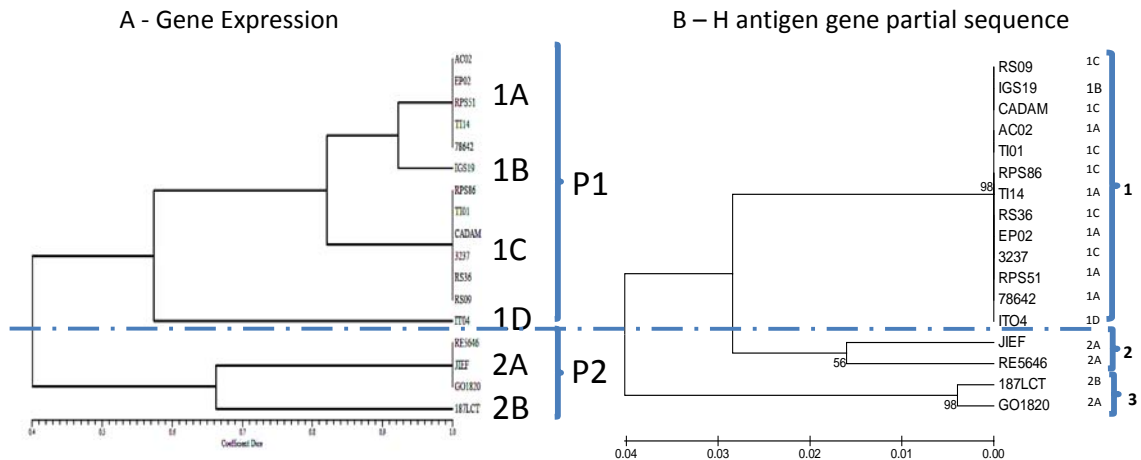


Fig. 4



Sequence of H-antigen gene of Brazilian *Histoplasma capsulatum* isolates presenting nineteen information sites.

C

Position	2	3	4	4	6	7	1	1	1	1	1	1	2	2	2	3	3	4	4	
	9	5	1	7	8	7	4	1	7	0	5	9	8	6	1	8	9	2	7	0
	G	A	G	C	C	A	C	T	T	C	C	G	C	T	T	A	A	C	C	C
AC02
EP02
RPS51
RPS86
TI01
TI14
CADAM
RS36
78642
3237
RS09
IGS19
IT04
JIEF	.	C	A	C	—	.	G	T	G	T	.	.
RE5646	T	C	A	T	.	.	.	C	—	.	G	.	.	C	G	G	T	G	T	A
G01820	.	C	A	.	T	G	T	C	—	T	G	A	A	.	.	G	T	.	.	.
187LCT	.	C	A	.	T	G	T	C	—	T	G	A	A	.	.	G	G	.	.	.

REFERENCES

- Adams TH, Wieser JK, Yu JH. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. Microbiol Mol Biol Rev. 1998 Mar; 62(1):35-54.
- Bohse ML, Woods JP. Expression and interstrain variability of the *YPS3* gene of *Histoplasma capsulatum*. Eukaryot Cell. 2007 Apr; 6(4):609-615.
- Carvalho KC, Ganiko L, Batista WL, Morais FV, Marques ER, Goldman GH, et al. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* and gp43 expression in isolates bearing known PbGP43 genotype. Microbes Infect. 2005 Jan; 7(1):55-65.
- Cunningham MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections. Clin Microbiol Rev. 2000 Jul; 1:470-511.
- Deepe GS, Jr., Durose GG. Immunobiological activity of recombinant H antigen from *Histoplasma capsulatum*. Infect Immun. 1995 Aug; 63(8):3151-3157.
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. Nucleic Acids Res. 1991 Jul 25; 19(14):4008.
- Emmons CW. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil in Washington. D.C. Public Health Rep. 1961 Jul; 76:591-595.
- Jiang B, Bartlett MS, Allen SD, Smith JW, Wheat LJ, Connolly PA, et al. Typing of *Histoplasma capsulatum* isolates based on nucleotide sequence variation in the internal transcribed spacer regions of rRNA genes. J Clin Microbiol. 2000 Jan; 38(1):241-245.
- Karimi K, Wheat LJ, Connolly P, Cloud G, Hajjeh R, Wheat E, et al. Differences in histoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome in the United States and Brazil. J Infect Dis. 2002 Dec 1; 186(11):1655-1660.
- Kasuga T, Taylor JW, White TJ. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. J Clin Microbiol. 1999 Mar; 37:653-663.
- Kaufman L, Standard P. Improved version of the exoantigen test for identification of *Coccidioides immitis* and *Histoplasma capsulatum* cultures. J Clin Microbiol. 1978 Jul; 8(1):42-45.

Keath EJ, Kobayashi GS, Medoff G. Typing of *Histoplasma capsulatum* by restriction fragment length polymorphisms in a nuclear gene. J Clin Microbiol. 1992 Aug; 30(8):2104-2107.

Keath EJ, Painter AA, Kobayashi GS, Medoff G. Variable expression of a yeast-phase-specific gene in *Histoplasma capsulatum* strains differing in thermotolerance and virulence. Infect Immun. 1989 May; 57(5):1384-1390.

Kersulyte D, Woods JP, Keath EJ, Goldman WE, Berg DE. Diversity among clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers. J Bacteriol. 1992 Nov; 174(22):7075-7079.

Klein BS, Tebbets B. Dimorphism and virulence in fungi. Curr Opin Microbiol. 2007 Aug; 10(4):314-319.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. Methods. 2001 Dec; 25(4):402-408.

Maresca B. Unraveling the secrets of *Histoplasma capsulatum*. A model to study morphogenic adaptation during parasite host/host interaction. Verh K Acad Geneeskde Belg. 1995; 57:133-156.

Maresca B, Carratu L, Kobayashi GS. Morphological transition in the human fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. Trends Microbiol. 1994 Apr; 2(4):110-114.

McEwen JG, Taylor JW, Carter D, Xu J, Felipe MS, Vilgalys R, et al. Molecular typing of pathogenic fungi. Med Mycol. 2000; 38 Suppl 1:189-197.

Meyer W, Marszewska K, Amirmostofian M, Igreja RP, Hardtke C, Methling K, et al. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA—a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. Electrophoresis. 1999 Jun; 20(8):1790-1799.

Muniz MM, Pizzini CV, Peralta JM, Reiss E, Zancoppe-Oliveira RM. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains isolated from soil, animals, and clinical specimens in Rio de Janeiro State, Brazil, by a PCR-based random amplified polymorphic DNA assay. J Clin Microbiol. 2001 Dec; 39(12):4487-4494.

Rappleye CA, Goldman WE. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. *Annu Rev Microbiol.* 2006; 60:281-303.

Reyes-Montes MR, Bobadilla-Del Valle M, Martinez-Rivera MA, Rodriguez-Arellanes G, Maravilla E, Sifuentes-Osornio J, et al. Relatedness analyses of *Histoplasma capsulatum* isolates from Mexican patients with AIDS-associated histoplasmosis by using histoplasmin electrophoretic profiles and randomly amplified polymorphic DNA patterns. *J Clin Microbiol.* 1999 May; 37(5):1404-1408.

Sagar V, Kumar R, Ganguly NK, Chakraborti A. Comparative analysis of emm type pattern of Group A *Streptococcus* throat and skin isolates from India and their association with closely related SIC, a streptococcal virulence factor. *BMC Microbiol.* 2008; 8:150.

Silva-Ribeiro VL, Ferreira-da-Cruz MF, Wanke B, Galvao-Castro B. Canine histoplasmosis in Rio de Janeiro: natural and experimental infections. *J Med Vet Mycol.* 1987 Oct; 25(5):319-322.

Taylor ML, Chavez-Tapia CB, Reyes-Montes MR. Molecular typing of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in Mexico. *Fungal Genet Biol.* 2000 Aug; 30:207-212.

Tian X, Shearer G, Jr. The mold-specific MS8 gene is required for normal hypha formation in the dimorphic pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. *Eukaryot Cell.* 2002 Apr; 1:249-256.

Woods JP. *Histoplasma capsulatum* molecular genetics, pathogenesis, and responsiveness to its environment. *Fungal Genet Biol.* 2002 Mar; 35:81-97.

Zancope-Oliveira RM, Morais e Silva Tavares P, Muniz MM. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains in Brazil. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005 Sep 1; 45:443-449.

Zancope-Oliveira RM, Reiss E, Lott TJ, Mayer LW, Deepe GS, Jr. Molecular cloning, characterization, and expression of the M antigen of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun.* 1999 Apr; 67(4):1947-1953.

Zarnowski R, Miyazaki M, Dobrzyn A, Ntambi JM, Woods JP. Typing of *Histoplasma capsulatum* strains by fatty acid profile analysis. *J Med Microbiol.* 2007 Jun; 56(Pt 6):788-797.

11. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Informações sobre a diversidade genética de *H. capsulatum* associada à distribuição geográfica seriam muito úteis para autoridades de Saúde Pública projetando e implementando estratégias de prevenção e intervenção baseada nestas informações. O perfil genotípico de *H. capsulatum* do estado do Rio de Janeiro foi estudado como um esforço inicial para identificar tipos moleculares dentro de uma das regiões geográficas do país (Muniz et al., 2001). Estes dados ilustram pela primeira vez uma avaliação geral relativa à distribuição de perfis genotípicos de *H. capsulatum* no Brasil. A análise de nossos resultados com primers 2, 3, 4, e 5 (Primers do Kit Ready-to-go Amersham Biosciences, Inc.) mostrou que a maioria dos isolados de *H. capsulatum* incluídos neste estudo apresentou 48% de similaridade e, apesar desta diversidade genética, os mesmos puderam ser separados em três grupos principais.

A ecologia do *H. capsulatum* no Brasil tem sido objeto de várias investigações. O fungo foi isolado do solo em diferentes áreas geográficas distintas sugerindo que nichos de *H. capsulatum* existe em tais localidades e poderiam estar atuando como fonte de infecção para animais e a população humana local (Zancope-Oliveira e Wanke, 1987). O agrupamento de isolados de um mesmo estado brasileiro, alguns com alta similaridade genotípica favorece essa hipótese. *H. capsulatum* isolados em Goiás foram agrupados no Grupo III com 100% de identidade. Resultados similares foram observados em isolados do Espírito Santos e do Rio Grande do Sul mostrando respectivamente uma estreita relação com 85 a 89% de similaridade. Esta alta percentagem de similaridade genética entre os isolados sugere a possibilidade de somente uma população genética estar presente nestes ambientes. Contudo, novos estudos comparativos com outros isolados de *H. capsulatum* destas localizações usando RAPD e outros métodos de tipagem molecular não podem ser descartados. Embora em nosso estudo inicial somente um pequeno número de cepas de *H. capsulatum* tenha sido incluído, os mesmos foram representativos, com uma abrangência de cerca de 80% das regiões do Brasil. Esta informação é de especial valor uma vez que é o primeiro estudo de epidemiologia molecular em *H. capsulatum* no Brasil.

Devido aos resultados previamente encontrados, houve um potencial interesse de nosso grupo em tentar determinar perfis genotípicos característicos das diferentes regiões

brasileiras. Com isso, novos estudos comparativos foram desenvolvidos, utilizando outros métodos de tipagem molecular.

Nesta investigação a distribuição de *H. capsulatum* em diferentes regiões brasileiras, e a avaliação da existência de possíveis genótipos moleculares específicos predominantes dentro dos estados brasileiros participantes deste estudo foram abordadas baseado em modelos previamente descritos como, por exemplo, em *Cryptococcus neoformans* (Meyer et al., 1999). Foram utilizadas três técnicas de tipagem molecular diferente em um grupo de 51 isolados de *H. capsulatum* (ambiental, animal e humano), com formação de três agrupamentos principais usando PCR fingerprinting com o “primer” M13 específico para regiões minisatelite em DNA fúngico; análise por PCR-RFLP da região de ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA; e análises filogenéticas de quatro genes codificadores das proteínas *ARF*, *ANTÍGENO H*, *OLE* e *TUB* previamente desenvolvido por Kasuga e colaboradores (1999). Em estudo prévio, informamos que a análise utilizando a técnica de RAPD, foi uma ferramenta útil na identificação dos tipos moleculares de *H. capsulatum* em diferentes regiões geográficas do Brasil (Zancope-Oliveira et al., 2005a). Com a inserção de nova metodologia (M13 PCR fingerprinting), este cenário foi alterado, revelando perfis polimórficos distintos com altos níveis de discriminação entre isolados dentro de uma região específica. Além disso, a relação entre os isolados de *H. capsulatum* não foi tão uniforme em termos de regiões geográficas e embora o M13 PCR fingerprinting também tenha dividido os *H. capsulatum* brasileiros em três grupos principais (Grupo 1, 2 e 3), os mesmos exibiram grande diversidade genética, especialmente nos Grupos 2 e 3 que foram compostos de *H. capsulatum* de diferentes regiões brasileiras.

As cepas de solos e animais de *H. capsulatum* isolados no estado do Rio de Janeiro, agrupados no Grupo I, são as únicas consideradas autóctones, sugerindo que tais isolados possam ser utilizados como marcadores moleculares específicos em novos estudos de tipagem molecular realizado no estado do Rio de Janeiro. No grupo 2, o isolado SP49 oriundo de São Paulo, formou um grupo separado com outros isolados; São Paulo (SP 2414) sugerindo que mais de um genótipo possa estar circulando na mesma região geográfica.

Resultados similares foram observados quando PCR-RFLP foi aplicado neste grupo de isolados. Três tipos moleculares também foram gerados. Entre os 51 isolados analisados

por PCR-RFLP, seis isolados (11,7%) foram agrupados diferentemente pelo M13 PCR fingerprinting. O isolado MS53 (Mato Grosso do Sul) e 9414 (Rio de Janeiro) foram incluídos no tipo Molecular I (perfil PCR-RFLP). Entretanto, foram classificados no Grupo 3 por M13 PCR fingerprinting. Uma situação semelhante foi observada com *H. capsulatum* ES62 e JIEF caracterizado como Tipo Molecular II por PCR-RFLP, e incluídos no Grupo 1 por M13 PCR fingerprinting. Apesar desta discordância entre os métodos de tipagem M13 e PCR-RFLP, estes isolados eram distintamente diferentes dos outros isolados encontrados nos clados que estavam relacionados.

Kasuga e colaboradores, em 2003, relataram que a estrutura populacional de *H. capsulatum* era filogeneticamente diversa no Brasil quando análises baseadas nas seqüências parciais de genes codificadores das proteínas *ARF*, (ADP-ribosylation fator); *H-ANTI*, (precursor do antígeno H); *OLE*, (delta-9 desaturase ácido graxo) e *TUB*, (alfa tubulina) foi realizada (Kasuga et. al. 2003). Os isolados brasileiros foram classificados no clado LamA (Latino Americano A). Foi sugerido também que o complexo Histoplasma compreenderia pelo menos sete espécies filogenéticas, incluindo duas espécies latino americanas. Na presente investigação, filogenia de 51 isolados de *H. capsulatum* provenientes de regiões geograficamente distintas no Brasil foram avaliados usando a mesma metodologia, permitindo uma análise robusta dos *H. capsulatum* brasileiros de diferentes origens geográficas. Análises filogenéticas não mostraram diferenças na topologia das árvores em NJ e MP, e foram formados três agrupamentos populacionais principais (BrHc1, BrHc2 e BrHc3) e BrHc4 foi formado somente por 1 isolado (*H. capsulatum* SP 49) na análise combinada dos dados gerados. Estes dados confirmaram nosso estudo inicial que demonstrou uma população filogenética variada no Brasil (Zancope-Oliveira et al., 2005). Embora a separação genética seja considerável entre o três clados principais, certos isolados demonstraram uma clonalidade geográfica sugerindo uma disseminação parcial clonal de *H. capsulatum* dentro do Brasil. Porém, migração, viagens e turismo poderiam ser responsáveis pela diversidade observada. Interessante notar que todos os *H. capsulatum* isolados no estado de Rio de Janeiro foram classificados como BrHc1.

A análise comparativa entre seqüências da região ITS1-5.8S-ITS2 de cepas de *H. capsulatum* brasileiras e outras seqüências depositadas em bancos de dados públicos revelou que a maioria dos isolados no estado do Rio de Janeiro (n=30) eram geneticamente

distintos dos outros estados brasileiros, bem como de outros países de América Latina ou outros continentes, sendo agrupados nos Grupos B e C. Esta alta similaridade genética entre estes isolados sugere que somente uma população genética poderia estar circulando em micro ambientes no estado do Rio de Janeiro. Entretanto, como já mencionado anteriormente, não podemos descartar a possibilidade de imigração de alguns pacientes de outros locais geograficamente distintos para o Rio de Janeiro, explicando com isto o agrupamento das seqüências das regiões ITS1-5.8S-ITS2 dos três isolados clínicos de *H. capsulatum* (84502, 84476, 84564, e 9414) do Rio de Janeiro no grupo A. Outro aspecto interessante de nossa análise foi o achado de que cada um dos clados principais exibiu um grau de especificidade geográfica.

Em geral, uma alta concordância foi achada entre os resultados obtidos com os três métodos de tipagem moleculares aplicados aos nossos 51 isolados: M13 PCR fingerprinting, análise de PCR-RFLP, e o sequenciamento parcial de quatro genes que codificam proteínas. As metodologias produziram resultados complementares e agruparam todos os isolados em 3 grupamentos genéticos principais. O alto valor de bootstrap para os quatro genes em *H. capsulatum* brasileiros apóia os dados das outras metodologias, sugerindo que deveriam ser empregadas em análises futuras da diversidade genética das populações de *H. capsulatum*. Além disso, a análise filogenética da relação entre 70 isolados que representam regiões diferentes do Brasil e de outros países usando seqüências da região ITS promoveu informação útil para entender a epidemiologia e evolução dos *H. capsulatum* brasileiros, uma vez que duas populações distintas foram estratificadas. População A engloba isolados provenientes países da América Latina e de alguns outros continentes com 100% de similaridade e as populações B e C, que apesar de estarem subdividas, agrupou somente cepas brasileiras oriundas do estado do Rio de Janeiro, e possivelmente seja uma única população. Este dado estão em consonância com os previamente encontrados por Kasuga e colaboradores (2003), onde o clado latino americano estava subdividido em LamA, o qual incluía os isolados brasileiros provenientes do estado do Rio de Janeiro, e LamB.

Embora nossos resultados obtidos com métodos de genotipagem tenham sido discriminatórios e nos dado muitas informações novas a respeito da epidemiologia

molecular da histoplasmose, nos pareceu relevante avaliar e associar um método fenotípico na tipagem de *H. capsulatum*.

Pela primeira vez, o nível de expressão de seis genes atuantes na virulência de *H. capsulatum* foi usado como uma ferramenta complementar para tipagem molecular deste fungo. Nós previamente informamos que métodos de genotipagem foram úteis na identificação de tipos moleculares de *H. capsulatum* brasileiros (Muniz et al., 2009). Neste estudo, evidenciamos que um método de fenotipagem, a análise do nível de expressão de seis genes, também revelou polimorfismo entres os isolados dentro de uma região específica. A razão para este polimorfismo não está clara, mas possivelmente pode ser devido a pontos de mutações nucleotídicas em tais genes, e conseqüentemente mudanças na sua expressão.

Interessante notar, que em ambas as análises de genotipagem e fenotipagem 17 *H. capsulatum* brasileiros foram divididos em dois grupos principais (M13 DNA fingerprinting Grupo 1, 2 /Tipo Molecular PCR-RFLP I e II / Hseq 1 e 2, e Padrão de expressão de genes 1 e 2).

Vários relatos demonstram que *H. capsulatum* como um fungo de origem ambiental, participa como um membro de um ecossistema polimicrobiano competitivo no solo. Além do mais, quando em parasitismo, enfrenta uma variedade de mudanças ambientais, tendo que sobreviver sob condições severas ou modular seu microambiente para alcançar sucesso como um patógeno em sua forma leveduriforme (Woods, 2002). Estes fatores poderiam estar influenciando a menor ou maior expressão de genes associados à virulência do fungo. Entretanto, foi impossível associar estas alterações com o nível de expressão gênica. Isto poderia ter sido possível se o isolamento das amostras de *H. capsulatum* provenientes de solos tivessem sido inoculados diretamente em meio de cultivo e não através do protocolo de Emmons (1949) que usa animais para inoculação da suspensão de solo usando a via intraperitoneal de camundongos para recuperação do fungo após 30 dias.

Quando analisamos o nível de expressão isoladamente em cepa de *H. capsulatum* recuperada de solo (IGS19) de Ilha Grande, RJ, e a comparamos com as obtidas de animais silvestres (RS09 e RS36) capturados na mesma ilha observamos perfis de expressão gênica diferentes, apesar destes animais terem vivido em estreita relação ecológica com o solo

local. Estes dados sugerem que um processo de adaptação possa ter ocorrido e que possa estar relacionado ao seu ambiente, e/ou a ocorrência de uma possível microevolução. Outro fato interessante observado na análise do isolado de solo IGS19 foi a menor expressão de $\alpha(1,3)$ glucana entre os isolados brasileiros sugerindo fortemente um processo de adaptação/microevolução deste fungo após o contato com o hospedeiro animal. Entretanto, não podemos descartar a hipótese de duas populações genéticas distintas estarem compartilhando um mesmo micronicho em Ilha Grande, RJ. Além disso, demonstramos que esta nova metodologia poderá ser utilizada em estudos posteriores para detecção destas ocorrências.

O uso desta metodologia também poderia ser importante no diagnóstico laboratorial de histoplasmose, uma vez que permite determinar quais cepas apresentam maior expressão dos antígenos M e H, considerados até o presente os antígenos imunodominantes de *H. capsulatum* e com alta aplicabilidade no imunodiagnóstico da histoplasmose (Deepe e Durose, 1995; Zancoppe-Oliveira et al., 1999). Além disso, poderíamos determinar uma cepa referência para produção de antígenos permitindo a comparação de resultados interlaboratoriais.

Mais uma vez o agrupamento de *H. capsulatum* recuperados de solos e animais do estado do Rio de Janeiro em um único padrão de expressão gênica (P1), bem como no Grupo 1 por M13 PCR fingerprinting e Tipo I pelo PCR-RFLP sugere que estas cepas realmente seja autóctones, corroborando os dados obtidos em nossos estudos prévios (Muniz et al., 2009) submetidos à Applied and Environmental Microbiology (AEM).

A comparação entre expressão gênica dos *H. capsulatum* brasileiros com a cepa de referência norte-americana G217B demonstra a diversidade entre as populações genéticas e classifica os isolados do Brasil em dois agrupamentos distintos, dados já esperados uma vez que em estudos prévios, o clado latino americano foi agrupado em dois grupos distintos (LAmA e LAmB) (Kasuga et al., 1999).

A confirmação de que alterações em nível de nucleotídeos poderiam estar inferindo no padrão de expressão gênica foi avaliada através do sequenciamento parcial do gene precursor do antígeno H. Os 17 *H. capsulatum* incluídos neste estudo foram divididos em duas populações, HSeq1 e HSeq2, baseado em sítios informativos encontrados na sequência parcial do gene antígeno H (Kasuga et al., 1999). Estes dados confirmaram os

dados gerados pelas análises de expressão gênica, que mostra também uma pronunciada variação no nível de expressão do gene codificador do antígeno H no Padrão 2 (Fig.4). Estes dados demonstram a importância da utilização de mais de um método na classificação de populações fúngicas e indica que novos genes deveriam ser sequenciados para confirmação dos dados obtidos em nossas análises.

12. CONCLUSÕES

1. *H. capsulatum* brasileiros apresentam grande polimorfismo genético.
2. Não existe um padrão molecular definido de *H. capsulatum* relacionado a cada região geográfica.
3. Alta concordância foi achada entre os resultados obtidos com os três métodos de tipagem moleculares aplicados aos nossos isolados. As metodologias produziram resultados complementares e agruparam todos os isolados em 3 grupamentos genéticos principais.
4. A análise filogenética estratificou *H. capsulatum* isolados no Brasil em duas populações: cepas oriundas de vários estados brasileiros foram englobadas na População A, juntamente com isolados latino-americanos e de outros continentes, e cepas do estado do Rio de Janeiro constituíram as Populações B e C, que possivelmente seja uma única população.
5. Uma nova metodologia de tipagem utilizando a expressão de alguns genes envolvidos no processo de virulência foi desenvolvida e padronizada.
6. Houve alta correlação entre os resultados das análises de genotipagem e fenotipagem, dividindo os 17 *H. capsulatum* brasileiros em dois grupos principais.

13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ajello L. Coccidioidomycosis and histoplasmosis. A review of their epidemiology and geographical distribution. *Mycopathol Mycol Appl*. 1971 Dec 6; 45(3):221-230.

Ajello L, Cheng S. Sexual reproduction in *Histoplasma capsulatum*. *Science*. 1967 Mar 31; 155:1696.

Ajello L, Zeidberg LD. Isolation of *Histoplasma capsulatum* and *Allescheria Boydii* from soil. *Science*. 1951 Jun 8; 113:662-663.

Almeida F, Lacaz CS. Considerações em torno de duas amostras de duas *Histoplasma capsulatum* amostras isolados de dermatite verrucosa e de escarro. *An. Fac Med. Univ. São Paulo* 1941; 17(561-577).

Almeida F, Lacaz CS. Cogumelo do gênero *Histoplasma* isolado de lesões de cromomicose. *Associação de fungos nas lesões. Folia Clin et Biol.* . 1939; 11(65-69).

Anjos AR, Calvi SA, Ferracini R, Peracoli MT, Silva CL, Soares AM. Role of *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall fraction containing beta-glucan in tumor necrosis factor-alpha production by human monocytes: correlation with fungicidal activity. *Med Mycol*. 2002 Aug; 40(4):377-382.

Araujo FG. Primeiro isolamento de *Histoplasma capsulatum* de solo em Minas Gerais. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1970; 12:185-191.

Ashford DA, Hajjeh RA, Kelley MF, Kaufman L, Hutwagner L, McNeil MM. Outbreak of histoplasmosis among cavers attending the National Speleological Society Annual Convention, Texas, 1994. *Am J Trop Med Hyg*. 1999 Jun; 60(6):899-903.

Batanghari JW, Goldman WE. Calcium dependence and binding in cultures of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun*. 1997 Dec;65(12):5257-61.

Bevilacqua S, Santos HG. Histoplasmose localizada. Apresentação de um Caso *Rev. Bras. Odont*. 1968; 25(186-193).

Bialek R, Feucht A, Aepinus C, Just-Nubling G, Robertson VJ, Knobloch J, et al. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. *J Clin Microbiol*. 2002 May; 40(5):1644-1647.

Bradley G, Pine L, Reeves MW, Moss CW. Purification, composition, and serological characterization of histoplasmin-H and M antigens. *Infect Immun*. 1974 May; 9(5):870-880.

Brock EG, Reiss E, Pine L, kaufman L. effect of periodate oxidation on the detection of antibodies against the M-antigen of histoplasmin by enzyme immunoassay (EIA) inhibition. *Curr Microbiol.* 1984; 10:177-180.

Brummer E, Stevens DA. Activation of murine polymorphonuclear neutrophils for fungicidal activity with supernatants from antigen-stimulated immune spleen cell cultures. *Infect Immun.* 1984 Aug; 45(2):447-452.

Brummer E, Stevens DA. Antifungal mechanisms of activated murine bronchoalveolar or peritoneal macrophages for *Histoplasma capsulatum*. *Clin Exp Immunol.* 1995 Oct; 102(1):65-70.

Bullock WE, Wright SD. Role of the adherence-promoting receptors, CR3, LFA-1, and p150,95, in binding of *Histoplasma capsulatum* by human macrophages. *J Exp Med.* 1987 Jan 1; 165(1):195-210.

Cano MV, Hajjeh RA. The epidemiology of histoplasmosis: a review. *Semin Respir Infect.* 2001 Jun; 16(2):109-118.

Capone D, Wanke B, Monteiro PC, Lazera MS, de Noronha Andrade G, do Valle AC, et al. Chronic pulmonary histoplasmosis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mycopathologia.* 1999; 145(2):75-79.

Carter DA, Burt A, Taylor JW, Koenig GL, Dechairo BM, White TJ. A set of electrophoretic molecular markers for strain typing and population genetic studies of *Histoplasma capsulatum*. *Electrophoresis.* 1997 Jun; 18(7):1047-1053.

Carter DA, Burt A, Taylor JW, Koenig GL, White TJ. Clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* from Indianapolis, Indiana, have a recombining population structure. *J Clin Microbiol.* 1996 Oct; 34(10):2577-2584.

Carter DA, Taylor JW, Dechairo B, Burt A, Koenig GL, White TJ. Amplified single-nucleotide polymorphisms and a (GA)_n microsatellite marker reveal genetic differentiation between populations of *Histoplasma capsulatum* from the Americas. *Fungal Genet Biol.* 2001 Oct; 34(1):37-48.

Carvalho A. Sobre a histoplasmose. I- Conceito moderno: histoplasmose maligna e benigna. Histoplasmose infecção. II- Estudo baseado em 53 indivíduos reatores positivos à histoplasmina na cidade do Rio de Janeiro. *Clin Tisio* 1949; 4:51-90.

Casadevall A, Rosas AL, Nosanchuk JD. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr Opin Microbiol.* 2000 Aug; 3(4):354-358.

Chandler FW, Kaplan Color atlas and text of the histopathology of mycotic disease. Year Book Medical Publishers, Chicago. USA. 1980:p. 63-66.

Chick EW, Compton SB, Pass T, 3rd, Mackey B, Hernandez C, Austin E, Jr., et al. Hitchcock's birds, or the increased rate of exposure to *Histoplasma* from blackbird roost sites. *Chest*. 1981 Oct; 80(4):434-438.

Christie A, Peterson JC. Pulmonary Calcification in Negative Reactors to Tuberculin. *Am J Public Health Nations Health*. 1945 Nov; 35(11):1131-1147.

Correa WM, Pacheco AC. Naturally occurring histoplasmosis in guinea pigs. *Can J Comp Med Vet Sci*. 1967 Aug; 31(8):203-206.

da Silva MB, Marques AF, Nosanchuk JD, Casadevall A, Travassos LR, Taborda CP. Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes Infect*. 2006 Jan; 8(1):197-205.

Darling ST. A protozoan general infection producing pseudotubercles in the lungs and focal necrosis in the liver, spleen and lymphonodes. *J Am Med Asso* 1906; 46:1283-1285.

Deepe GS, Jr., Durose GG. Immunobiological activity of recombinant H antigen from *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun*. 1995 Aug; 63(8):3151-3157.

DeMonbreun WA. The cultivation and cultural characteristics of Darling's *Histoplasma capsulatum* *Am J. Trop. Med.* . 1934; 14:93-125.

DeMonbreun WA. The dog as a natural host for *Histoplasma*. Report of a case of histoplasmosis in this animal. . *Am. J. Trop. Med*. 1939; 19:565-587.

Dickerson QH, Jr., Busey JF. Chromatographic separation of h and m antigens from histoplasmin. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1968 Jul; 128(3):654-658.

DiSalvo AF, Johnson WM. Histoplasmosis in South Carolina: support for the microfocuss concept. *Am J Epidemiol*. 1979 Apr; 109(4):480-492.

Dodd K, Tompkins EH. Case of histoplasmosis of Darling In: *Infant Am. J. Trop. Med* 1934; 14:127-137.

Domer JE. Monosaccharide and chitin content of cell walls of *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. *J Bacteriol*. 1971 Sep; 107(3):870-877.

Domer JE, Hamilton JG, Harkin JC. Comparative study of the cell walls of the yeastlike and mycelial phases of *Histoplasma capsulatum*. *J Bacteriol*. 1967 Aug; 94(2):466-474.

Duarte L. Histoplasmosis. *Mem. Inst.Oswaldo Cruz*. 1945; 43:457-494.

Durkin MM, Connolly PA, Karimi K, Wheat E, Schnizlein-Bick C, Allen SD, et al. Pathogenic differences between North American and Latin American strains of

Histoplasma capsulatum var. *capsulatum* in experimentally infected mice. J Clin Microbiol. 2004 Sep; 42(9):4370-4373.

Eissenberg LG, Goldman WE. *Histoplasma* variation and adaptive strategies for parasitism: new perspectives on histoplasmosis. Clin Microbiol Rev. 1991 Oct; 4(4):411-421.

Emmons CW. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil. Public Health Rep. 1949 Jul 15; 64(28):892-896.

Emmons CW. Histoplasmosis: animal reservoirs and other sources in nature of the pathogenic fungus, *Histoplasma* Am J Public Health. 1950; 40:256-300.

Fava Netto C, Silva UA, Chammas F, Lacaz CF. Histoplasmosse epidêmica. Estudo clínico, radiológico, micológico de surto ocorrido no Estado de São Paulo, Brasil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1967; 9:222-232.

Fava SdC, Netto CF. Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidioidin sensitivity in Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1998 May-Jun; 40(3):155-164.

Fernandes F, Costa W, Wanke B, Zancopé-Oliveira RM. Microepidemia de histoplasmosse capsulata: Clínica e epidemiologia do primeiro surto ocorrido no Estado da Paraíba. Ciênc. cult. e Saúde. 1989; 11:189-199.

Figueiredo F, Alves LM, Silva CL. Tumour necrosis factor production in vivo and in vitro in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions thereof. Clin Exp Immunol. 1993 Aug; 93(2):189-194.

Gass M, Kobayashi GS. Histoplasmosis. An illustrative case with unusual vaginal and joint involvement. Arch Dermatol. 1969 Dec; 100(6):724-727.

Gaur PK, Lichtwardt, R.W., Hamrick, J.L. Isozyme variation among soil isolates of *Histoplasma capsulatum*. Exp Mycol; . 1981; 5:69-77.

Gomez BL, Figueroa JI, Hamilton AJ, Diez S, Rojas M, Tobon A, et al. Detection of the 70-kilodalton *Histoplasma capsulatum* antigen in serum of histoplasmosis patients: correlation between antigenemia and therapy during follow-up. J Clin Microbiol. 1999 Mar; 37(3):675-680.

Gomez BL, Nosanchuk JD, Diez S, Youngchim S, Aisen P, Cano LE, et al. Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* *in vitro* and during infection. Infect Immun. 2001 Sep; 69(9):5760-5767.

Gomez BL, Nosanchuk JD. Melanin and fungi. Curr Opin Infect Dis. 2003 Apr; 16(2):91-96.

Goodman NL, Larsh HW. Environmental factors and growth of *Histoplasma capsulatum* in soil. Mycopathol Mycol Appl. 1967 Nov 13; 33(2):145-156.

Goodwin RA, Jr., Des Prez RM. State of the art: histoplasmosis. *Am Rev Respir Dis*. 1978 May; 117(5):929-956.

Green JH, Pine, L. Preparation of H and M antigens of *Histoplasma capsulatum* free of heterologous antigens. *Curr. Microbiol*. 1985; 12:209–216.

Greene CH, Delalla LS, Tompkins VN. Separation of specific antigens of *Histoplasma capsulatum* by ion-exchange chromatography. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1960 Oct; 105:140-141.

Gueho E, Leclerc MC, de Hoog GS, Dupont B. Molecular taxonomy and epidemiology of *Blastomyces* and *Histoplasma* species. *Mycoses*. 1997 Sep; 40(3-4):69-81.

Guimaraes AJ, Frases S, Gomez FJ, Zancoppe-Oliveira RM, Nosanchuk JD. Monoclonal antibodies to heat shock protein 60 alter the pathogenesis of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun*. 2009 Apr; 77(4):1357-1367.

Guimaraes AJ, Pizzini CV, De Matos Guedes HL, Albuquerque PC, Peralta JM, Hamilton AJ, et al. ELISA for early diagnosis of histoplasmosis. *J Med Microbiol*. 2004 Jun; 53(Pt 6):509-514.

Hajjeh RA, Pappas PG, Henderson H, Lancaster D, Bamberger DM, Skahan KJ, et al. Multicenter case-control study of risk factors for histoplasmosis in human immunodeficiency virus-infected persons. *Clin Infect Dis*. 2001 Apr 15; 32(8):1215-1220.

Hamrick JL, Lichtwardt, R.W, Lan, C. Levels of isozyme variation within and among *Histoplasma capsulatum* localities. *Trans Kansas Acad Sci*. 1986; 89:49-56.

Heiner DC. Diagnosis of histoplasmosis using precipitin reactions in agar gel. *Pediatrics*. 1958 Oct; 22(4 Part 1):616-627.

Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res*. 2007 May; 111(Pt 5):509-547.

Hoff GL, Bigler WJ. The role of bats in the propagation and spread of histoplasmosis: a review. *J Wildl Dis*. 1981 Apr; 17(2):191-196.

Hogan LH, Klein BS. Altered expression of surface α 1,3-glucan in genetically related strains of *Blastomyces dermatitidis* that differ in virulence. *Infect Immun*. 1994 Aug; 62(8):3543-3546.

Holbrook ED, Rappleye CA. *Histoplasma capsulatum* pathogenesis: making a lifestyle switch. *Curr Opin Microbiol*. 2008 Aug; 11(4):318-324.

- Hoog GS, Guarro J. Atlas of Clinical Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn and Delft/Universitat Rovira i Virgili, Reus. Index Fungorum. 2007.
<http://data.gbif.org/search/Histoplasma%20capsulatum>.
- Huhn GD, Austin C, Carr M, Heyer D, Boudreau P, Gilbert G, et al. Two outbreaks of occupationally acquired histoplasmosis: more than workers at risk. *Environ Health Perspect*. 2005 May; 113(5):585-589.
- Hwang LH, Mayfield JA, Rine J, Sil A. *Histoplasma* requires SID1, a member of an iron-regulated siderophore gene cluster, for host colonization. *PLoS Pathog*. 2008 Apr; 4(4):e1000044.
- Ignatov A, Keath EJ. Molecular cell biology and molecular genetics of *Histoplasma capsulatum*. *Int J Med Microbiol*. 2002 Oct; 292(5-6):349-361.
- Ikeda R, Sugita T, Jacobson ES, Shinoda T. Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. *Microbiol Immunol*. 2003; 47(4):271-277.
- James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, et al. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*. 2006 Oct 19; 443(7113):818-822.
- Jiang B, Bartlett MS, Allen SD, Smith JW, Wheat LJ, Connolly PA, et al. Typing of *Histoplasma capsulatum* isolates based on nucleotide sequence variation in the internal transcribed spacer regions of rRNA genes. *J Clin Microbiol*. 2000 Jan; 38(1):241-245.
- Johnson CH, Klotz MG, York JL, Kruff V, McEwen JE. Redundancy, phylogeny and differential expression of *Histoplasma capsulatum* catalases. *Microbiology*. 2002 Apr; 148(Pt 4):1129-1142.
- Johnson CH, Prigge JT, Warren AD, McEwen JE. Characterization of an alternative oxidase activity of *Histoplasma capsulatum*. *Yeast*. 2003 Apr 15; 20(5):381-388.
- Kane J, Silveira IC, Marinho HM, Lyra LCB. Histoplasmosse generalizada progressiva (um caso de evolução fatal). *Rev. Bras. Med*. 1966; 23:8-12.
- Karimi K, Wheat LJ, Connolly P, Cloud G, Hajjeh R, Wheat E, et al. Differences in histoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome in the United States and Brazil. *J Infect Dis*. 2002 Dec 1; 186(11):1655-1660.
- Kasuga T, Taylor JW, White TJ. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. *J Clin Microbiol*. 1999 Mar; 37(3):653-663.
- Kasuga T, White TJ, Koenig G, McEwen J, Restrepo A, Castaneda E, et al. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol Ecol*. 2003 Dec; 12(12):3383-3401.

- Kauffman CA. Fungal infections. *Clin Geriatr Med*. 1992 Nov; 8(4):777-791.
- Kaufman L, Ajello L. Serodiagnosis of blastomycosis. *Am Rev Respir Dis*. 1982 Oct; 126(4):741.
- Kaufman L, Blumer S. Occurrence of serotypes among *Histoplasma capsulatum* strains. *J Bacteriol*. 1966 Apr; 91(4):1434-1439.
- Kaufman L, Kaplan W. Preparation of a fluorescent antibody specific for the yeast phase of *Histoplasma capsulatum*. *J Bacteriol*. 1961 Nov; 82:729-735.
- Kaufman L, Reiss E. Serodiagnosis of fungal diseases. In: N.R. Rose, H. Friedman, and J.L.Fahey eds *Manual of Clinical Immunology*: American Society for Microbiology, Washington D.C p. 446-466 1986.
- Kaufman L, Standard P. Improved version of the exoantigen test for identification of *Coccidioides immitis* and *Histoplasma capsulatum* cultures. *J Clin Microbiol*. 1978 Jul; 8(1):42-45.
- Kauffman CA. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Jan;20(1):115-32.
- Keath EJ, Kobayashi GS, Medoff G. Typing of *Histoplasma capsulatum* by restriction fragment length polymorphisms in a nuclear gene. *J Clin Microbiol*. 1992 Aug; 30(8):2104-2107.
- Keath EJ, Painter AA, Kobayashi GS, Medoff G. Variable expression of a yeast-phase-specific gene in *Histoplasma capsulatum* strains differing in thermotolerance and virulence. *Infect Immun*. 1989a May; 57(5):1384-1390.
- Keath EJ, Spitzer ED, Painter AA, Travis SJ, Kobayashi GS, Medoff G. DNA probe for the identification of *Histoplasma capsulatum*. *J Clin Microbiol*. 1989b Oct; 27(10):2369-2372.
- Kersulyte D, Woods JP, Keath EJ, Goldman WE, Berg DE. Diversity among clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers. *J Bacteriol*. 1992 Nov; 174(22):7075-7079.
- Klimpel KR, Goldman WE. Cell walls from avirulent variants of *Histoplasma capsulatum* lack α -(1,3)-glucan. *Infect Immun*. 1988 Nov; 56(11):2997-3000.
- Klite PD, Diercks FH. *Histoplasma capsulatum* in Fecal Contents and Organs of Bats in the Canal Zone. *Am J Trop Med Hyg*. 1965 May; 14:433-439.
- Kwon-Chung KJ. *Emmonsiiella capsulata*: sexual stage of *Histoplasma capsulatum*. *Science*. 1972:175:326.

- Kwon-Chung KJ. Studies on *Emmonsia capsulata*. I. Heterothallism and development of the ascocarp. *Mycology*. 1973; 65:109-121.
- Kwon-Chung KJ. Perfect state (*Emmonsia capsulata*) of the fungus causing large-form African histoplasmosis. *Mycologia*. 1975 Sep-Oct; 67(5):980-990.
- Kwon-Chung KJ, Weeks RJ, Larsh HW. Studies on *Emmonsia capsulata* (*Histoplasma capsulatum*). II. Distribution of the two mating types in 13 endemic states of the United States. *Am J Epidemiol*. 1974 Jan; 99(1):44-49.
- Lainson R, Shaw JJ. *Pneumocystis* and *Histoplasma* infections in wild animals from the Amazon region of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1975; 69(5-6):505-508.
- Larsh HW. The epidemiology of histoplasmosis In: Al-Doory (ed). *The Epidemiology of human Mycotic diseases*, Charles C. Thomas, Springfield. p. 52-73; 1975.
- Leimann BC, Pizzini CV, Muniz MM, Albuquerque PC, Monteiro PC, Reis RS, et al. Histoplasmosis in a Brazilian center: clinical forms and laboratory tests. *Rev Iberoam Micol*. 2005 Sep; 22(3):141-146.
- Londero AT, Ramos CD. The status of histoplasmosis in Brazil. *Mycopathologia* 1978; 64(153-156).
- Londero AT, Wanke B. Histoplasmosis capsulata. *JBM* 1988; 55:96-109.
- Long KH, Gomez FJ, Morris RE, Newman SL. Identification of heat shock protein 60 as the ligand on *Histoplasma capsulatum* that mediates binding to CD18 receptors on human macrophages. *J Immunol*. 2003 Jan 1; 170(1):487-494.
- Madureira DH. Comunicação de um caso de histoplasmose em Salvador, Bahia, Brasil (Infecção natural em cão). *Imprensa Oficial da Bahia*. 1963:p.2-10.
- Magrini V, Goldman WE. Molecular mycology: a genetic toolbox for *Histoplasma capsulatum*. *Trends Microbiol*. 2001 Nov; 9(11):541-546.
- Mantovani A, Mazzoni A, Ajello L. Histoplasmosis in Italy. I. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from dogs in the province of Bologna. *Sabouraudia*. 1968 Feb; 6(2):163-164.
- McDonough ES, Wisniewski TR, Penn LA, Chan DM, McNamara WJ. Preliminary studies on conidial liberation of *Blastomyces dermatitidis* and *Histoplasma capsulatum*. *Sabouraudia*. 1976 Jul; 14(2):199-204.
- McGinnis MR, Katz B. *Ajellomyces* and its synonym *Emmonsia* *Mycotaxon*. 1979; 8:157-164.

Medeiros AI, Malheiro A, Jose PJ, Conroy DM, Williams TJ, Faccioli LH. Differential release of MIP-1 alpha and eotaxin during infection of mice by *Histoplasma capsulatum* or inoculation of beta-glucan. *Inflamm Res*. 2004 Aug; 53(8):351-354.

Medeiros AI, Silva CL, Malheiro A, Maffei CM, Faccioli LH. Leukotrienes are involved in leukocyte recruitment induced by live *Histoplasma capsulatum* or by the beta-glucan present in their cell wall. *Br J Pharmacol*. 1999 Dec; 128(7):1529-1537.

Medoff G, Maresca B, Lambowitz AM, Kobayashi G, Painter A, Sacco M, et al. Correlation between pathogenicity and temperature sensitivity in different strains of *Histoplasma capsulatum*. *J Clin Invest*. 1986a Dec; 78(6):1638-1647.

Medoff G, Sacco M, Maresca B, Schlessinger D, Painter A, Kobayashi GS, et al. Irreversible block of the mycelial-to-yeast phase transition of *Histoplasma capsulatum*. *Science*. 1986b Jan 31; 231(4737):476-479.

Menges RW, Furcolow ML, Hinton A. The role of animals in the epidemiology of histoplasmosis. *Am J Hyg*. 1954 Jan; 59(1):113-118.

Meyer W, Marszewska K, Amirmostofian M, Igreja RP, Hardtke C, Methling K, et al. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA—a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis*. 1999 Jun; 20(8):1790-1799.

Moraes MAP, Almeida MMR. Isolamento de *Histoplasma capsulatum* do solo de Humboldt (Estado de Mato Grosso, Brasil) *Acta Amazônica* 1976; 6:43-47.

Morris-Jones R, Youngchim S, Gomez BL, Aisen P, Hay RJ, Nosanchuk JD, et al. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. *Infect Immun*. 2003 Jul; 71(7):4026-4033.

Muniz MM, Moraes MAP, Meyer W, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Comparison of different DNA-based methods for molecular typing of *Histoplasma capsulatum* Submitted to *Applied and Environmental Microbiology* (AEM). 2009.

Muniz MM, Pizzini CV, Peralta JM, Reiss E, Zancopé-Oliveira RM. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains isolated from soil, animals, and clinical specimens in Rio de Janeiro State, Brazil, by a PCR-based random amplified polymorphic DNA assay. *J Clin Microbiol*. 2001 Dec; 39(12):4487-4494.

Nemecek JC, Wuthrich M, Klein BS. Global control of dimorphism and virulence in fungi. *Science*. 2006 Apr 28; 312(5773):583-588.

Newman SL, Bucher C, Rhodes J, Bullock WE. Phagocytosis of *Histoplasma capsulatum* yeasts and microconidia by human cultured macrophages and alveolar macrophages.

Cellular cytoskeleton requirement for attachment and ingestion. *J Clin Invest.* 1990 Jan; 85(1):223-230.

Nittler MP, Hocking-Murray D, Foo CK, Sil A. Identification of *Histoplasma capsulatum* transcripts induced in response to reactive nitrogen species. *Mol Biol Cell.* 2005 Oct; 16(10):4792-4813.

Nosanchuk JD, Gomez BL, Youngchim S, Diez S, Aisen P, Zancope-Oliveira RM, et al. *Histoplasma capsulatum* synthesizes melanin-like pigments in vitro and during mammalian infection. *Infect Immun.* 2002 Sep; 70(9):5124-5131.

Nosanchuk JD, van Duin D, Mandal P, Aisen P, Legendre AM, Casadevall A. *Blastomyces dermatitidis* produces melanin in vitro and during infection. *FEMS Microbiol Lett.* 2004 Oct 1; 239(1):187-193.

Oliveira F de M, Unis G, Severo LC. An outbreak of histoplasmosis in the city of Blumenau, Santa Catarina. *J Bras Pneumol.* 2006 Jul-Aug; 32(4):375-378.

Pará M. Histoplasmosis in Brazil. *Am J. Trop. Med.* 1946; 26:273-292.

Parsons RJ, Zaraforretis CJD. Histoplasmosis in man: report of seven cases and review of seventy one cases. *Arch. Intern. Med.* . 1945; 75:1-23.

Paula A. Microepidemia de histoplasmose. . *Rev. Serv. Nac. Tuberc.* 1959; 3:11-20.

Paula A, Aidé MA. Histoplasmose urbana. *Medicina de hoje.* 1977; 3:677-684.

Paula A, Aidé MA. Histoplasmose no Brasil *J. Bras. Med.* 1979; 37:67-81.

Pereira NG. Especial referência às febres de origem obscura e de difícil diagnóstico. Tese de Mestrado, Faculdade de Medicina da UFRJ, Rio de Janeiro. 1975.

Pine L. Morphological and physiological characteristic of *Histoplasma capsulatum*: In: Sweany H. D. ed *Histoplasmosis.* Springfield, Charles C. Thomas p. 40-75; 1960.

Pizzini CV, Zancope-Oliveira RM, Reiss E, Hajjeh R, Kaufman L, Peralta JM. Evaluation of a western blot test in an outbreak of acute pulmonary histoplasmosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999 Jan; 6(1):20-23.

Poonwan N, Imai T, Mekha N, Yazawa K, Mikami Y, Ando A, et al. Genetic analysis of *Histoplasma capsulatum* strains isolated from clinical specimens in thailand by a PCR-based random amplified polymorphic DNA method. *J Clin Microbiol.* 1998 Oct; 36(10):3073-3076.

Randall CC, Orr MF, Schell FG. Detection by tissue culture of an organism resembling *Histoplasma capsulatum* in an apparently healthy horse. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1951 Nov; 78(2):447-450.

Rappleye CA, Engle JT, Goldman WE. RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for alpha-(1,3)-glucan in virulence. *Mol Microbiol.* 2004 Jul; 53(1):153-165.

Reiss E, Knowles JB, Bragg SL, Kaufman L. Monoclonal antibodies against the M-protein and carbohydrate antigens of histoplasmin characterized by the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot method. *Infect Immun.* 1986 Sep; 53(3):540-546.

Reyes-Montes MR, Bobadilla-del Valia M, Martínez-Rivera MA. Tipificación de aislados clínicos de *Histoplasma capsulatum* por métodos fenotípicos y genotípicos. *Rev Inst Nal Enl Resp Mex.* 1998; 11:195-201.

Reyes-Montes MR, Bobadilla-Del Valle M, Martinez-Rivera MA, Rodriguez-Arellanes G, Maravilla E, Sifuentes-Osornio J, et al. Relatedness analyses of *Histoplasma capsulatum* isolates from Mexican patients with AIDS-associated histoplasmosis by using histoplasmin electrophoretic profiles and randomly amplified polymorphic DNA patterns. *J Clin Microbiol.* 1999 May; 37(5):1404-1408.

Ribi E, Salvin SB. Antigens from the yeast phase of *Histoplasma capsulatum*. I. Morphology of the cell as revealed by the electron microscope. *Exp Cell Res.* 1956 Apr; 10(2):394-404.

Rippon JW. *Medical Mycology.* W B Saunders Co Philadelphia 1988:381-423.

Rocha Lima VH. Beiträzzur ganntis der blastomykosen, lymphangitis epizootica und histoplasmosis. *Zentralbl Bakt.* 1912; 67(233-249).

Romero-Martinez R, Canteros C, Taylor ML. [Intraspecific chromosomal variability in human pathogenic fungi, especially in *Histoplasma capsulatum*]. *Rev Iberoam Micol.* 2004 Dec; 21(4):168-176.

Rowley DA, Haberman RT, Emmons CW. Histoplasmosis: pathologic studies of fifty cats and fifty dogs from Loudoun County, Virginia. *J Infect Dis.* 1954 Jul-Aug; 95(1):98-108.

Sacks JJ, Ajello L, Crockett LK. An outbreak and review of cave-associated histoplasmosis capsulati. *J Med Vet Mycol.* 1986 Aug; 24(4):313-325.

San-Blas G, San-Blas F, Serrano LE. Host-parasite relationships in the yeastlike form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb9. *Infect Immun.* 1977 Feb; 15(2):343-346.

Sandhu GS, Kline BC, Stockman L, Roberts GD. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J Clin Microbiol.* 1995 Nov; 33(11):2913-2919.

Sandia OG. Inquérito da histoplasmose pela intradermoreação com histoplasmina em Santa Clara (MG). *Anais de Medicina.* Universidade Federal do Paraná (Curitiba) 1974; 142:16-17.

Sathapatayavongs B, Batteiger BE, Wheat J, Slama TG, Wass JL. Clinical and laboratory features of disseminated histoplasmosis during two large urban outbreaks. *Medicine (Baltimore)*. 1983 Sep; 62(5):263-270.

Schmidt S, Machado OP, Galvão AB. Microepidemia de histoplasmose na zona rural de Brasília, DF. II - Estudo epidemiológico e parasitológico da fonte de infecção. *Rev Soc Med Trop*. 1973; 7:107-115.

Sebghati TS, Engle JT, Goldman WE. Intracellular parasitism by *Histoplasma capsulatum*: fungal virulence and calcium dependence. *Science*. 2000 Nov 17; 290(5495):1368-1372.

Severo LC, Petrillo VF, Camargo JJ, Geyer GR, Porto NS. Acute pulmonary histoplasmosis and first isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil of Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1986 Jan-Feb; 28(1):51-55.

Silva CL, Alves LM, Figueiredo F. Involvement of cell wall glucans in the genesis and persistence of the inflammatory reaction caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiology*. 1994 May; 140 (Pt 5):1189-1194.

Silva JML, Barbosa M, Hipólito O. Um caso de histoplasmose em cão em Minas Gerais *Arq. Ex Sup Vet*. 1961; 13:101-106.

Silva ME. Isolamento do *Histoplasma capsulatum* do solo, em zona endêmica de calazar na Bahia, Brazil. . *Bol. Fund. Gonçalo Moniz*. 1956; 10:1-9.

Soll DR. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clin Microbiol Rev*. 2000 Apr; 13(2):332-370.

Spitzer ED, Lasker BA, Travis SJ, Kobayashi GS, Medoff G. Use of mitochondrial and ribosomal DNA polymorphisms to classify clinical and soil isolates of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun*. 1989 May; 57(5):1409-1412.

Steele PE, Carle GF, Kobayashi GS, Medoff G. Electrophoretic analysis of *Histoplasma capsulatum* chromosomal DNA. *Mol Cell Biol*. 1989 Mar; 9(3):983-987.

Stobierski MG, Hospedales CJ, Hall WN, Robinson-Dunn B, Hoch D, Sheill DA. Outbreak of histoplasmosis among employees in a paper factory-Michigan, 1993. *J Clin Microbiol*. 1996 May; 34(5):1220-1223.

Taylor ML, Chavez-Tapia CB, Reyes-Montes MR. Molecular typing of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in Mexico. *Fungal Genet Biol*. 2000 Aug; 30(3):207-212.

Taylor ML, Ruiz-Palacios GM, del Rocio Reyes-Montes M, Rodriguez-Arellanes G, Carreto-Binaghi LE, Duarte-Escalante E, et al. Identification of the infectious source of an unusual outbreak of histoplasmosis, in a hotel in Acapulco, state of Guerrero, Mexico. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005 Sep 1; 45(3):435-441.

- Unis G, da Silva VB, Severo LC. [Disseminated histoplasmosis and AIDS. The role of culture medium for the bronchoscopic clinical specimens]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2004 May-Jun; 37(3):234-237.
- Vanbreuseghem R. L'histoplase africaine ou histoplasmose causée par *Histoplasma duboisii*. *Bull. Acad. Royale Med.* 1952; 4:543.
- Vilela E, Pará M. Histoplasmose sem criança no Estado de Minas Gerais. *Rev. Brasil. Biol.* 1941; 1:449-456.
- Vincent RD, Goewert R, Goldman WE, Kobayashi GS, Lambowitz AM, Medoff G. Classification of *Histoplasma capsulatum* isolates by restriction fragment polymorphisms. *J Bacteriol.* 1986 Mar; 165(3):813-818.
- Wanke B. Histoplasmose: Estudo epidemiológico, clínica e experimental. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 1985.
- Watson JDH, H.N.; Roberts, J.W.; Steitz, J.A; Weiner, A.M. in: Genetic Analysis in Cell Biology. *Molecular Biology of the Gene.* 2000.
- Weaver CH, Sheehan KC, Keath EJ. Localization of a yeast-phase-specific gene product to the cell wall in *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun.* 1996 Aug; 64(8):3048-3054.
- Weising K, Atkinson RG, Gardner RC. Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation. *PCR Methods Appl.* 1995 Apr; 4(5):249-255.
- Wheat J, French ML, Kamel S, Tewari RP. Evaluation of cross-reactions in *Histoplasma capsulatum* serologic tests. *J Clin Microbiol.* 1986a Mar; 23(3):493-499.
- Wheat L. Laboratory diagnosis of histoplasmosis: Update 2000. *Seminars in Respiratory Infections.* 2001; 16(2):131-140.
- Wheat LJ. Diagnosis of histoplasmosis. *Histoplasma* reference laboratory 1994.
- Wheat LJ. Histoplasmosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Curr Trop Med Mycol* 1996; 7:7-18.
- Wheat LJ, Connolly-Stringfield P, Kohler RB, Frame PT, Gupta MR. *Histoplasma capsulatum* polysaccharide antigen detection in diagnosis and management of disseminated histoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med.* 1989 Oct; 87(4):396-400.
- Wheat LJ, Connolly-Stringfield PA, Baker RL, Curfman MF, Eads ME, Israel KS, et al. Disseminated histoplasmosis in the acquired immune deficiency syndrome: clinical findings, diagnosis and treatment, and review of the literature. *Medicine (Baltimore).* 1990 Nov; 69(6):361-374.

Wheat LJ, Garringer T, Brizendine E, Connolly P. Diagnosis of histoplasmosis by antigen detection based upon experience at the histoplasmosis reference laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002 May; 43(1):29-37.

Wheat LJ, Kauffman CA. Histoplasmosis. *Infect Dis Clin North Am*. 2003 Mar; 17(1):1-19, vii.

Wheat LJ, Kohler RB, Tewari RP. Diagnosis of disseminated histoplasmosis by detection of *Histoplasma capsulatum* antigen in serum and urine specimens. *N Engl J Med*. 1986b Jan 9; 314(2):83-88.

Wheat LJ, Slama TG, Eitzen HE, Kohler RB, French ML, Biesecker JL. A large urban outbreak of histoplasmosis: clinical features. *Ann Intern Med*. 1981 Mar; 94(3):331-337.

Woods JP. *Histoplasma capsulatum* molecular genetics, pathogenesis, and responsiveness to its environment. *Fungal Genet Biol*. 2002 Mar; 35(2):81-97.

Woods JP, Kersulyte D, Goldman WE, Berg DE. Fast DNA isolation from *Histoplasma capsulatum*: methodology for arbitrary primer polymerase chain reaction-based epidemiological and clinical studies. *J Clin Microbiol*. 1993 Feb; 31(2):463-464.

Zancope-Oliveira RM, Bragg SL, Hurst SF, Peralta JM, Reiss E. Evaluation of cation exchange chromatography for the isolation of M glycoprotein from histoplasmin. *J Med Vet Mycol*. 1993; 31(1):29-41.

Zancope-Oliveira RM, Bragg SL, Reiss E, Peralta JM. Immunochemical analysis of the H and M glycoproteins from *Histoplasma capsulatum*. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1994a Sep; 1(5):563-568.

Zancope-Oliveira RM, Bragg SL, Reiss E, Wanke B, Peralta JM. Effects of histoplasmin M antigen chemical and enzymatic deglycosylation on cross-reactivity in the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot method. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1994b Jul; 1(4):390-393.

Zancope-Oliveira RM, Morais e Silva Tavares P, Muniz MM. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains in Brazil. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005a Sep 1; 45(3):443-449.

Zanopé-Oliveira RM, Muniz MM, Wanke B. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias In: *Histoplasmose*. Rio de Janeiro Editora Guanabara Koogan 2005b.

Zancope-Oliveira RM, Reiss E, Lott TJ, Mayer LW, Deepe GS, Jr. Molecular cloning, characterization, and expression of the M antigen of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun*. 1999 Apr; 67(4):1947-1953.

Zancopé-Oliveira RM, Wanke B. [Distribution of sources of infection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in Rio da Prata, a municipality of Rio de Janeiro (RJ)]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1987 Jul-Aug; 29(4):243-250.

Zancopé-Oliveira RM, Wanke B. Isolamento do *Histoplasma capsulatum* de animais, silvestres no município do Rio de Janeiro. Caderno de Saúde Pública. 1985; 2(1):42-52.

Zancopé-Oliveira RM WB. Isolamento do *Histoplasma capsulatum* de animais, silvestres no município do Rio de Janeiro. Caderno de Saúde Pública. 1985; 2(1):42-52.

Zeidberg LD, Ajello L, Webster RH. Physical and chemical factors in relation to *Histoplasma capsulatum* in soil. Science. 1955 Jul 1; 122(3157):33-34.