

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas



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

FERNANDO ALMEIDA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DE ESPÉCIES FILOGENÉTICAS E TIPOS DE
COMPATIBILIDADE SEXUAL DE *Histoplasma capsulatum* COM A
VIRULÊNCIA DE ISOLADOS CLÍNICOS**

Rio de Janeiro

2019

FERNANDO ALMEIDA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DE ESPÉCIES FILOGENÉTICAS E TIPOS DE
COMPATIBILIDADE SEXUAL DE *Histoplasma capsulatum* COM A
VIRULÊNCIA DE ISOLADOS CLÍNICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças
Infecciosas do Instituto Nacional de
Infectologia Evandro Chagas, para obtenção
do grau de Doutor em Ciências.

Orientadores: Dra. Rosely Maria Zancopé Oliveira
Dr. Allan Jefferson Guimarães

Rio de Janeiro

2019

FERNANDO ALMEIDA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DE ESPÉCIES FILOGENÉTICAS E TIPOS DE
COMPATIBILIDADE SEXUAL DE *Histoplasma capsulatum* COM A
VIRULÊNCIA DE ISOLADOS CLÍNICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças
Infecciosas do Instituto Nacional de
Infectologia Evandro Chagas, para obtenção
do grau de Doutor em Ciências.

Orientadores: Dra. Rosely Maria Zancopé Oliveira

Dr. Allan Jefferson Guimarães

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Paes (Presidente)

Prof^a. Dra. Priscila Marques de Macêdo

Prof^a. Dra. Luciana de Freitas Campos Miranda

Prof. Dr. Mauro de Medeiros Muniz

Prof^a. Dra. Lisandra Serra Damasceno

Prof. Dr. Marcos de Abreu Almeida (Revisor e Suplente)

Dedico incondicionalmente esse trabalho
à minha família.

Obrigado por todos os ensinamentos de
vida que me deram e me dão até hoje.
Sem vocês, eu jamais seria o que sou.
Amo vocês: Ramiro, Luzinete, Isabella,
Gabriel e Ingrid.

AGRADECIMENTOS

A Deus, doador da vida e sustentador da mesma. Sem Ti eu nada poderia fazer, Obrigado por ter me sustentado e me direcionado até aqui. Obrigado pela fidelidade incondicional. Se cheguei até aqui foi por permissão Tua, pois nada acontece sem o Teu querer. *“Que é o homem para que com ele te importes”* Salmos 8:4. Embora eu não saiba a resposta, tenho certeza que Tu se importas comigo e pelo fato de se importar é que eu me mantenho de pé.

À minha família, sem os quais eu não seria ninguém nesse mundo. Obrigado meu pai pelo exemplo de homem que você é, quero sempre seguir seus passos e trilhar o caminho da honestidade igual ao teu. Obrigado minha mãe, por ser a mulher mais maravilhosa desse mundo! Obrigado por todo seu cuidado e carinho. Eu lhe devo um obrigado por tudo, mas o principal deles é por ter me apresentado a Deus. Minha irmã, minha caçula, que mesmo morando longe, não sai de perto de mim, obrigado pelo seu jeitinho carinhoso e preocupado, obrigado por sua parceria, pela amizade e por ter a coragem que tem, a qual eu não tenho nem a metade. Meu cunhado Gabriel, obrigado por todo seu incentivo e por festejar cada vitória minha como se fosse sua. Você e minha irmã têm feito muita falta por aqui. Minha noiva, Ingrid, obrigado pela tua vida e por ser exatamente o que faltava em mim, obrigado por todo seu apoio, por se orgulhar de mim nas coisas mais simples, obrigado pela parceria diária, obrigado pelos puxões de orelha e por tornar a vida mais leve. Aliás, ela se tornou bem mais leve a partir de 27/06/2015. Amo muito todos vocês. Sigamos firmes e pra sempre!

À minha orientadora, Dra. Rosely Zancopé que está comigo desde a iniciação científica. Obrigado por todo crescimento profissional proporcionado até aqui. Obrigado pela confiança no meu trabalho quando me apresentou esse trabalho ainda em forma de projeto.

Ao meu orientador, Dr. Allan Jefferson Guimarães, por todo crescimento profissional acrescentado durante esses quatro anos de convívio, obrigado pelas horas de debate científico no laboratório, pelo investimento no meu aprendizado das técnicas que eu ainda não conhecia e pelas horas agradáveis de convívio, as quais são essenciais para o dia a dia da pesquisa científica. Obrigado também por ser um cara paciente na hora de ensinar, por toda a didática e por além de orientador, se tornar meu amigo.

Ao Dr. Rodrigo de Almeida Paes, meu amigo, por ter me acompanhado durante o desenvolvimento e finalização desse trabalho. Obrigado também por ser um incentivador da minha carreira, sempre me dando uma palavra de apoio e me permitindo também participar dos seus projetos.

Ao meu grande amigo, Dr. Mauro de Medeiros Muniz, meu orientador na iniciação científica e no mestrado. Obrigado por todo apoio e incentivo, obrigado por todo conhecimento científico compartilhado, obrigado pela mansidão e pela parceria.

Ao Dr. Marcus de Melo Teixeira, por me ajudar a refinar as análises filogenéticas desse trabalho, obrigado por ensinar a trabalhar nas redes de haplótipos e pelas dicas iniciais nas análises filogenômicas, essa última como você mesmo diz: “é uma outra faculdade”. Obrigado pelos 23 dias de convívio em BSB, por me receber em seu laboratório, por várias vezes almoçarmos na sua casa e pelo dia na fazenda, foram dias muito agradáveis.

À minha amiga. Dra. Claudia Vera Pizzini, pelos dez anos de convívio e de amizade. Hoje, como já falei, te considero uma irmã. Obrigado por todo incentivo e pelo ombro amigo.

Ao meu amigo, Dr. Marcos de Abreu Almeida, revisor desse trabalho e amigo diário na bancada. Obrigado pela troca de ideia, obrigado pela parceria científica e pelas risadas. Ainda temos muito trabalho juntos.

Às minhas amigas Vanessa Brito e mais recentemente a amiga Andréa Engemann, pela amizade, pelas horas de convívio e por poder compartilhar um pouco do fardo da vida. Contem comigo também para o que precisarem!

Ao meu amigo, Prof. Lucas Machado Moreira. Você é um irmão, obrigado pela parceria de sempre, pelo bate papo, pela troca de informação e conhecimento. Obrigado por contribuir com meu crescimento profissional e pessoal. Estamos juntos!

Ao meu amigo, Prof. Luã Cardoso de Oliveira, pelo convívio diário e pelos momentos de ajuda em todos os momentos que precisei. Obrigado pela amizade de longa data.

A todos os amigos do Laboratório de Micologia, setor de Imunodiagnóstico. Rosângela, Beatriz, Letícia, Camila, Anna e Gabriela.

Aos amigos do Laboratório de Micologia, setor Diagnóstico Micológico. Helena, Rowena, Fábio, Gabriela Machado, Iara, Ana Beatriz Barreto e Ana Beatriz Souza.

À Carla Pena por toda ajuda e suporte dados ao laboratório e aos estudantes. Obrigado por toda amizade e pelas horas de convívio divertidas! Obrigado por todas as vezes que você me ajudou quando a impressora resolve obedecer apenas você.

Ao Professor Dr. José Mauro Peralta por abrir as portas do Laboratório de Diagnóstico Imunológico e Molecular das Doenças Infecciosas e Parasitárias (UFRJ) e permitir que eu desenvolvesse boa parte dos meus experimentos lá. Obrigado a todo o seu grupo.

Ao Professor Leonardo Nimrichter, por ceder o seu laboratório para a realização das microscopias de fluorescência, além de ceder diversos reagentes e insumos para a realização dos experimentos. Agradeço também

ao Leandro Honorato por gentilmente ceder todas as larvas de *Galleria mellonella* para a realização dos ensaios de virulência *in vivo* desse trabalho.

À plataforma de sequenciamento RPT01A da FIOCRUZ-RJ, a qual nos ajudou no sequenciamento dos fragmentos de DNA utilizados para as análises de MLST.

Ao Instituto de Patógenos e Microbiomas da Universidade do Arizona e ao Instituto de Pesquisa em Genômica Translacional, os quais nos ajudaram no sequenciamento de 18 genomas utilizados nesse estudo.

Obrigado ao Diego e Marina, por me ajudarem tanto nessa segunda etapa do meu trabalho, na qual eu precisei realizar técnicas que eu ainda não conhecia. Obrigado Marina, nessa reta final você foi essencial, sem sua ajuda eu não teria terminado o que eu precisava.

Ao corpo docente do Programa de Pós Graduação em Doenças Infecciosas, do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, por todo estímulo e pelos ensinamentos.

À Priscila Tavares de Sá, pela atenção, paciência e presteza com os alunos, além de toda eficiência e dedicação.

À Universidade Federal Fluminense pela oportunidade de realização do estágio de prática docente, onde pude aprender técnicas didáticas.

Ao órgão de fomento, principalmente a CAPES, CNPq e FAPERJ pelo auxílio financeiro de bolsas de estudo e custeio de insumos e reagentes, assim como ida a congressos científicos.

À banca examinadora, que gentilmente aceitou o convite para contribuir com este trabalho.

ALMEIDA-SILVA, Fernando. **Avaliação de espécies filogenéticas e tipos de compatibilidade sexual de *Histoplasma capsulatum* com a virulência de isolados clínicos.** 2019. 169 f. Tese (Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2019.

RESUMO

Histoplasma capsulatum é o agente causador da histoplasmose clássica, uma importante micose sistêmica, com predomínio nas Américas, com altos índices de mortalidade no Brasil e endêmica no estado do Rio de Janeiro. *H. capsulatum* é um fungo dimórfico, o qual pode se apresentar na fase filamentosa, quando em ambiente natural ou quando cultivado a 25°C. Já a fase leveduriforme ocorre quando cultivado a 37°C ou em parasitismo. Atualmente, o agente etiológico da histoplasmose é dividido em ao menos 17 espécies filogenéticas, baseadas em análises de MLST e em cinco espécies crípticas baseadas em análises filogenômicas. Diversos estudos já demonstraram que toda essa variabilidade genética tem potencial para que os respectivos isolados possam expressar diferentes fatores de virulência e níveis de patogenicidade. Nosso principal objetivo foi classificar filogeneticamente 50 isolados por MLST e dentre estes, 18 por WGS e comparar o perfil de virulência das principais espécies filogenéticas encontradas, tipos de compatibilidade sexual e forma clínica da histoplasmose. Observamos que a maioria dos isolados estudados se agrupou no clado RJ, o qual foi descrito recentemente, tendo ainda isolados se agrupando em outras espécies filogenéticas, como Northeast, LAmB1, Unknown1 e Panamá, baseados na técnica de MLST, sendo o agrupamento nas espécies Northeast e LAmB1, corroborado pela análise de WGS. Os ensaios de virulência demonstraram diferentes perfis de interação com macrófagos, resistência à fagocitose, assim como diferentes taxas de morte das larvas *Galleria mellonella*. Não foram encontradas associações entre os tipos de compatibilidade sexual e espécie filogenética com a manifestação clínica. No entanto, os ensaios de virulência *in vitro* e *in vivo* sugerem que as espécies Northeast e RJ são as mais virulentas. Estes dados sugerem a existência de diferentes mecanismos de virulência expressos pelas diferentes espécies filogenéticas de *H. capsulatum*, os quais podem ter impacto em diferentes níveis de patogenicidade. Além disso observamos uma nova população genética baseada na análise por WGS.

Palavras-chave: *Histoplasma capsulatum*; Virulência; Filogenia; Filogenômica.

ALMEIDA-SILVA, Fernando. **Avaliation of phylogenetic species and sexual compatibility types of *Histoplasma capsulatum* with the virulence of clinical isolates.** 2019. 169 p. Thesis (Doctorate in Clinical Research in Infectious Diseases) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2019.

ABSTRACT

Histoplasma capsulatum is the etiological agent of the classic histoplasmosis, an important systemic mycoses, with predominance in the Americas, with high mortality rates in Brazil and endemic in the state of Rio de Janeiro. *H. capsulatum* is a dimorphic fungus, which may present in the filamentous phase when in the natural environment or when grown at 25°C. The yeast phase occurs when grown at 37°C or in parasitism. Currently, the etiologic agent of histoplasmosis is classified into at least 17 phylogenetic species based on MLST and five cryptic species based on phylogenomic analyzes. Several studies have shown that all this genetic variability has potential for the respective isolates to express different virulence factors and pathogenicity levels. Our main goal was to phylogenetically classify 50 isolates using MLST and among these, 18 using WGS and compare the virulence profile of the main phylogenetic species types of sexual compatibility and clinical form of histoplasmosis. We observed that most of the isolates studied grouped in the RJ clade, which was described recently, and some isolates grouping in other phylogenetic species, such as Northeast, LAmB1, Unknown1 and Panama, based on the MLST technique, being the grouping in Northeast and LAmB1 species, corroborated by the WGS analysis. Virulence assays demonstrated different macrophage interaction profiles, phagocytosis resistance as well as different death rates of *Galleria mellonella* larvae. No associations were found between the types of sexual compatibility and phylogenetic species with the clinical manifestation. However, in vitro and in vivo virulence assays indicate that the Northeast and RJ species are the most virulent. These data suggest the existence of different virulence mechanisms expressed by different phylogenetic species of *H. capsulatum*, which may impact different pathogenicity levels. In addition, we observed a new genetic population based on WGS analysis

Keywords: *Histoplasma capsulatum*; Virulence; Phylogeny; Phylogenomics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição mundial dos casos autóctones de histoplasmose causados por <i>H. capsulatum</i>	24
Figura 2 - Distribuição dos casos de histoplasmose baseados no teste da histoplasmina e distribuição da detecção de <i>Histoplasma capsulatum</i> no meio ambiente publicadas no Brasil até o ano de 2018.....	26
Figura 3 - Número de surtos de histoplasmose reportados no Brasil durante o período de 1946 a 2017.....	27
Figura 4 - Distribuição geográfica do número de casos de histoplasmose reportados no Brasil no período de 1939 a 2018; Fontes de exposição associadas aos surtos descritos no Brasil no período de 1946 a 2017; Surtos e microepidemias descritos no Brasil no período de 1946 a 2017.....	29
Figura 5 - Triângulo da doença.....	30
Figura 6 - Patogenia da Histoplasmose.....	32
Figura 7 - Diagnóstico de histoplasmose no Brasil, no período de 1939 A 2018.....	40
Figura 8 - Micromorfologia e macromorfologia de <i>H. capsulatum</i> nas fases filamentosa e leveduriforme.....	45
Figura 9 - Representação do <i>locus MAT</i> de <i>H. capsulatum</i> com sua região idiomórfica.....	47
Figura 10 - Distribuição filogeográfica de isolados de <i>H. capsulatum</i> nos diferentes continentes.....	52
Figura 11 - Representação do processo de fluxo gênico.....	54
Figura 12 - Representação esquemática dos constituintes da parede celular de <i>H. capsulatum</i>	57
Figura 13 - Constituintes da parede celular dos diferentes quimiotipos de <i>H. capsulatum</i>	59
Figura 14 - Percentual dos isolados de origem ambiental, animal e clínica.....	87
Figura 15 - Isolamento de <i>H. capsulatum</i> de diferentes espécimes clínicos na histoplasmose disseminada.....	88

Figura 16 - Forma filamentosa de <i>H. capsulatum</i>	89
Figura 17 - Avaliação da coloração e aspecto das culturas quanto às fontes de isolamento.....	91
Figura 18 - Forma filamentosa de <i>H. capsulatum</i>	92
Figura 19 - Distribuição dos tipos de compatibilidade sexual quanto à fonte de isolamento.....	94
Figura 20 - Detecção simultânea dos <i>mating types</i>	95
Figura 21 - Amplificação da região parcial do <i>locus MAT1</i>	96
Figura 22 - Relações filogenéticas entre os isolados empregados no estudo.....	99
Figura 23 - Relações filogenéticas dos isolados estudados frente às sequências de <i>H. capsulatum</i> depositadas no GENBANK.....	101
Figura 24 - Variações nucleotídicas do gene <i>arf</i>	102
Figura 25 - Variação nucleotídica no fragmento estudado do gene <i>H-anti</i>	103
Figura 26 - Variação nucleotídica no fragmento estudado do gene <i>ole</i>	104
Figura 27 - Variação nucleotídica no fragmento estudado do gene <i>tub</i>	105
Figura 28 - Rede haplotípica dos clados LAmB1 e Unknown1.....	107
Figura 29 - Rede haplotípica do clado RJ.....	110
Figura 30 - Rede haplotípica do clado Nordeste.....	112
Figura 31 - Análises filogenômicas entre os 18 isolados frente a 30 genomas depositados no GENBANK.....	116
Figura 32 - Estrutura populacional baseada nas análises filogenômicas.....	118
Figura 33 - Avaliação da distribuição genética por meio da análise dos componentes principais.....	119
Figura 34 - Percentual de associação dos isolados estudados com macrófagos da linhagem RAW 264.7.....	120
Figura 35 - Número de unidades formadoras de colônias após ensaio de fagocitose com macrófagos da linhagem RAW 264.7.....	121
Figura 36 - Melanização das larvas do modelo <i>Galleria mellonella</i>	122
Figura 37 - Sobrevivência de larvas do modelo <i>Galleria mellonella</i> após infecção com <i>H. capsulatum</i>	123
Figura 38 - Microscopia de fluorescência.....	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Isolados de <i>Histoplasma capsulatum</i> analisados no estudo.....	86
Tabela 2 - Coloração e aspecto dos isolados incluídos no estudo.....	90
Tabela 3 - Distribuição dos isolados estudados entre os tipos de compatibilidade sexual <i>MAT1-1</i> e <i>MAT1-2</i>	93
Tabela 4 - Características gerais do isolados utilizados na otimização da técnica de detecção dos <i>MAT 1-1</i> e <i>1-2</i>	97
Tabela 5 - Isolados agrupados no clado LAmB1.....	108
Tabela 6 - Isolados agrupados no clado Unknown1.....	108
Tabela 7 - Isolados grupados no clado RJ.....	111
Tabela 8 - Isolados grupados no clado Nordeste.....	113
Tabela 9 - Índices de diversidade haplotípica.....	114
Tabela 10 - Correlação dos resultados dos isolados estudados.....	126

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC - Aldeia Curumim

AGS1 - Alfa-(1,3)-glucana sintase 1 (α -(1,3)-glucan synthase)

ANOVA - Análise de variância (*Analysis of variance*)

Arf - Fator de ribosilação do ADP (*ADP-ribosylation factor*)

ATCC - Coleção americana de culturas tipo (*American Type Culture Collection*)

BAC1 - Clado associado a morcegos (*Bat associated clade*)

BHI - Infusão cérebro-coração (*Brain-heart infusion*)

BLAST - Ferramenta para Busca de Alinhamento Local (*Basic Local Alignment Search Tool*)

bp - Pares de bases (Base pairs)

BR1 - Clado brasileiro 1 (*Brazilian clade 1*)

BR2 - Clado brasileiro 2 (*Brazilian clade 2*)

BR3 - Clado brasileiro 3 (*Brazilian clade 3*)

BR4 - Clado brasileiro 4 (*Brazilian clade 4*)

BSA - Soro albumina bovina (*Bovine serum albumin*)

cAMP - Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (*cyclic adenosine monophosphate*)

CAT A - Catalase A

CAT B - Catalase B

CAT P - Catalase P

CBP - Proteína ligante de cálcio (*Calcium Binding Protein*)

CFU - Unidades formadoras de colônia (*Colony forming units*)

ConA - Concanavalina A

CR3 - Receptor para complemento tipo 3 (*Complement receptor type 3*)

CYTED - Programa Ibero-Americano de Ciência e Tecnologia para o Desenvolvimento (Programa Ibero-Americano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo)

DMEM - Meio Dulbecco MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

DNA - Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)

mg - Miligrama

DNAsp - Programa para análises de sequências polimórficas de DNA (*DNA sequence polymorphism software*)

DOPA - di-hidroxi-fenil-alanina (*di hydroxy phenyl alanine*)

DRK - Histidina quinase regulador de dimorfismo 1 (*Dimorphism-regulating histidine kinase 1*)

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético (Ethylenediamine tetraacetic acid)

ELISA - Ensaio enzimático por imunoabsorção (Enzyme linked immunosorbent assay)

FACS - Classificação celular ativada por fluorescência (*Fluorescence-activated cell sorting*)

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

GAL - *Gerenciador de Ambiente Laboratorial*

GENBANK - Banco de dados de sequências genéticas (*Genetic sequence database*)

GlcNAc - N-acetil-glucosamina (*N-acetylglucosamine*)

GMS - Prata metenamina de Grocott (*Gomori Methenamine-Silver*)

H anti - Antígeno H (*H antigen*)

H&E - Hematoxilina e Eosina (*Hematoxin and eosin*)

H2B - Histona 2B (Histone 2B)

Hap - Haplótipo

Hd - Diversidade haplotípica

HIV - Vírus da imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus*)

HPC - Histoplasmoses Pulmonar crônica

HSP - Proteína de choque térmico (*Heat shock protein*)

ID - Imunodifusão dupla

IgG - Imunoglobulina G

IGS - Ilha Grande Solo

INI - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

IPEC - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

IT - Itaguaí

ITS - Espaço transcrito interno (*Internal Transcribed Spacer*)

IV - Intravenosa

K - Número de populações

LAmA - América latina A (*Latin America A*)

LAmB - América Latina B (*Latin America B*)

LBA - Lavado broncoalveolar

mAbs - Anticorpos monoclonais (monoclonal antibodies)

MEGA - Análise genética molecular evolutiva (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*)

MICOMOL - Rede ibero-americana de diagnóstico molecular de micoses sistêmicas e oportunistas (Red Iberoamericana De Diagnóstico Molecular De Las Micosis Sistemicas Y Oportunistas)

ML - Máxima verossimilhança (Maximum Likelihood)

MLST - Tipagem baseada em sequência de múltiplos *loci* (*Multilocus Sequence Typing*)

MO - Medula óssea

MOI - Multiplicidade de infecção (*Multiplicity of infection*)

MS - Mato Grosso do Sul

mtDNA - DNA mitocondrial (*mitochondrial DNA*)

NA - Não avaliado

NAm1 - América do Norte 1 (*North American 1*)

NAm2 - América do Norte 2 (*North American 2*)

ND - Não disponível

NIH - Instituto Nacional de Saúde (*National Institute of Health*)

NJ - Agrupamento de vizinhos (*Neighbor Joining*)

ole1 - Delta-9 desaturase do ácido graxo (*delta-9 fatty acid desaturase*)

PAS - Ácido periódico de schiff (*Periodic acid–Schiff*)

Pb - Pares de bases

PBS - Salina tamponada com fosfato (*Phosphate buffered saline*)

PCA - Análise de componentes principais (*Principal components analysis*)

PCM - Paracoccidiodomicose

PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction*)

PCs - Componentes principais (*Principal components*)

PDA - Ágar batata dextrose (Potato Dextrose Agar)

PDTIS - Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde

PS2 - Espécie filogenética 2 (*Phylogenetic species 2*)

PS3 - Espécie filogenética 3 (*Phylogenetic species 3*)

PS4 - Espécie filogenética 4 (*Phylogenetic species 4*)

q.s.p - quantidade suficiente para

qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
(*Quantitative real-time polymerase chain reaction*)

RAPD - Amplificação randômica de DNA polimórfico (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

rDNA - Ácido desoxirribonucleico ribossomal (*Ribosomal Deoxyribonucleic Acid*)

RFC - Reação de fixação de complemento

RFLP - Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

RJ - Espécie filogenética do Rio de Janeiro

RNAi - Ácido ribonucleico de interferência (*Ribonucleic acid interference*)

RPS - Rio da Prata Solo

rRNA - Ácido ribonucleico de interferência (*Ribonucleic acid interference*)

RS - Roedor silvestre

RYP1 - Regulador de crescimento da fase leveduriforme (*Regulator of yeast-phase growth*)

S1a - Espécie 1a (*species 1a*)

S1b - Espécie 1b (*species 1b*)

SID1 - Gene relacionado à biossíntese de sideróforos

SNP's - Polimorfismo de nucleotídeo único (*Single-nucleotide polymorphism*)

SP - São Paulo

TA - Temperatura ambiente

Taq - *Thermus aquaticus*

TBE - Tris base, ácido bórico e EDTA (*Tris-borate-EDTA*)

TI - Tinguá

TUB1 - alfa-tubulina (α -tubulin)

UAg EIA - Ensaio imunoenzimático para detecção de antígeno na urina (*Urine antigen enzyme immunoassay*)

UV - Ultravioleta

VE - Vesícula extracelular

WB - Western blot

WGS - Sequenciamento de genoma total (*Whole genome shotgun*)

YPS3 - Proteína específica da fase leveduriforme (*Yeast phase specific protein*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
1.1 HISTÓRICO.....	22
1.2 HISTOPLASMOSE	23
1.2.1 Epidemiologia	23
1.2.2 Patogenia.....	30
1.2.3 Manifestações Clínicas	32
1.2.4 Diagnóstico	34
1.2.4.1 Diagnóstico Micológico	35
1.2.4.2 Diagnóstico Histopatológico.....	36
1.2.4.3 Diagnóstico Imunológico	37
1.2.4.4 Diagnóstico Molecular.....	38
1.2.5 Tratamento	41
2.1 HISTOPLASMA CAPSULATUM.....	42
2.1.1 Ecologia.....	42
2.1.2 Morfologia	43
2.1.3 Reprodução	45
2.1.4 Taxonomia e filogenia molecular.....	47
2.1.5 Fatores de virulência.....	55
2.1.5.1 Carboidratos da parede celular	58
2.1.5.2 Lipídios da parede celular	61
2.1.5.3 Proteínas da parede celular	61
2.1.5.4 Vesículas extracelulares (VE)	66
2.1.5.5 Melanina	67
2.1.5.6 Sideróforo de hidroxamatos	68
2.1.5.7 Dimorfismo.....	68
2 JUSTIFICATIVA.....	70
3 OBJETIVOS.....	75
3.1 Objetivos específicos	75
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	76
4.1 Desenho de estudo.....	76
4.2 População de estudo	76
4.3 Cálculo amostral	76
4.4 Fenotipagem.....	77
4.4.1 Caracterização macro e micromorfológica das colônias fúngicas	77
4.5 Identificação molecular e filogenia dos isolados.....	78
4.5.1 Extração de DNA	78
4.5.2 Identificação dos tipos de compatibilidade sexual	78
4.5.3 Sequenciamento multilocus – MLST	79
4.5.4 Análises filogenéticas.....	80
4.5.5 Análises da diversidade haplotípica	81
4.5.6 Análises Filogenômicas	81
5 ENSAIOS DE VIRULÊNCIA.....	82
5.1 Ensaios <i>in vitro</i>	83
5.1.1 Ensaios de interação com macrófagos	83
5.1.2 Ensaios de sobrevivência do <i>H. capsulatum</i> em macrófagos.....	83
5.2 Ensaio <i>in vivo</i>	85
5.2.1 Infecção em <i>Galleria mellonella</i>	85
5.3 Microscopia de Fluorescência.....	85
6 RESULTADOS	87
6.1 População de estudo	87
6.2 Confirmação morfológica da espécie	90
6.3 Ensaios moleculares.....	94
6.3.1 Identificação molecular dos tipos de compatibilidade sexual.....	94

6.3.2 Análises filogenéticas por MLST (Multi Locus Sequence Typing)	99
6.3.3 - Diversidade Haplotípica	106
6.4 Análises filogenômicas	115
6.5 Ensaios de Virulência	121
6.6 Microscopia de Fluorescência.....	125
7 CORRELAÇÃO DOS DADOS	127
8 DISCUSSÃO.....	129
9 CONCLUSÕES.....	145
10 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	146
REFERÊNCIAS	147
PRODUÇÕES BIBLIOGRÁFICAS AO LONGO DO DOUTORAMENTO.....	166

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - HISTÓRICO

Histoplasma capsulatum foi descrito pela primeira vez pelo patologista americano Samuel Taylor Darling, em 1905, quando investigava a prevalência de leishmaniose em necropsia de trabalhadores com hepatoesplenomegalia, na região do Canal do Panamá. Durante o estudo, ao realizar necropsia em um homem negro, adulto, nativo de Martinica, que foi a óbito devido a uma doença febril, foi observada a presença de macrófagos e histiócitos de baço, fígado, entre outros, parasitados por um protozoário aparentemente encapsulado, semelhantes a protozoários da espécie *Leishmania sp.*, sem cinetoplasto, que até o momento ainda não havia sido descrito e este foi denominado *Histoplasma capsulatum* (DARLING, 1906).

Sete anos após esta descrição, o pesquisador brasileiro, Henrique da Rocha Lima, classificou este microrganismo como um fungo, sugerindo que o mesmo, originalmente considerado como um protozoário seria uma levedura (ROCHA LIMA, 1912).

A histoplasmose, doença causada por *H. capsulatum*, teve o seu primeiro caso descrito em um lactente de seis meses (DODD; TOMPKINS, 1934). No mesmo ano foi realizado o primeiro cultivo deste microrganismo foi realizado no mesmo ano, e este fato possibilitou a caracterização de *H. capsulatum* como um fungo dimórfico, pois além do cultivo em fase filamentosa, realizou-se a infecção experimental em animais de laboratório demonstrando seu aspecto leveduriforme (DE MONBREUN, 1934).

Após essa demonstração, também sucedeu uma análise na qual foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica, evidenciando a ausência da cápsula, anteriormente descrita, de maneira equivocada por Darling. Entretanto, não houve mudança na nomenclatura do fungo (RIBI; SALVIN, 1956).

No Brasil, o primeiro isolamento de *H. capsulatum* foi realizado por Almeida e Lacaz em 1939, a partir de um cultivo de fragmento de biópsia de uma lesão de cromoblastomicose (ALMEIDA; LACAZ, 1939). Os mesmos autores descreveram o segundo isolamento, em 1941, em escarro de um

paciente com tuberculose pulmonar (ALMEIDA; LACAZ, 1941). O primeiro caso de histoplasmose diagnosticado no Brasil ocorreu em 1941, em uma criança de três anos de Minas Gerais, a qual desenvolveu a forma juvenil desta micose (VILELA; PARÁ, 1941).

1.2 - HISTOPLASMOSE

1.2.1 - Epidemiologia

A histoplasmose é importante sob o ponto de vista epidemiológico devido à sua distribuição mundial (SULLY; BADDLEY, 2018; ALMEIDA et al., 2019). Casos têm sido descritos na última década, sugerindo que novas áreas endêmicas de histoplasmose estejam emergindo ao redor do mundo (PAN et al., 2013).

Diversos casos autóctones já foram descritos em todos os continentes, contabilizando mais de 60 países com este tipo de relato (NEGRONI, 2005). Além de casos na Oceania e na África Subsaariana, apresenta nítido predomínio nas Américas (BAHR et al., 2015). Com isso, a histoplasmose é uma das micoses de maior importância no continente americano devido a sua endemicidade, sendo a região central dos Estados Unidos e o Brasil, áreas com as maiores concentrações de indivíduos infectados e conseqüentemente com os maiores números de relatos na literatura entre indivíduos portadores de HIV, acometendo 79 a cada 100 indivíduos (ADENIS et al., 2018).

Em 2016 foi realizada uma revisão de literatura e os autores observaram que diversos países possuem números significativos de histoplasmose associados à infecção por HIV (WHEAT et al., 2016). Casos autóctones foram contabilizados e estratificados em diferentes países. No continente asiático, a Tailândia é o país que apresenta o maior número de casos de histoplasmose.

No continente africano, Zimbábue e África do Sul são os países com maior número de casos, ao passo que na Europa, apenas a Itália contabilizou dados, com até dez casos. Já nas Américas, observou-se que no Norte, os Estados Unidos contabilizaram o maior número de casos, com um número variando de 1.600 a 1.800 casos autóctones descritos na literatura.

Na América do Sul, Guiana e Brasil demonstram os números mais altos desse tipo de relato, no entanto o Brasil apresenta um nítido predomínio, com mais de 2.000 casos relatados na literatura. Outro dado importante relatado, é que a maior parte dos casos de histoplasmose africana são relatados fora do continente (WHEAT et al., 2016) (Figura 1).

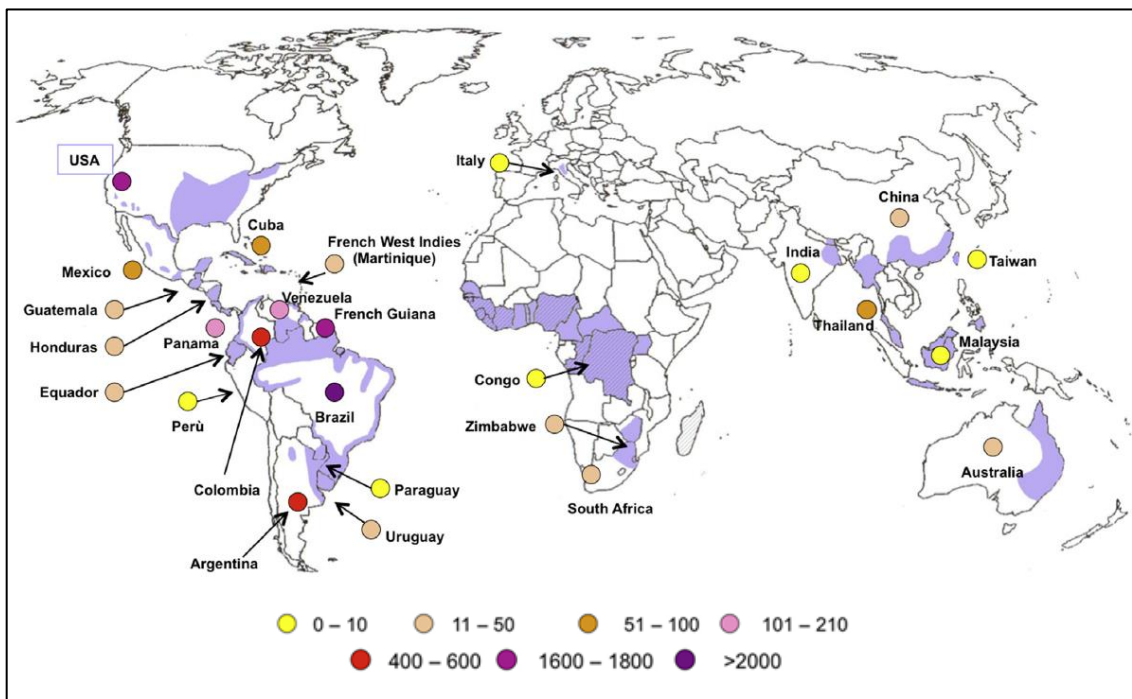


Figura 1 – Distribuição mundial dos casos autóctones de histoplasmose causados por *H. capsulatum* (lilás) e *H. duboisii* (traçejada) relacionados a aids, destacando o Brasil, que possui mais de dois mil casos. (Adaptado de WHEAT et al., 2016).

A maioria do conhecimento sobre a epidemiologia da histoplasmose tem origem em investigações realizadas durante surtos epidêmicos, que em geral ocorrem quando indivíduos são expostos a um grande número de partículas infectantes, presentes em uma área contaminada (ALMEIDA et al., 2019).

Diversos surtos de histoplasmose são associados com visitas a cavernas, habitadas por morcegos, onde *H. capsulatum* pode ser facilmente isolado. Sendo assim, o primeiro surto de histoplasmose foi descrito em 1948 no estado de Arkansas, nos Estados Unidos e foi fortemente associado à exploração de cavernas (WASHBURN; TUOHY; DAVIS, 1948). Em Illinois, nos EUA, quatro trabalhadores que revolviam fezes de morcegos marrons (*Eptesicus fuscus*) no sótão de um prédio, após um período de dez dias, apresentaram sintomas compatíveis com histoplasmose (BARTLETT et al., 1982).

Uma região de grande importância nos Estados Unidos, que trouxe muito conhecimento acerca da histoplasmose foi a região de Indianápolis, a qual relatou três grandes surtos, sendo o primeiro em 1978, o segundo em 1980 e o terceiro começando em 1988 e terminando em 1993 (WHEAT, 1997).

Outros dois surtos também foram descritos em Illinois, um em operários que trabalhavam em um galpão que era usado para armazenamento de alimentos para animais e outro em trabalhadores que executavam a reconstrução de uma ponte onde havia excretas de morcegos (HUHN et al., 2005).

Em 2008, foram relatados três casos de pesquisadores que contraíram histoplasmose após exposição por aproximadamente uma hora e meia na entrada da caverna Tamana, no grupo de ilhas de Trinidad e Tobago para observação das espécies de morcegos locais (JULG et al., 2008).

Em Quebec, no Canadá, 14 pessoas foram identificadas com sintomas respiratórios entre 30 indivíduos potencialmente expostos à reforma de uma casa antiga, entre elas, trabalhadores envolvidos com a reforma e residentes da região. Dessa maneira, houve uma forte correlação entre a exposição à poeira da demolição contendo excretas de morcego ou pássaros e o diagnóstico de histoplasmose (CDC, 2014).

No Brasil, a distribuição de *H. capsulatum* no meio ambiente tem sido amplamente estudada, onde diversos trabalhos referentes ao isolamento deste fungo do solo já foram realizados (ZANCOPÉ-OLIVEIRA; TAVARES; MUNIZ, 2005). Além disso, diversos inquéritos utilizando intradermoreação com histoplasmina revelaram uma prevalência bastante significativa da histoplasmose no Brasil (ZANCOPÉ-OLIVEIRA; MUNIZ; PIZZINI, 2019; ALMEIDA et al., 2019) (Figura 2A).

O isolamento ambiental de *H. capsulatum* no Brasil já foi descrito em diversas fontes, como o próprio solo, isolamento em fezes de morcegos, além do isolamento oriundo de outras amostras, provenientes tanto de animais silvestres como de domésticos (ZANCOPÉ-OLIVEIRA; WANKE, 1986; NAIFF et al., 1986; ALMEIDA et al., 2019) (Figura 2B).

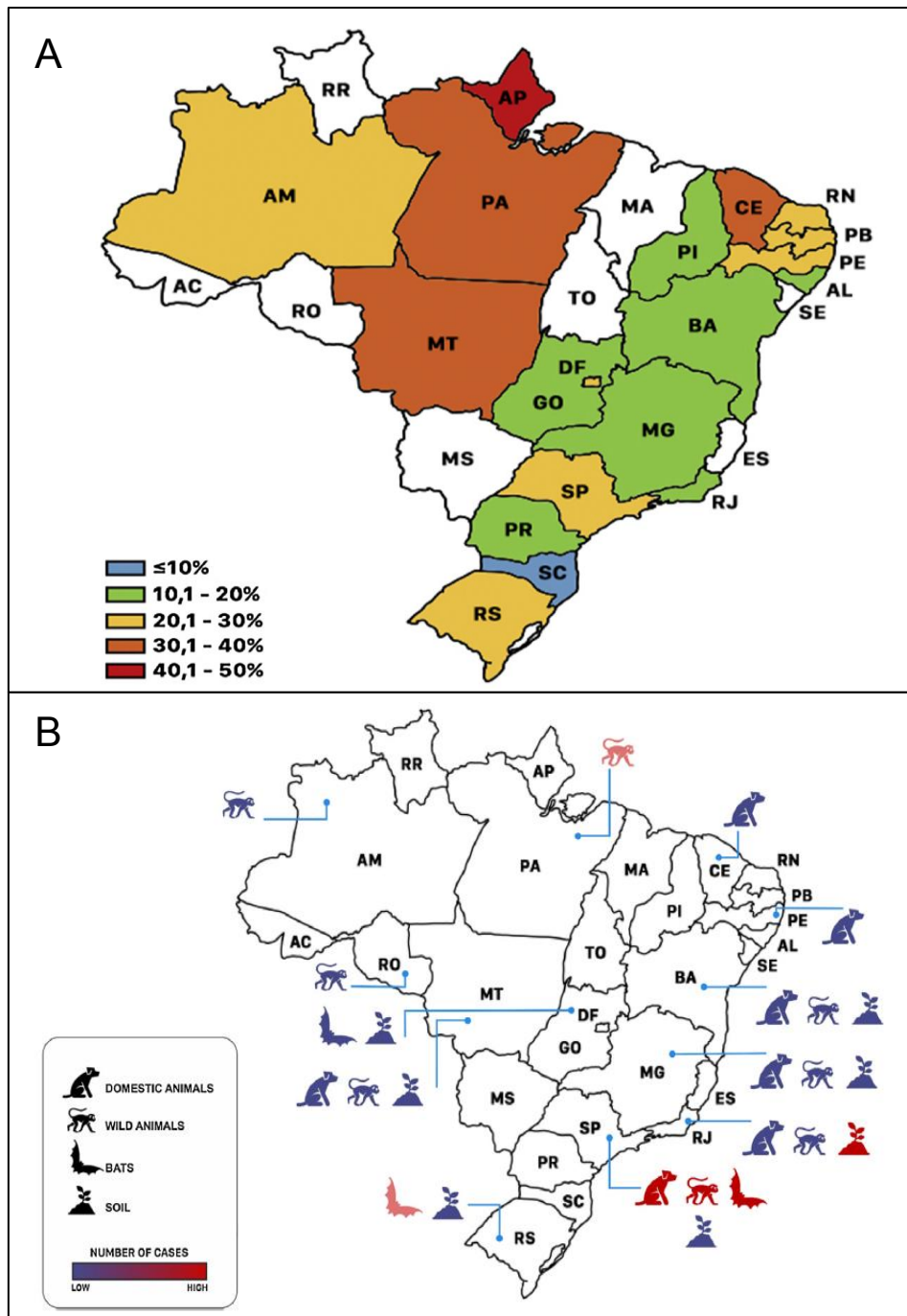


Figura 2 – Detecção e isolamento de *H. capsulatum*. (A) Médias de infecção por *H. capsulatum* determinadas em cada estado brasileiro por teste de positividade à histoplasmina. (B) Regiões brasileiras com detecção ambiental (solo e animais domésticos e silvestres) de *H. capsulatum* até o ano de 2018. (Adaptado de ALMEIDA et al., 2019).

No Brasil, a maioria do registro de histoplasmose relata que os indivíduos acometidos foram infectados em visitas a grutas ou cavernas que eram habitadas por morcegos ou estiveram em casas cujos forros estavam contaminados com fezes de aves ou morcegos (FAVA-NETTO et al., 1976; SUZAKI et al., 1995; TAYLOR et al., 1999; CURY et al., 2001; VICENTINI-MOREIRA et al., 2008; GUERRA et al., 2019).

Apesar da histoplasmose no Brasil ser bem estudada, os casos da doença são subestimados, sugerindo que possam existir mais áreas endêmicas do que as que já são conhecidas (FAIOLLA et al., 2013). Além disso, a histoplasmose não é uma doença de notificação compulsória no Brasil, com exceção do estado de Goiás. Dessa maneira, não se sabe ao certo o real panorama da doença no território nacional, tanto de casos únicos, como de surtos, os quais tiveram o maior número de relatos na década de 80 (GUERRA et al., 2019) (Figura 3).

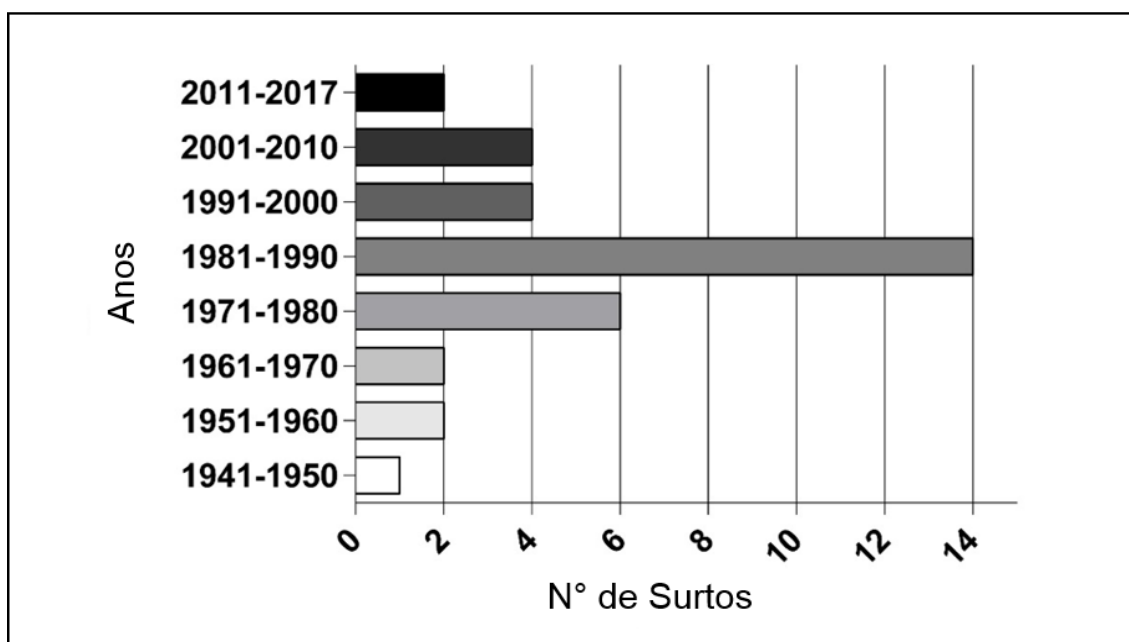


Figura 3 – Número de surtos de histoplasmose reportados no Brasil durante o período de 1946 a 2017. (Adaptado de GUERRA et al., 2019).

Dentro do território brasileiro, o estado do Rio de Janeiro apresenta áreas com altos índices de contaminação, consideradas como áreas endêmicas ou hiperendêmicas (ZANCOPÉ-OLIVEIRA; MUNIZ; WANKE, 2013; ALMEIDA et al., 2019; GUERRA et al., 2019).

Tanto o primeiro caso brasileiro de histoplasmose crônica disseminada quanto o primeiro caso de histoplasmose pulmonar crônica, foram relatados em pacientes residentes no estado do Rio de Janeiro, em 1945 e 1959 respectivamente (DUARTE, 1945; PAULA et al., 1959a).

O primeiro relato de uma microepidemia de histoplasmose no Brasil ocorreu também no Rio de Janeiro, em 1959, envolvendo crianças nativas do estado (PAULA, 1959b).

Em 2003, foi realizado um estudo, onde foi relatada uma microepidemia ocorrida em Niterói, no qual cinco crianças que limpavam um forno desativado, que era utilizado para a produção de carvão vegetal se infectaram com *H. capsulatum* (MARTINS et al., 2003).

Recentemente, duas revisões sistemáticas demonstraram a importância da epidemiologia da histoplasmose no estado do Rio de Janeiro. Uma delas demonstra a importância da histoplasmose no estado, o qual, assim como os estados de Goiás, Rio Grande de Sul e Distrito Federal, possui próximo de 1.000 casos de histoplasmose reportados na literatura entre 1939 e 2018 (ALMEIDA et al., 2019) (Figura 4A).

A segunda revisão sistemática relatou que o estado do Rio de Janeiro contabiliza 50% dos surtos relatados na literatura entre os anos de 1946 e 2017, os quais tiveram, em sua grande maioria, associação com locais contaminados com excretas de aves e morcegos, como cavernas, grutas e galinheiros. Além disso, cidades pertencentes ao estado do Rio de Janeiro, como Paraíba do Sul, Petrópolis, Vassouras, Duque de Caxias, São Gonçalo, Niterói, Angra dos Reis e a cidade do Rio de Janeiro foram descritas como locais onde ocorreram o maior número de casos (GUERRA et al., 2019) (Figura 4B e C).

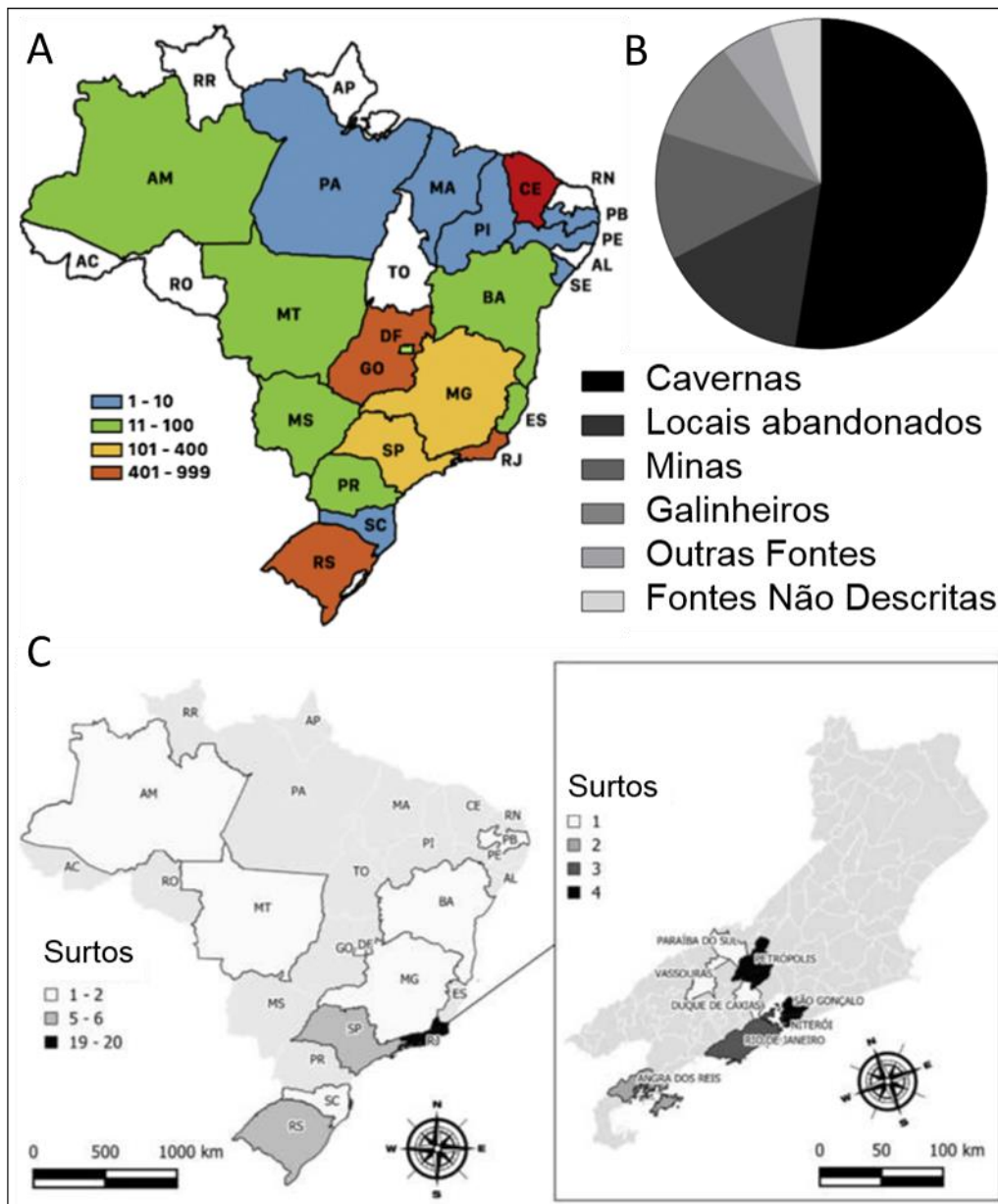


Figura 4 – Histoplasmosse no Brasil – (A) Distribuição geográfica do número de casos de histoplasmosse reportados no Brasil no período de 1939 a 2018 (Adaptado de ALMEIDA et al., 2019). (B) Fontes de exposição associadas aos surtos descritos no Brasil no período de 1946 a 2017, com 52,5% dos surtos associados a cavernas, 15% a locais abandonados, 12,5% associados a minas, 10% a galinheiros, outras fontes e fontes não descritas com 5% cada. (C) Surtos e microepidemias descritos no Brasil no período de 1946 a 2017. Os estados de AM, MT, BA, MG, PB, SC e DF (branco), SP e RS (cinza) e RJ (preto), reportaram 1-2, 5-6 e 19-20 surtos no período, respectivamente. (Adaptado de GUERRA et al., 2019).

1.2.2 - Patogenia

Histoplasma capsulatum infecta seu hospedeiro por via respiratória e com raras exceções por outras vias, tais como inoculação cutânea (SAHEKI et al., 2008) e um caso descrito na literatura de transmissão vertical (FERREIRA et al., 1988).

Esta micose apresenta um amplo espectro clínico, variando desde formas leves, a graves e disseminadas. O início da infecção por *H. capsulatum* depende de uma interação entre o fungo e seu hospedeiro e, pelo menos três condições podem ser observadas na patogenia desta micose: o estado imunológico do hospedeiro, a virulência da cepa infectante e/ou a carga parasitária adquirida (GOODWIN; LOYD; DES PREZ, 1981) (Figura 5).

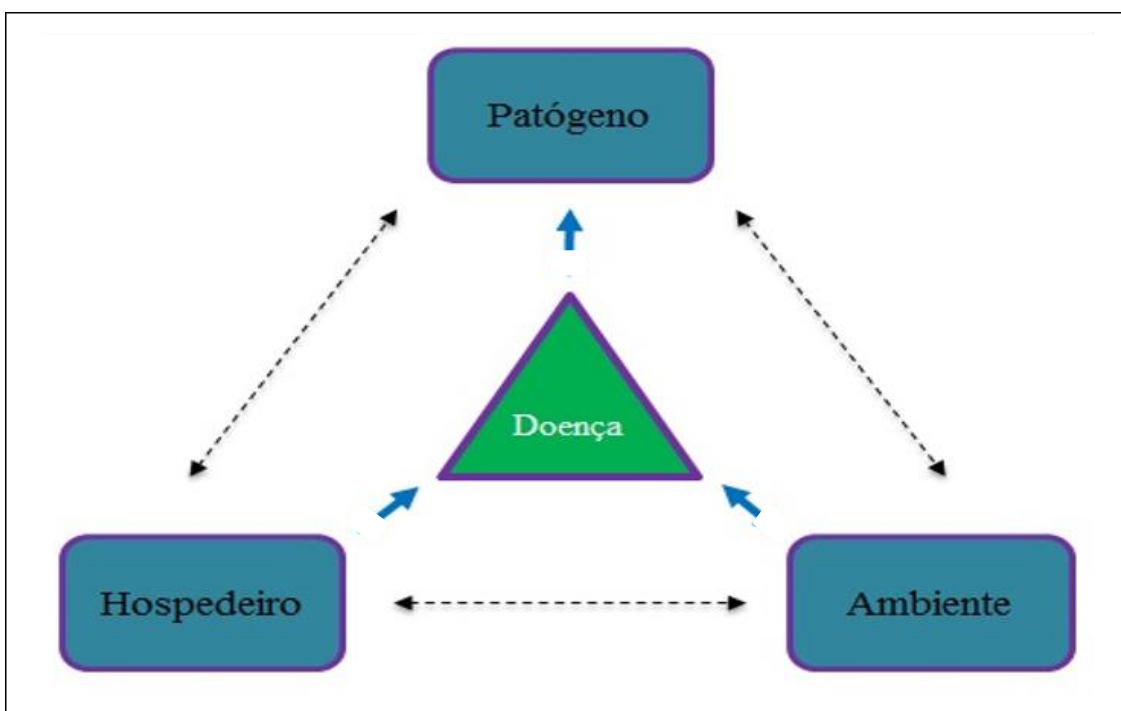


Figura 5: Triângulo da doença: A doença pode ocorrer por meio de uma interação entre hospedeiro (Suscetibilidade genética, estágio de desenvolvimento, sistema imune), ambiente (Fatores bióticos e abióticos: solo, temperatura, pH, umidade) e patógeno (Fatores de virulência, quantidade do inóculo, dispersão), onde hospedeiro, patógenos e ambiente podem se relacionar entre si (setas) e junção de fatores pode ocasionar doença.

As células T e os fagócitos fazem parte da principal resistência do hospedeiro contra *H. capsulatum*. A imunidade protetora é caracterizada pela indução da produção de citocinas pelas células T, particularmente IFN- γ e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), ativando subsequentemente as células

fagocíticas, sendo os macrófagos as células efetoras primárias da resistência do hospedeiro contra *H. capsulatum* (ALLEENDOERFER; DEEP, 1998).

A infecção por *H. capsulatum* se inicia após a inalação e deposição das partículas infectantes nos alvéolos pulmonares, principalmente os microconídios e pequenos fragmentos de hifas, que são leves e se dispersam pelo ar e que são capazes de penetrar nos alvéolos pulmonares. Este evento é seguido pela conversão destas partículas em leveduras, o qual tem sido considerado como fator crítico para a patogenicidade de *H. capsulatum* (MITTAL et al., 2018).

Nos alvéolos pulmonares estes organismos se incorporam ao parênquima pulmonar através da migração de macrófagos alveolares, bem como de polimorfonucleares, determinando dessa maneira, uma pneumonia intersticial, e este processo de transição pode começar dentro de algumas horas, podendo levar alguns dias após a exposição. Durante a infecção primária, as células leveduriformes são fagocitadas, levando a ativação do sistema fagocítico mononuclear e liberação de mediadores químicos participantes do mecanismo oxidativo. Fagócitos repletos de *H. capsulatum* migram então para os linfonodos adjacentes, onde um novo foco inflamatório é formado, constituindo um complexo primário pulmonar.

Posteriormente, pode ocorrer disseminação hematogênica para outros órgãos como fígado, baço e medula óssea entre outros, e de duas a três semanas após o início da infecção, ativa-se a imunidade celular específica e linfócitos T sensibilizados ativam macrófagos para fagocitarem e lisarem leveduras intracelulares (WHEAT, 2003).

Além da formação de granuloma, delimitando o processo tanto nos focos primários como nos secundários. Pode haver necrose de caseificação, encapsulamento fibroso e frequente depósito de sais de cálcio nas lesões residuais. O controle da infecção parece estar associado com a ativação da imunidade celular e a resolução da infecção é coincidente com a ativação e proliferação de linfócitos T, que ainda induzem os macrófagos a secretarem TNF- α para auxiliarem na destruição do fungo (FLOR et al., 2003).

Após a infecção primária, *H. capsulatum* pode persistir viável no interior dos granulomas durante anos (NOSANCHUK; GACSER, 2008). Assim, reativação endógena pode explicar casos de histoplasmoze disseminada em

indivíduos imunocomprometidos residentes em áreas de baixa endemicidade, mas que anteriormente viveram em áreas endêmicas ou viajaram para tais áreas (Figura 6).

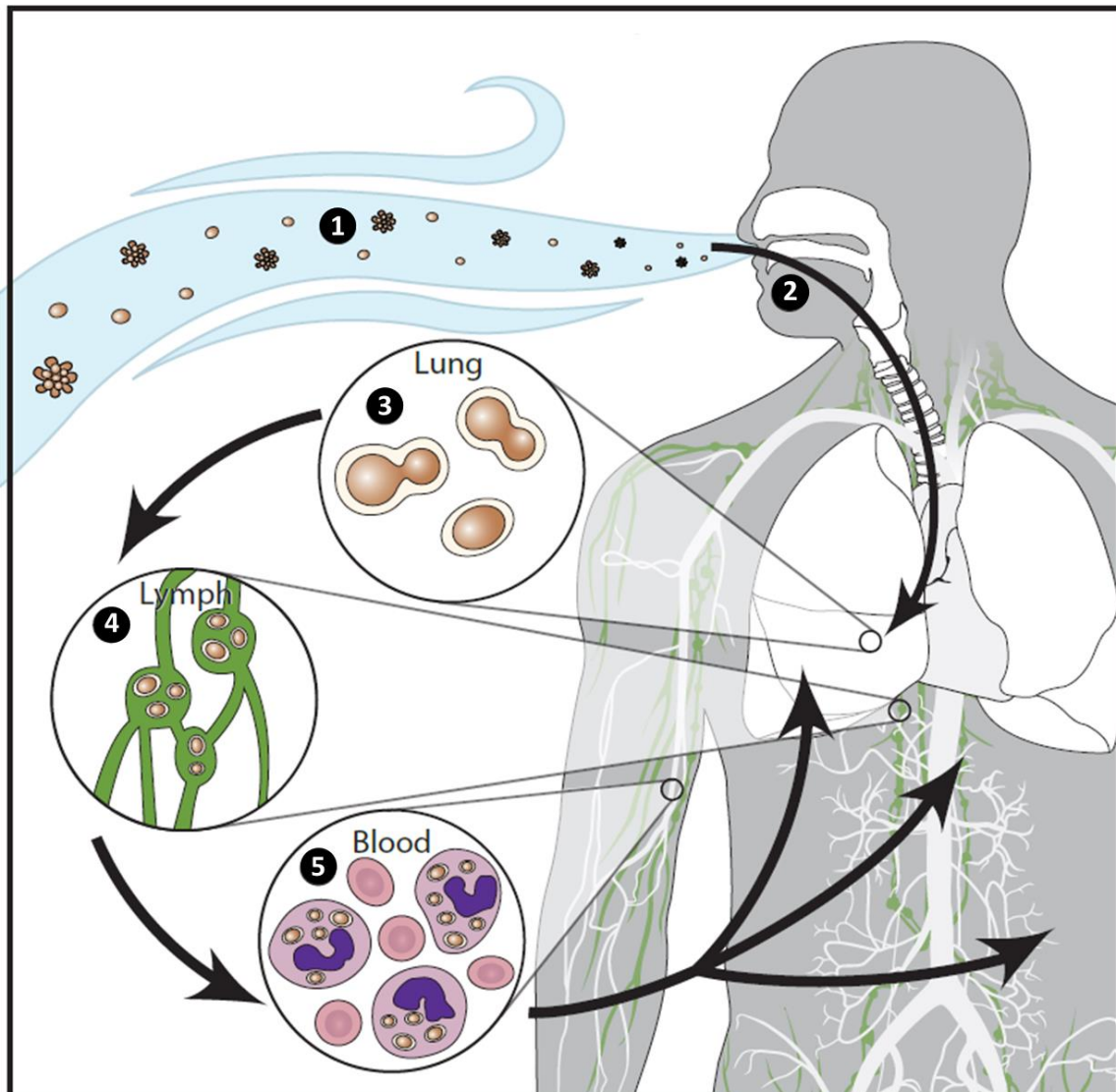


Figura 6 – Patogenia da histoplasmose: (1) As partículas infectantes são aerossolizadas, (2) são inaladas por um hospedeiro, (3) se depositam no pulmão, (4) migram ao linfonodo mais próximo e (5) podem chegar à corrente sanguínea e serem disseminadas por via hematogênica. (Fonte: Centers for Disease Control and Prevention, CDC – Atlanta).

1.2.3 Manifestações Clínicas

Após a exposição primária a *H. capsulatum*, menos de 1% dos indivíduos apresentam manifestações clínicas, dentre estes, principalmente aqueles que foram expostos à inalação de grande quantidade de propágulos fúngicos (KAUFFMAN, 2009).

Os casos sintomáticos desta micose em indivíduos imunocompetentes, apresentam-se comumente como infecções autolimitadas do trato respiratório e a inalação abundante de conídios de *H. capsulatum* pode levar ao surgimento de uma forma pulmonar aguda, em geral, após duas ou três semanas da exposição ao fungo. Nesta forma clínica, os sintomas podem ser identificados em 85 a 100% dos casos, nos quais se constata febre, calafrios, mialgia, anorexia, tosse, dispneia, cefaleia, e dor torácica. Entretanto, todos estes sintomas são inespecíficos, portanto, podem ser comumente observados em outras doenças (WHEAT et al., 2000; SEVERO et al., 2001; ROSSINI; GOULART, 2006). Na maioria dos casos, esta forma clínica tende a regredir sem tratamento específico em um período que pode variar entre duas e quatro semanas (FERREIRA; BORGES, 2009). A histoplasmose pulmonar aguda é observada em casos isolados ou sob a forma de surtos epidêmicos, em pessoas que realizam atividades recreativas ou laborais, em locais onde há micro nichos do fungo (KAUFFMAN, 2007).

Em indivíduos com lesões pulmonares pré-existentes, como enfisema centrolobular ou bolhoso, ou defeitos anatômicos estruturais, a histoplasmose pode ocorrer sob a forma pulmonar crônica. Neste caso, a histoplasmose apresenta características extremamente similares à tuberculose, com formação de granulomas e acometimento da região apical-posterior dos pulmões, já que estas lesões pulmonares favorecem a instalação do foco inicial da doença. Esta forma, em geral, acomete indivíduos com mais de 50 anos de idade, tabagistas e portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica. Clinicamente pode-se observar a presença de febre baixa vespertina, sudorese noturna, perda de peso, dor torácica e tosse com hemoptise (GOODWIN; DES PREZ, 1973; WHEAT et al., 2000; FERREIRA; BORGES, 2009; OIKAWA et al., 2010; MITTAL et al., 2018).

A forma disseminada da histoplasmose ocorre principalmente em pessoas com algum mecanismo de imunossupressão, como pacientes com neoplasias hematológicas (leucemias e linfomas), transplantados, em uso prolongado de corticosteróides e indivíduos com aids. Entretanto, cerca de 20,0% dos casos ocorrem em pessoas saudáveis que foram expostas a um inóculo maciço e esta é uma forma clínica definida pela presença de foco

extrapulmonar e extraganglionar de curso progressivo (KUROWSKI; OPSTAPCHUK, 2002; WHEAT et al., 2004).

Febre persistente, perda de peso e esplenomegalia são os achados clínicos mais frequentes na histoplasmose disseminada. Outros sinais e sintomas que podem ser observados incluem adenopatias, hepatoesplenomegalia, tosse, adinamia e sudorese (CORTI et al. 2000; HAJJEH, 1995). Em geral, observa-se infiltrado pulmonar intersticial à radiografia de tórax, e pancitopenia ao hemograma (KAUFFMAN, 2007; PONTES et al., 2010).

A ocorrência de manifestações cutâneas em áreas não endêmicas pode ser menor que 1%, no entanto, existem estudos que mostram que estas manifestações em histoplasmose disseminada ocorrem com maior frequência em pacientes com aids (KARIMI et al., 2002; PECHING; KUMAKAWA; GALARZA, 2004). Pacientes com infecção mista (aids e histoplasmose), procedentes da América do Sul, especialmente do Brasil, apresentam alguma lesão de pele, em até 80% dos casos (CORTI et al., 2000; KARIMI et al., 2002).

A coinfeção aids-histoplasmose tem sido estudada e estudos demonstram um importante aumento desses casos, dentre os quais, a histoplasmose na forma disseminada é a principal forma observada nos últimos anos (BRILHANTE et al., 2012). No nordeste brasileiro, observa-se uma das mais altas prevalências de HIV/aids da América Latina e o estado do Ceará possui uma das maiores taxas de mortalidade por histoplasmose no mundo, como uma taxa de 33 a 42% de mortalidade (DAMASCENO et al., 2019).

1.2.4 - Diagnóstico

O diagnóstico da histoplasmose baseia-se nos aspectos clínicos, laboratoriais, radiológicos e epidemiológicos, uma vez que sua sintomatologia é inespecífica, fato esse que pode gerar um diagnóstico equivocado. Com isso, é fácil compreendermos a necessidade de métodos diagnósticos específicos, mantendo as evidências clínicas como suporte (WHEAT et al., 2004; ROSSINI; GOULART, 2006).

1.2.4.1 - Diagnóstico Micológico

O diagnóstico definitivo baseia-se na identificação de *H. capsulatum* em materiais biológicos, empregando-se simultaneamente duas metodologias: exame direto e cultivo. No exame direto, a demonstração de células leveduriformes de *H. capsulatum* em espécimes clínicos por microscopia, em preparações a fresco ou utilizando hidróxido de potássio (KOH 10%) apresenta baixa sensibilidade, uma vez que o fungo se apresenta com dimensões muito pequenas, tornando o agente fúngico de difícil identificação após este tratamento. A sensibilidade do exame microscópico direto em geral é baixa, mesmo com colorações específicas e está relacionada à forma clínica: 10% na histoplasmose pulmonar aguda, 40% na pulmonar crônica e menor que 25% na forma disseminada (WHEAT, 2003; GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, 2006).

A confirmação do diagnóstico se dá pelo isolamento e identificação de *H. capsulatum* em amostras de tecido e/ou fluidos corporais através de cultivo em meios especiais para isolamento, como Ágar Sabouraud e Mycosel, entre outros, incubados a 25°C durante um período que pode variar de seis a 12 semanas. Nestas condições, *H. capsulatum* inicialmente apresenta no seu crescimento, colônias glabras, que com o tempo tornam-se filamentosas, aéreas, algodoadas, de coloração branca, compostas microscopicamente por uma trama miceliana caracterizada por hifas hialinas septadas, microconídios, e macroconídios tuberculados em vários estágios evolutivos e estas colônias tendem a melanizar proporcionalmente ao tempo de cultivo. A evidência destes conídios sugere a identidade deste como *H. capsulatum*. Entretanto, a conversão desta fase para a forma leveduriforme é fundamental, uma vez que fungos saprófitos do gênero *Chrysosporium* podem apresentar estruturas de propagação semelhantes às produzidas pelo agente da histoplasmose (GAUR; LICHTWARDT, 1980).

Para obtenção da fase leveduriforme é necessário realizar repiques da fase filamentosa da colônia suspeita em meios enriquecidos, tais como Ágar sangue, Ágar infusão cérebro-coração (BHI), ambos acrescidos de cisteína, além do meio ML Gema (FRESSATTI et al., 1992), todos com subsequente incubação a 35-37°C.

Quando convertidos, observam-se colônias lisas, branco-amareladas, úmidas, apresentando à microscopia, leveduras ovais, unibrotantes e de morfologia uniforme (RIPPON, 1988; LACAZ et al., 2009). No entanto, *H. capsulatum* não converte facilmente, dependendo assim, da exigência de nutrientes, condições de temperatura e ainda, das características fisiológicas de cada cepa (EISSENBURG; GOLDMAN, 1991).

O isolamento e identificação do fungo em cultivo embora considerados métodos de referência, apresentam limitações, uma vez que o crescimento pode ser muito lento, durando de 6 a 12 semanas (RIPPON, 1988; BUITRAGO et al., 2006; MAUBON; SIMON; AZNAR, 2007).

As culturas podem ser negativas em muitos pacientes com formas brandas de histoplasmose, limitando sua utilização nestes casos. Pacientes com histoplasmose disseminada e crônica apresentam cultivos positivos provenientes de seus espécimes clínicos, no entanto, mesmo nestes casos a cultura pode ser falso-negativa em 20% dos casos disseminados e 50% dos casos crônicos (WHEAT et al., 1997).

1.2.4.2 - Diagnóstico Histopatológico

O diagnóstico histopatológico da histoplasmose é baseado na observação de macrófagos parasitados com células leveduriformes em cortes corados pela hematoxilina-eosina (H&E). As leveduras aparecerão como um corpúsculo ligeiramente basofílico, esférico ou ovalado, medindo de 2 a 4µm de diâmetro, rodeadas por um halo claro, delimitado por uma parede celular muito fina e hialina, podendo apresentar um brotamento estreito variável (RIPPON, 1988; ROSSINI; GOULART 2006; CUNHA et al., 2007).

Outras colorações utilizadas são a impregnação argêntica de Gomori-Grocott (GMS) e ácido periódico de Schiff (PAS), nas quais, a parede celular do fungo é fortemente corada, permitindo a visualização das leveduras unibrotantes, pequenas, ovais ou arredondadas. No entanto, a positividade deste método gira em torno de 50%, ocorrendo ainda resultados falso-positivos com outros fungos como *Candida glabrata*, *Penicillium marneffeii*, *Pneumocystis jirovecii* ou artefatos de coloração (WHEAT et al., 2002).

1.2.4.3 - Diagnóstico Imunológico

Os métodos de diagnóstico imunológico são importantes no diagnóstico das principais micoses sistêmicas endêmicas: coccidioidomicose, blastomicose, histoplasmoses e paracoccidioidomicose. Em algumas ocasiões, o resultado destes métodos é a primeira indicação da natureza fúngica da doença em um paciente.

As duas principais técnicas utilizadas na detecção de anticorpos anti-*Histoplasma* dentro da rotina laboratorial devido a sua conveniência, disponibilidade e precisão, são as técnicas de imunodifusão dupla de Ouchterlony (ID) (OUCHTERLONY, 1962) e reação de fixação do complemento (RFC) (GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, 2006).

A ID é uma técnica altamente específica para o diagnóstico da histoplasmoses, com valores próximos a 100%, no entanto, apresenta limitações quanto a sensibilidade, que pode variar de 70 a 100%, fazendo com que os anticorpos específicos possam não ser detectáveis em um período de quatro a seis semanas após o aparecimento dos sintomas, fornecendo assim, resultados falso-negativos (PIZZINI et al., 1999; GUIMARÃES; NOSANCHUK; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, 2006).

A RFC, embora muitas vezes seja mais sensível (72,8-94,3%) que a ID, pode apresentar reatividade cruzada com soro de pacientes infectados com *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Candida spp.* (WHEAT et al., 1986).

Foi demonstrado que ensaios imunoenzimáticos, tais como *Western blot* (WB) e ELISA, apresentam maior sensibilidade que a imunodifusão e a reação de fixação de complemento na detecção de anticorpos (PIZZINI et al., 1999; GUIMARÃES et al., 2004).

Um importante teste para o diagnóstico da histoplasmoses, é o teste de WB utilizando o antígeno histoplasmina purificado e deglicosilado, o qual foi desenvolvido (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 1994b), avaliado (PIZZINI et al., 1999) e validado (ALMEIDA et al., 2016), apresentando elevada sensibilidade (94,9%) e especificidade (94,1%), rapidez e simplicidade de execução. Além de ser utilizado na rotina laboratorial, esse método é altamente recomendado no diagnóstico de pacientes com HIV/aids (ALMEIDA et al., 2019).

A detecção de antígenos específicos tem sido também aplicada ao diagnóstico da histoplasmose, principalmente na forma disseminada aguda (ALMEIDA-SILVA et al., 2019). Um estudo multicêntrico avaliou a sensibilidade e especificidade do ELISA para detecção de antígeno de *Histoplasma* MVista em diferentes formas clínicas. A sensibilidade encontrada no estudo foi de 91,8% quando o teste foi realizado em amostras de urina de pacientes com histoplasmose disseminada, 83,3% em pacientes com histoplasmose aguda, 30,4% em pacientes com a forma subaguda e 87,5% em pacientes com a forma pulmonar crônica (HAGE et al., 2011).

O kit *Histoplasma* UAg EIA (IMMY) pode oferecer uma abordagem alternativa para a detecção de antígeno de *H. capsulatum* na urina, no entanto serão necessários estudos adicionais para melhor caracterizar o desempenho deste teste em conjunto com achados clínicos (THEEL et al., 2013).

Já foi sugerido que valores positivos baixos, no kit *Histoplasma* UAg EIA, devem ser interpretados com cautela, uma vez que o significado clínico de resultados positivos com valores inferiores a 0,6 ng/mL foi avaliado em 25 pacientes sem evidência de infecção prévia por *H. capsulatum*, onde 12/25 pacientes foram considerados falsos positivos (THEEL; RAMANAN, 2014).

Recentemente, foi validado um ELISA de captura para detecção de antígeno circulante de *H. capsulatum* na urina de pacientes com infecção mista pelo HIV e *H. capsulatum*, e avaliada a correlação entre antigenúria e melhora clínica durante o acompanhamento terapêutico. A sensibilidade do teste foi de 86% e a especificidade global foi de 94%. Este foi ainda, considerado como uma ferramenta potencial para monitorar e avaliar a resposta de terapia antifúngica em pacientes com aids e histoplasmose disseminada, especialmente naqueles gravemente imunodeprimidos (CACERES et al., 2014).

1.2.4.4 - Diagnóstico Molecular

No intuito de suprir as limitações em relação ao diagnóstico convencional da histoplasmose, as técnicas de biologia molecular têm contribuído para o desenvolvimento de abordagens que detectam

indiretamente *H. capsulatum* em espécimes clínicos por meio da identificação de ácidos nucleicos específicos. Com isso, estas metodologias oferecem maior rapidez, alta sensibilidade e especificidade, além de facilidade na interpretação de resultados (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2011; ZANCOPÉ-OLIVEIRA; MUNIZ; PIZZINI, 2019;)

Dentro dos métodos moleculares, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é a técnica mais utilizada no diagnóstico da histoplasmose em amostras biológicas e a partir da PCR convencional, e outras técnicas, como a *nested* PCR e a PCR em tempo real (qPCR) são frequentemente empregadas com fins diagnósticos nas infecções causadas por *H. capsulatum* (BIALEK et al., 2002; BUITRAGO et al., 2006).

Um estudo multicêntrico, formado por cinco laboratórios, membros da rede MICOMOL do programa CYTED, teve por objetivo avaliar três diferentes protocolos de PCR para detecção de *H. capsulatum* (PCR convencional, nested PCR e em tempo real), no qual a sensibilidade geral destes protocolos foi de 86% e a especificidade de 100%. Todos os laboratórios foram capazes de amplificar DNA de *H. capsulatum*, e sugerem que a PCR em tempo real seja uma ferramenta promissora para detecção de forma eficiente deste patógeno em amostras clínicas (BUITRAGO et al., 2013).

Diferentemente do isolamento, a técnica de PCR em espécimes clínicos é segura, em função da rápida degradação do patógeno pela extração do material genético, o que limita a possibilidade de contaminações laboratoriais do operador (RICKERTS et al., 2002) e permite um diagnóstico precoce, antes mesmo da cultura apresentar crescimento positivo (BUITRAGO et al., 2006).

Embora com a existência dessa miríade de opções diagnósticas possa facilitar o diagnóstico em casos complexos, estudos mais recentes demonstram, por meio de revisão sistemática, que no Brasil, além do aumento no número de casos, o aumento no número de publicações aconteceu a partir da década de 80 (Figura 7A).

Observa-se também que os métodos que detectaram a maior quantidade de casos foram os métodos convencionais, como a cultura e histopatologia, tanto separadamente quanto em conjunto. Dessa maneira, a cultura e/ou histopatologia em conjunto diagnosticou 761 pacientes, seguidos

dos respectivos métodos, que diagnosticaram cada um 570 e 523 casos. (ALMEIDA et al., 2019) (Figura 7B).

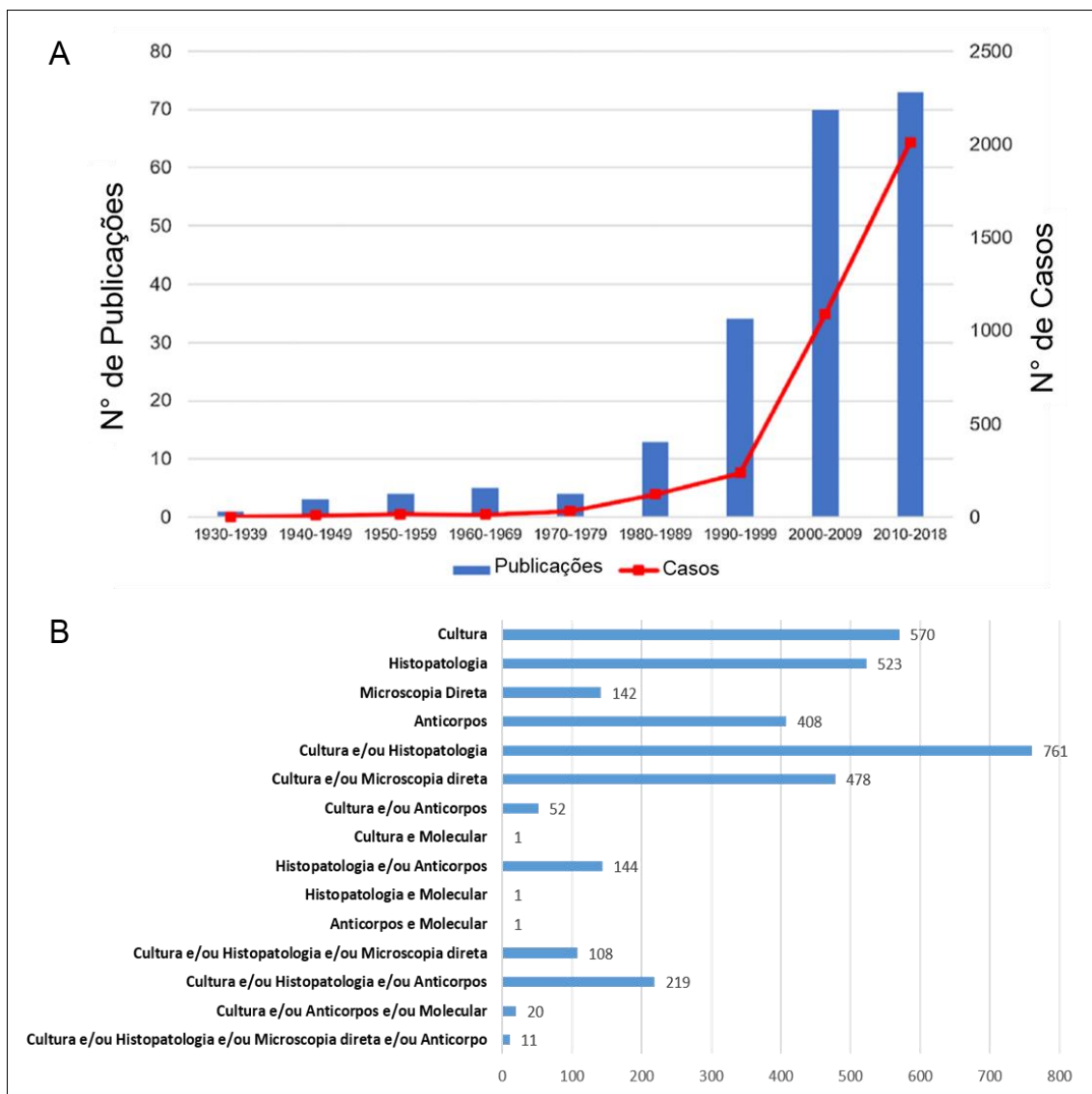


Figura 7 – Diagnóstico de histoplasmose. (A) Número de publicações e número de casos relacionados a diagnóstico de histoplasmose no Brasil, no período de 1939 a 2018. (B) Metodologias utilizadas para diagnosticar histoplasmose no Brasil no período de 1939 a 2018. (Adaptado de ALMEIDA et al., 2019).

1.2.5 Tratamento

A histoplasmose geralmente é uma infecção benigna e autolimitada, em que os casos de regressão espontânea não necessitam de tratamento específico, sendo o repouso e observação clínica as medidas mais eficazes (WHEAT; KAUFFMAN, 2003).

Na histoplasmose pulmonar aguda, quando a febre se prolonga por mais três semanas ou quando as manifestações são muito intensas, indica-se a anfotericina B, na dose de 0,7 a 1 mg/kg intravenosa (IV), recomendado para pacientes com baixo risco de nefrotoxicidade. O uso dessa forma de tratamento também é tolerado por criança (ALMEIDA-SILVA et al., 2019).

Nas formas disseminadas e pulmonar crônica, a anfotericina B é a droga de escolha, 1 mg/kg IV em dias alternados, até atingir doses totais de 30 a 40 mg/kg. Alternativamente, a anfotericina B pode ser substituída com vantagem pelas formulações lipossomais, melhor toleradas e de eficácia similar, tendo como sua única restrição o alto custo (JAWALE; GULWANI, 2017; ALMEIDA-SILVA et al., 2019).

Nos casos de contraindicação ao uso da anfotericina B, o itraconazol é uma boa alternativa, mostrando-se pouco tóxico, na dose de 200 a 400 mg/dia para adultos, em uma única tomada, por seis meses a um ano.

O itraconazol representa uma alternativa terapêutica para casos sem comprometimento do estado geral, sem evidência de disseminação sistêmica ou quando há necessidade de manutenção prolongada, nos casos da forma pulmonar crônica recomendam-se 200 a 400 mg/dia, divididos em duas tomadas, durante 12 meses, pelo menos, com acompanhamento laboratorial (WHEAT; KAUFFMAN, 2003).

Não há vacina disponível contra *H. capsulatum* (ROTH; ZAMITH-MIRANDA; NOSANCHUCK, 2019), no entanto, medidas de prevenção podem ser adotadas com a finalidade de evitar exposição a áreas potencialmente contaminadas, com isso, torna-se fundamental o uso de máscaras protetoras apropriadas para indivíduos com risco de exposição a locais suspeitos ou contaminados o fungo (DIAZ, 2018).

2.1 - HISTOPLASMA CAPSULATUM

2.1.1 - Ecologia

A demonstração do habitat natural de *H. capsulatum* foi descrita em 1949 quando o microrganismo foi encontrado no meio ambiente, na forma filamentosa, como sapróbio de solo, sendo isolado pela primeira vez próximo a um galinheiro (EMMONS, 1949). Desde então, *H. capsulatum* tem sido encontrado em locais conhecidamente habitados por aves e morcegos, cujos solos são enriquecidos com excretas destes animais (AJELLO; ZEIDBERG, 1951). A relação do fungo com estes locais se dá pelo alto teor de ácido úrico encontrado, uma vez que esse componente é utilizado como fonte de nitrogênio pelo fungo (EISSENBERG; GOLDMAN, 1991; ZANCOPÉ-OLIVEIRA; MUNIZ; PIZZINI, 2019).

Aliado a isso, estima-se que um solo com uma faixa de temperatura variando entre 22-29°C e umidade em torno de 67-87%, ofereça maior probabilidade para o crescimento e isolamento do fungo (FURCOLOW, 1958).

Cavernas, construções antigas ou abandonadas, forros, sótãos ou porões de casa, galinheiros, árvores ocas e campos cultiváveis são importantes nichos ecológicos deste fungo e consequentes fontes de infecção para homens e animais. Além disso, a própria movimentação do solo proporciona a dispersão de partículas pelo ar (LONDERO; WANKE, 1988; GUERRA et al., 2019).

Tentativas de isolamento de *H. capsulatum* diretamente de aves não tinham sido produtivas, sugerindo assim, que esses animais não fossem infectados naturalmente pelo fungo, sendo considerados apenas como carreadores do fungo, por meio dos seus pés, penas, asas e bicos. No entanto, um estudo descreveu um caso de histoplasmose e candidíase em um papagaio, mostrando que *H. capsulatum* pode se disseminar em aves, uma vez que nesse estudo o animal possuía comprometimento ósseo, além de granulomas pelo corpo e lesão no bico (QUIST et al., 2011).

Morcegos desenvolvem um importante papel na dispersão natural de *H. capsulatum*, uma vez que atuam como reservatórios do fungo, por se

infectarem, abrigarem o microrganismo em sua mucosa intestinal e o dispersarem por meio da eliminação das suas fezes (TAYLOR et al., 2005a; DIAZ, 2018).

Além do conhecido papel dos morcegos, diversas outras espécies de animais podem se infectar com *H. capsulatum*, tais como, cães, gatos, cavalos, bovinos e suínos e também entre roedores silvestres, como roedores e marsupiais (LARSH, 1975; ZANCOPÉ-OLIVEIRA; WANKE, 1986; TAYLOR et al., 1996; CANO; HAJJEH, 2001; ESPINOSA-AVILES et al., 2008; REYES-MONTES et al., 2009; CANTEROS et al., 2010; QUIST et al., 2011; DEEPE Jr; 2018; ALMEIDA et al., 2019).

Outro fator muito importante no carregamento de *H. capsulatum* para novos ambientes, é a dispersão eólica, uma vez que já foi claramente demonstrado que infecções podem ocorrer após contato com propágulos fúngicos infectantes por meio das vias aéreas (CHICK et al., 1981).

2.1.2 - Morfologia

Histoplasma capsulatum é um fungo dimórfico e em seu ambiente natural, o solo, ou quando cultivado em laboratório a temperatura ambiente, se apresenta na forma filamentosa, a qual produz colônias que podem ser divididas macroscopicamente: Tipo A (Albino), possui colônias que apresentam micélio aéreo de aparência cotonosa, branca (Figura 8A) e com pouca produção de estruturas de propagação, os macroconídios e microconídios. Já o tipo B (Brown-Marrom), possui hifas finas e a colônia tem aspecto menos cotonoso com grande número de macroconídios e microconídios. Já em parasitismo ou quando cultivado em laboratório a uma temperatura de 37°C, *H. capsulatum* também pode apresentar dois tipos de colônias: as colônias rugosas (*wild type colony*) e as colônias lisas (variante espontânea) (EISSENBERG; GOLDMAN, 1991).

No solo ou quando cultivado sob sua forma filamentosa, *H. capsulatum* apresenta algumas características microscópicas, representados como uma trama de hifas hialinas, septadas e ramificadas, além de apresentar estruturas de propagação, os conídios, estes estão presentes tanto lateralmente quanto

na porção apical das hifas (Figura 8B). Estes propágulos se apresentam como estruturas globosas, que podem possuir um tamanho variado, de 8 a 16 μ m de diâmetro, de parede lisa, que com o passar do tempo e envelhecimento da cultura, podem desenvolver numerosas projeções, semelhantes a tubérculos em toda sua superfície (Figura 8B), dessa maneira, essas estruturas passam a ser chamadas de macroconídios tuberculados (PINE, 1960). A fase filamentosa ainda apresenta estruturas menores, os microconídios, estruturas ovaladas com tamanho variando de 2 a 5 μ m de diâmetro, com paredes lisas, formados na extremidade de curtos conidióforos em ângulo reto com a hifa. Essas estruturas de propagação apresentam grande resistência aos fatores ambientais adversos e são facilmente carregadas por correntes aéreas, podendo se dispersar por grandes distâncias (CHICK et al., 1981). Os microconídios penetram de maneira mais fácil nos alvéolos pulmonares, além de se destacarem das hifas mais facilmente (LARSH, 1975).

Já na fase leveduriforme, *H. capsulatum* se caracteriza, tanto em parasitismo infectando tecidos, quanto cultivado a 37°C em meios de cultura específicos como leveduras unibrotantes, medindo aproximadamente 2 μ m. As colônias produzidas durante esta fase são semelhantes às colônias formadas por outras leveduras, com aspecto úmido, liso e cremoso, apresentando ainda uma coloração podendo variar de tons do branco-amarelado ao castanho (RIPPON, 1988) (Figura 8 C e D)

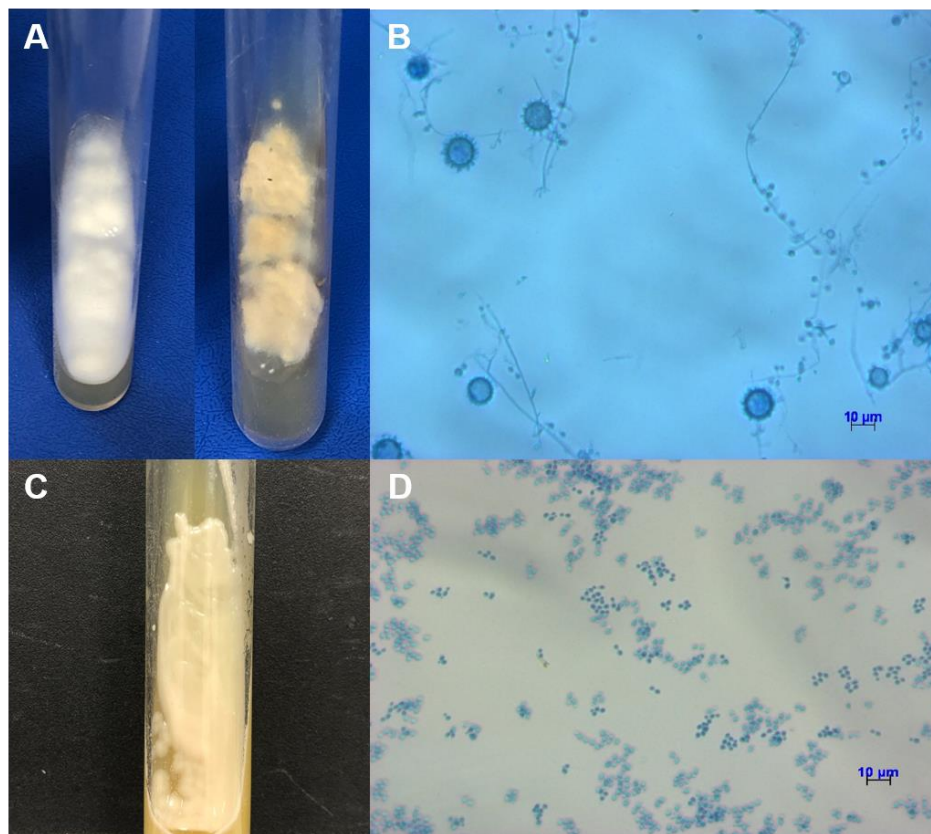


Figura 8 – Morfologia de *Histoplasma capsulatum*. (A) Aspecto macroscópico da na fase filamentososa com colônia de coloração branca e bege. (B) Micromorfologia da fase filamentososa com demonstração de hifas hialinas, septadas, micro e macroconídios tuberculados. (C) Macroscopia da fase leveduriforme com colônia de aspecto cremoso e coloração bege. (D) Microscopia da fase leveduriforme com presença de leveduras unibrotantes. Fonte: Elaborada pelo autor.

2.1.3 - Reprodução

Dentro do ciclo de vida fúngico, a mitose é realizada inúmeras vezes dando origem à uma grande quantidade de propágulos fúngicos, permitindo a preservação e propagação de características genéticas bem adaptados, permitindo uma rápida e eficiente colonização de novos ambientes com características semelhantes. Esse tipo de colonização denomina-se conidiogênese, na qual as estruturas conhecidas como esporos, têm sua origem nas extremidades dos conidióforos (GAMBALE, 2010; CHIU, 2012).

Já na reprodução sexuada, as células possuem sua origem através da meiose, capacitando essas células a realizarem pareamentos, com consequente troca de material genético. Esse processo favorece o aumento da variabilidade genética dos organismos, consequentemente de *H. capsulatum* (CHIU, 2012).

As estruturas oriundas de reprodução sexuada são chamadas de ascósporos e são formadas dentro de estruturas conhecidas como ascos, que por sua vez se encontram nos ascocarpos (GAMBALE, 2010).

Dois tipos de compatibilidade sexual podem ser encontrados na fase filamentosa de *H. capsulatum*, os quais são “*mating types*”, podendo ser do tipo (+ ou major) e (- ou minor). (KWON-CHUNG, 1972a,b; KWON-CHUNG et al., 1974; KWON-CHUNG et al., 1984).

Na década de 70, a identificação dos *mating types* era realizada por meio pareamento de isolados fúngicos e devido à rápida perda de fertilidade do fungo em laboratório, esta era uma técnica de difícil manuseio. Em isolados clínicos já foi demonstrada uma predominância do tipo de compatibilidade (-), sendo uma proporção de 7:1, ao passo que em isolados ambientais, observou-se a presença de ambos os tipos de compatibilidade, em proporção de 1:1 (KWON-CHUNG et al., 1974).

Em 2007, pesquisadores determinaram por meio da amplificação por PCR, o locus *MAT1*, com iniciadores específicos para os idiomorfos *MAT1-1* e *MAT1-2*, que respectivamente codificam os tipos de compatibilidade sexual (+) e (-) de *H. capsulatum* (BUBNICK; SMULIAN, 2007) (Figura 9).

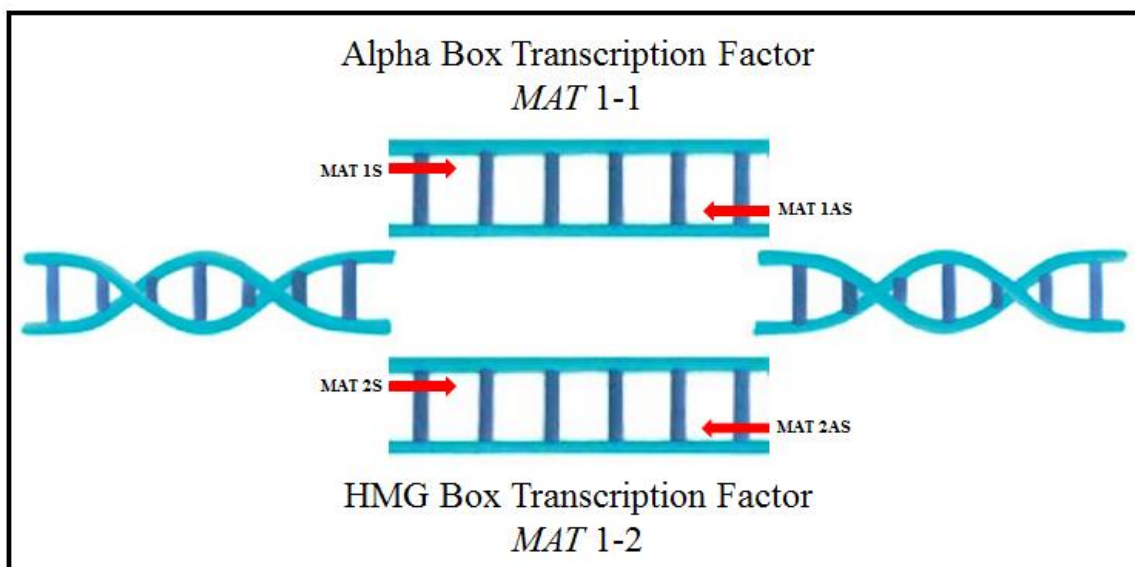


Figura 9 – Representação do locus *MAT* de *H. capsulatum* com sua região idiomórfica, onde uma mesma região do DNA pode codificar feromônio (Alpha Box) ou o receptor para este feromônio (HMG Box), resultando em cruzamento sexual na forma anamorfa do microrganismo. Fonte: Elaborada pelo autor.

Alguns estudos moleculares recentes têm demonstrado que os dois tipos de compatibilidade sexual de *H. capsulatum*, podem apresentar relação com a origem geográfica dos isolados (RODRIGUEZ-ARELLANES et al., 2013; MUNIZ et al., 2014).

No México e nos Estados Unidos, os dois tipos de compatibilidade sexual já foram encontrados, tanto em isolados ambientais quanto em isolados clínicos, ao passo que no primeiro estudo realizado no Brasil, apenas o tipo de compatibilidade sexual (-) ou *MAT1-1* foi demonstrado (RODRIGUEZ-ARELLANES et al., 2013). No entanto, estudos mais recentes demonstraram a presença dos dois tipos de compatibilidade sexual em isolados de *H. capsulatum* oriundos de amostras de origem humana com a detecção de infecções mistas por diferentes tipos de compatibilidade sexual e com heterogeneidade genotípica, verificada pelo MLST, demonstrando que mecanismos de coinfeção e superinfecção ocorrem no Ceará, provavelmente devido à contínua reexposição a diferentes micro nichos de *H. capsulatum* nesta região endêmica (DAMASCENO et al., 2019).

Outro estudo, no qual foi padronizada uma PCR multiplex para a detecção molecular dos tipos de compatibilidade sexual, também foi demonstrada a presença de *MAT1-1* e *MAT1-2* em amostras de origem humana (ALMEIDA-SILVA et al., 2018).

2.1.4 - Taxonomia e filogenia molecular

Histoplasma capsulatum foi inicialmente classificado e alocado no Filo *Deuteromycota*, Classe *Hyphomycetes*, que também são conhecidos como fungos imperfeitos, devido à ausência de conhecimento da sua fase sexuada - Teleomórfica, conhecendo apenas a fase assexuada – Anamórfica (CHANDLER, 1980).

Atualmente, após o reconhecimento da fase teleomórfica, essa classificação se encontra mais completa. Inicialmente, esse estágio foi denominado como *Gymnoascus demonbreunii*, porém houve a suspeita de que essa forma se tratava de um contaminante queratinofílico (AJELLO; CHENG, 1967).

Em 1972, foi demonstrada a verdadeira fase sexuada de *H. capsulatum*, a qual foi denominada de *Emmonsiiella capsulata*, pertencente ao Filo *Ascomycota*, classe *Plectomycetes* e família *Gymnoascaceae* (KWON-CHUNG, 1972b). McGinnis e Katz (1979) reestudando esta forma sexuada, concluíram que *E. capsulata* deveria ser transferida para o gênero *Ajellomyces*, com denominação de *Ajellomyces capsulatus*, pertencente à família *Onygenaceae* (KWON-CHUNG, 1973).

Analisando seis genes (18S rRNA, 28S rRNA, 5.8S rRNA, EF1 α (fator de alongação-1 α), RPB1 e RPB2 (subunidades da RNA polimerase II), foi sugerido que espécie *H. capsulatum* fosse classificada no Filo *Ascomycota*, dentro da classe *Eurotiomycetes*, ordem *Onygenales*, famílias *Onygenaceae* e/ou *Ajellomycetaceae* (JAMES et al., 2006; HIBBETT et al., 2007; HOOG; GUARRO, 2007).

Baseado em aspectos morfológicos e de patogenicidade, *H. capsulatum* é dividido em três variedades: *H. capsulatum* var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii* e *H. capsulatum* var. *farciminosum*. A primeira variedade (*H. capsulatum* var. *capsulatum*) é responsável pela histoplasmose clássica, de distribuição mundial. A segunda (*H. capsulatum* var. *duboisii*) é responsável pela histoplasmose africana, sendo restrita apenas à uma parte do continente africano, e a terceira (*H. capsulatum* var. *farciminosum*), ainda não foi encontrada parasitando o homem, sendo responsável apenas como patógeno de equinos, causando linfangite epizoótica (LACAZ et al., 2002).

As técnicas de biologia molecular têm sido de grande valor para a identificação e análise do comportamento e patogenicidade de *H. capsulatum*, permitindo também caracterizar a diferenciação e estudos filogenéticos desses organismos (WOODS, 2002).

O uso destas ferramentas pode fornecer importantes informações nos estudos, caracterização de linhagens e diferenciação entre isolados, além de possibilitar a identificação de fontes de infecção e inferir relação genotípica entre isolados clínicos e regiões geográficas (CARTER et al., 2001; TAYLOR et al., 2005; ZANCOPÉ-OLIVEIRA; SILVA-TAVARES; MUNIZ, 2005).

Uma grande variedade de técnicas moleculares tem sido utilizada para a caracterização genética de *H. capsulatum*. Os primeiros estudos sobre a diversidade genética de *H. capsulatum* utilizaram a análise de fragmentos de

DNA gerados por enzimas de restrição (RFLP), agrupando os isolados estudados em três classes. A classe 1 agrupou um isolado clínico de Illinois - EUA (Cepa Downs), a classe 2 agrupou isolados da Louisiana - EUA (Cepas G217 A e B; G222), já a classe 3 agrupou isolados do Panamá (Cepas G184 A e B; G186 A e B) (VINCENT et al., 1986).

Três anos mais tarde, um grupo de pesquisadores utilizou os mesmos isolados que o estudo de 1986 e a mesma técnica. No entanto, esse grupo de pesquisadores incluiu isolados fúngicos ambientais e após a análise dos resultados, encontraram uma nova classe, formada pelo único isolado ambiental (Cepa FSL1 – Flórida – EUA) e esse evidenciou assim, uma quarta classe, classe 4, oriunda do isolado ambiental (SPITZER et al., 1989).

Posteriormente, em 1992, mantendo a técnica de RFLP, porém tendo como alvo uma região do *locus* YPS3, um outro grupo de pesquisadores utilizando os mesmos isolados de Spitzer e colaboradores, com inclusão de novos isolados clínicos de *H. capsulatum* oriundos da América Latina, identificou duas novas classes, a classe 5 e a classe 6. No entanto, após a tipagem do mtDNA, a classe cinco apresentou quatro subclasses (KEATH et al 1992).

A técnica de amplificação randômica de fragmentos de DNA (RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA*), também permite diferenciar os isolados do fungo *H. capsulatum*. Esta técnica se baseia na amplificação de fragmentos de DNA utilizando iniciadores com sequências arbitrárias curtas (WOODS et al., 1993).

Um estudo comparando a técnica de RFLP e RAPD mostrou que os isolados brasileiros classificados em igual proporção entre as classes cinco e seis, quando submetidos à técnica de RAPD, apresentavam 18 regiões polimórficas distintas, e desde então tem sido sugerido que as diferenças nas apresentações clínicas podem estar associadas à diferenças genéticas, já que esse estudo mostrou que 66% dos casos brasileiros apresentava lesões de pele, ao passo que os isolados americanos apresentaram apenas 1% desse tipo de lesão (KARIMI et al., 2002).

Além disso, essa ferramenta possibilitou identificar uma estreita associação do genótipo encontrado com a origem da fonte e área geográfica dos isolados fúngicos (POONWAN et al., 1998; REYES-MONTES et al., 1999;

TAYLOR; CHÁVEZ-TAPIA; REYES-MONTES, 2000a; PERROTTA et al., 2001), assim como demonstra haver grande diferença genética entre isolados do fungo procedentes dos EUA e América Latina (MUNIZ et al., 2001; PERROTTA et al., 2001).

No Rio de Janeiro/Brasil, isolados clínicos, animais e ambientais foram avaliados por RAPD apresentando 80-100% de similaridade genética. Os perfis genéticos dos isolados de *H. capsulatum* apresentaram baixa similaridade genética (menor que 70%) com as cepas de referências usadas neste estudo oriundas dos EUA e Panamá (MUNIZ et al., 2001). Utilizando a mesma técnica, autores já demonstraram não existir um genótipo restrito para cada região do Brasil. Uma vez que isolados de diversas áreas geográficas se agruparam em um mesmo clado (ZANCOPE-OLIVEIRA; TAVARES; MUNIZ, 2005; BRILHANTE et al., 2012).

Estudos já demonstraram associação entre o polimorfismo da região ITS com a região geográfica e as fontes ambientais dos isolados de *H. capsulatum* (TAMURA et al., 2002; ESTRADA-BÁRCENAS et al., 2014; LANDABURU et al., 2014). Utilizando a mesma análise, outros autores já demonstraram que a variabilidade genética da região ITS de *H. capsulatum* var. *farciminosum* não exerce relação com uma determinada região geográfica, e sugerem que essa espécie não somente causa infecções em equinos, uma vez que já foi demonstrado uma alta similaridade genética entre isolados humanos e de outros animais não equinos de diversas regiões geográficas, com *H. capsulatum* var. *farciminosum*, com 99% de similaridade. (MURATA et al., 2007; EISENBERG et al., 2013; LANDABURU et al., 2014). Estudos também sugerem que *H. capsulatum* var. *farciminosum* seja patogênica para o homem (LANDABURU et al., 2014).

Um estudo comparando três técnicas moleculares realizado em 2010, em 51 isolados de *H. capsulatum*, oriundos de diversos estados brasileiros, demonstrou que os resultados obtidos através restrição enzimática da região ITS, e sequenciamento multilocus (MLST), além do M13-PCR *fingerprint* apresentaram 84,3% de concordância, agrupando todos os isolados em três grandes grupos genéticos. A análise realizada pela fragmentação enzimática da região ITS também demonstrou que os isolados oriundos do Rio de Janeiro eram geneticamente distintos dos outros isolados estudados, sugerindo que a

população genética do estado do Rio de Janeiro seria uma população distinta com a evidência de um grupo autóctone (MUNIZ et al., 2010).

Atualmente, a técnica molecular mais aplicada e mais bem padronizada para identificação de espécies, clados filogenéticos e diversidade genética de *H. capsulatum*, é a análise por MLST (TEIXEIRA et al., 2016). Trata-se de uma metodologia robusta para estudos filogenéticos e em *H. capsulatum*, essa técnica é voltada para a análise de quatro genes codificadores de proteínas nucleares *arf* (Fator de ribosilação do ADP), *H anti* (Antígeno H), *ole1* (Delta-9 desaturase do ácido graxo), e *TUB1*).

Todos estes genes estão altamente relacionados, tanto no seu papel funcional quanto com sua relação genética, uma vez que esses genes estão contidos em lócus que evoluíram de maneira independente no genoma de *H. capsulatum* (KASUGA et al., 2003).

Um estudo utilizando 137 isolados de *H. capsulatum*, oriundos de 25 países, sugeriu a classificação destes isolados em oito clados distintos filogeneticamente, com sete espécies geneticamente relacionadas, sendo os clados: Latino-americano A (LAmA); Latino-americano B (LAmB); Norte-americano 1 (NAm 1); Norte-americano 2 (NAm 2); Africa (Africano); Netherlands (Holandês); Australia (Australiano) e Eurasia (Euroasiático) (Figura 10), porém este último clado apresentou 98% de similaridade com o clado LAmA, pela análise de *Bootsrap*, sugerindo que o clado euroasiático tenha origem no clado Latino-americano A (KASUGA et al., 2003)..

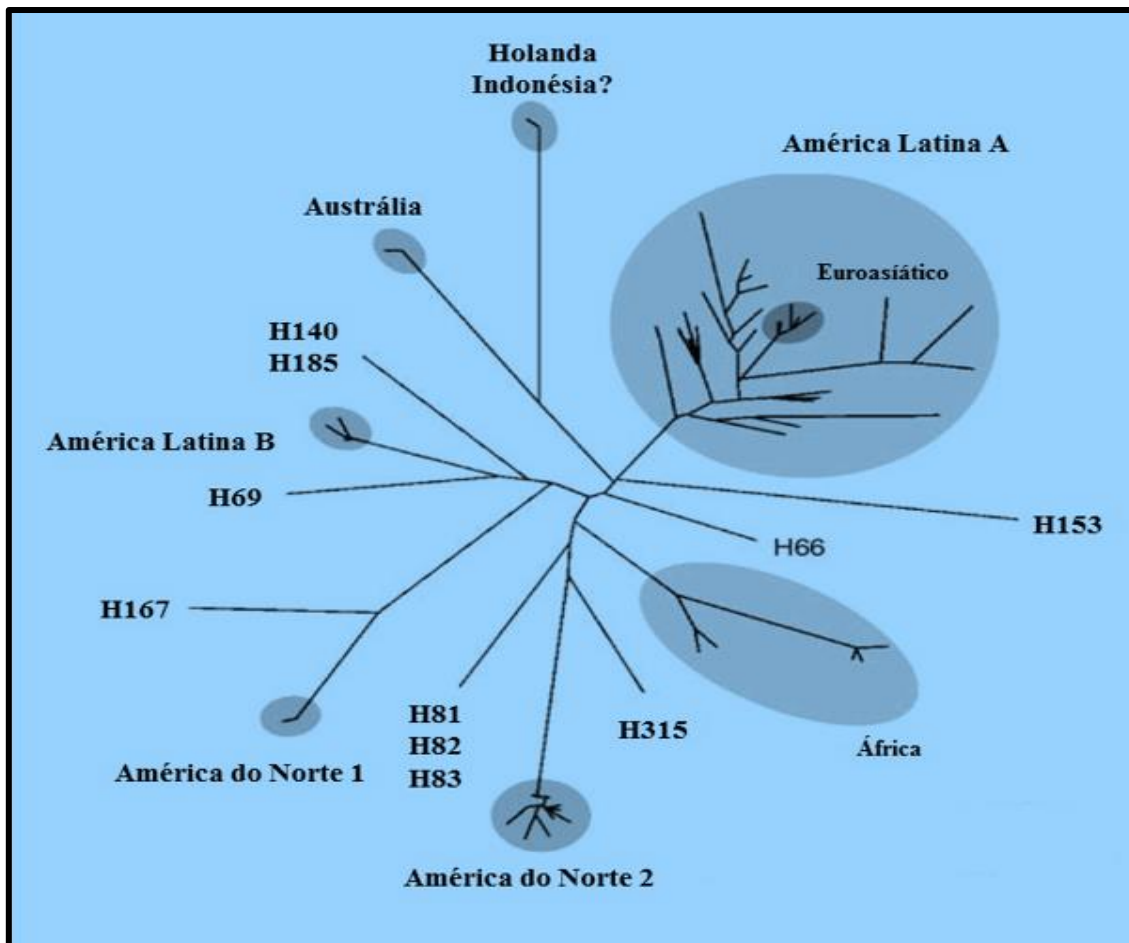


Figura 10 – Distribuição filogeográfica de 137 isolados de *H. capsulatum* nos diferentes continentes e distância genética entre as linhagens (NAM 1, NAM 2, LAm A, LAm B, Austrália, Holanda e África) do fungo. (Adaptado de KASUGA et al., 2003).

Novas análises usando a técnica de MLST em isolados fúngicos de gatos, procedente de área não endêmica dos EUA, e isolados de *H. capsulatum* oriundos de morcegos do México sugeriram a presença novos clados e linhagens filogenéticas (TAYLOR et al., 2005; ARUNMOZHI BALAJEE et al., 2013; VITE-GARIN et al., 2014).

Ainda utilizando a técnica de MLST, estudo mais recente de sequências dos 4 genes depositadas no GENBANK, revelou após análises, a existência de ao menos 17 espécies filogenéticas, NAM1, NAM2, RJ, LAmB, LAm A1, LAmA2, BR1, BR2, BR3, BR4, Netherlands, Panama, Africa, Australia, BAC1 e outros clados (Eurasia, Desconhecido 1 e Desconhecido 2), sendo a maioria das novas espécies filogenéticas identificadas agrupadas dentro da população latino-americana (LAmA). Além disso, os autores sugeriram ao final do estudo, que pesquisas com o objetivo de correlacionar ensaios de virulência, com espécies filogenéticas e manifestações clínicas da histoplasmose, seriam de

grande importância para melhor compreensão de perguntas que ainda permanecem sem respostas, como, a possível relação de um genótipo mais virulento, associado às formas mais severas da histoplasmose (TEIXEIRA et al., 2016).

O estudo mais recente envolvendo taxonomia de *H. capsulatum*, baseado em WGS (Whole Genome Shotgun), revelou a existência de cinco espécies crípticas. As espécies filogenéticas, anteriormente conhecidas como: Nam 1, Nam 2, LAmA, Panamá e duboisii, foram renomeadas, como: *Histoplasma mississippiense*, *H. ohiense*, *H. suramericanum*, *H. capsulatum* sensu stricto e Africa, respectivamente. O estudo ainda abordou a hipótese de que a especiação dentro do gênero *Histoplasma* pode contribuir para o surgimento de espécies com diferentes perfis de virulência, resistência às drogas e mecanismos de escape do sistema imunológico (SEPULVEDA et al., 2017).

Um importante dado é que inicialmente pensava-se que as espécies filogenéticas fossem restritas geograficamente. No entanto, é possível que isolados pertencentes à uma determinada espécie filogenética, sejam de alguma maneira, introduzidos em regiões cujas espécies filogenéticas sejam diferentes daquelas introduzidas. Esta inserção tem potencial para gerar um processo denominado como fluxo gênico, que é uma migração de genes entre populações.

Um microrganismo pode migrar de uma população para outra, e esse indivíduo carregar consigo os genes característicos da sua população ancestral, e possivelmente os insere na população recipiente, o que pode gerar ou não sucesso no estabelecimento. Em caso de um estabelecimento bem-sucedido e realização de cruzamentos, o microrganismo irá transmitir esses genes entre as duas populações. Em caso dos genes migrados conferirem alguma vantagem seletiva aos microrganismos receptores, a seleção natural atuará a favor de elevar as frequências dos genes inseridos (Figura 11).

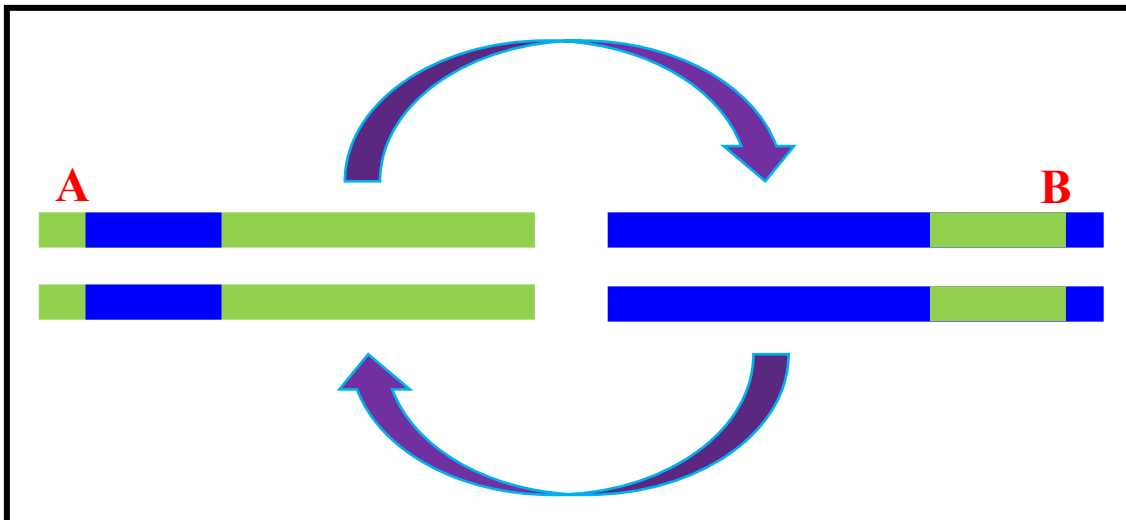


Figura 11: Representação do processo de fluxo gênico. Um microrganismo pode transferir genes de uma população ancestral para uma população recipiente. População A composta majoritariamente por características representadas pela cor verde, pode receber características de outra população (representada pela menor proporção em azul), sendo de igual maneira possível para a população B, majoritariamente composta por características representadas em azul, no entanto recebendo características em menor proporção (representada pela cor verde), podendo ser um processo cíclico (setas roxas).

Recentemente, um estudo mostrou a inserção de *H. capsulatum* var. *duboisii* no Texas. Babuínos que originalmente nasceram no continente americano e foram criados em uma plataforma animal, foram infectados por *H. capsulatum*. Após o diagnóstico, regiões parciais dos genes, *arf*, *tub* e a região ITS2 foram sequenciadas, e conseqüentemente essas amostras foram concatenadas. Após uma análise filogenética, foi evidenciado que as amostras dos nove babuínos estudados, se agrupou com um isolado classificado do continente africano (H147) e a contaminação desses babuínos foi associada com babuínos oriundos de Senegal que foram importados aos EUA para viverem na plataforma. Com isso, a principal hipótese é que os babuínos oriundos do continente africano tenham carregado o fungo até o continente americano, fazendo com que um genótipo distinto fosse introduzido nos EUA e que essa plataforma fosse considerada área endêmica de *H. capsulatum* var. *duboisii* dentro do território americano (HENSEL et al., 2018).

Outro fator importante que pode acarretar um fluxo gênico em *H. capsulatum*, são as rotas migratórias dos morcegos, como por exemplo, os da espécie *Tadarida brasiliensis* (GONZÁLEZ-GONZÁLEZ et al., 2012). Esses morcegos possuem um importante papel, como reservatórios de *H. capsulatum*. De maneira geral, todas as espécies de morcegos possuem a

capacidade de dispersar o fungo, uma vez que morcegos podem ser infectados independentemente de seus hábitos alimentares e migratórios, possivelmente sendo infectados por via inalatória. No entanto, as espécies de morcegos com capacidade de percorrerem extensas rotas migratórias, são provavelmente as melhores candidatas para dispersar *H. capsulatum* no meio ambiente em ampla área geográfica.

Estudos sugerem que algumas espécies de morcegos podem se infectar de maneira natural, ou por ingestão, e esse contato pode resultar em uma infecção controlada. No entanto, morcegos possuem um trânsito do trato intestinal extremamente curto com aproximadamente 15 minutos, dessa maneira, poderia facilmente eliminar qualquer fungo pelo trato intestinal, sem que esse perdesse a sua viabilidade (HOFF; BIGLER, 1981).

2.1.5 - Fatores de virulência

Diversos fatores de virulência, que podem ser responsáveis pela sobrevivência de microrganismos em parasitismo, têm sido descritos na literatura especializada, sendo alguns bem determinados, como parede celular e estruturas complementares responsáveis pela adesão ao tecido do hospedeiro, produção de fosfolipases, proteases e elastases, capazes de causar dano tecidual e escapar das defesas do hospedeiro; 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 efetoras e os mecanismos de agressão celular a patógenos menos eficientes (BRUMMER; STEVENS, 1984; GARFOOT; RAPPLEYE, 2016). Além disso, a capacidade de fazer *switch* a várias vias metabólicas fundamentais para a sobrevivência intracelular e a termotolerância (capacidade de crescer a 37 °C) são pré-requisitos para a disseminação hematogênica.

Fungos dimórficos, dentre eles *H. capsulatum*, fazem morfogênese conforme o ambiente em que se encontram (IGNATOV; KEATH, 2002). A capacidade de fazer dimorfismo é um aspecto importante na patogênese, pois a forma filamentosa é infecciosa, mas é a forma leveduriforme que sobrevive intracelularmente causando doença (NEMECEK; WUTHRICH; KLEIN, 2006).

A mudança fenotípica de micélio para levedura resulta em uma mudança tanto na morfologia celular, quanto na composição da parede celular, na presença de estruturas antigênicas e na expressão de fatores de virulência (KLEIN; TEBBETS, 2007; SHEN; RAPPLEYE, 2017).

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 adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) podem influenciar na morfogênese de *H. capsulatum* (MARESCA; KOBAYASHI, 2000).

Já foi demonstrado também que a enzima híbrida histidina quinase 1 (DRK- *Dimorphism regulating kinase*) funciona como um regulador global de dimorfismo e virulência em *H. capsulatum* e outros fungos dimórficos.

Experimentos de disrupção gênica, com a inativação do gene *DRK1*, causaram um bloqueio na transição dimórfica regulada por temperatura de micélio para levedura, impedindo a expressão de vários genes relacionados à virulência específica de levedura. Esta enzima também regula a integridade da parede celular, a esporulação e a expressão de alguns genes associados à virulência dos fungos (NEMECEK; WUTHRICH; KLEIN, 2006).

Em outro estudo, o gene *RYP1* foi identificado como essencial para a transição micélio-levedura. A análise de microarranjo demonstrou que *RYP1* atua como regulador transcricional de diversos genes expressos na fase L, incluindo genes ligados à virulência (NGUYEN; SIL, 2008).

Componentes extracelulares e de superfície também atuam na fase leveduriforme de *Histoplasma*, funcionando potencialmente na virulência deste fungo. À medida que α -(1,3)-glucanas são expressas como a camada mais externa da parede celular, elas bloqueiam o reconhecimento inato das β -1,3-glucanas pelo receptor dectina-1 em fagócitos hospedeiros (RAPPLEYE; EISSENBERG; GOLDMAN, 2007).

Quando está ligada à superfície da célula, a proteína de choque térmico (HSP - *Heat shock protein*) de 60 kDa promove suporte para a ligação entre a levedura e o macrófago hospedeiro. Foi verificado que a proteína YPS3 promove disseminação da levedura no sítio de infecção pulmonar por algumas cepas de *Histoplasma*, (HOLBROOK; RAPPLEYE, 2008).

A parede celular de *H. capsulatum* é formada principalmente por quitina, α -1,3-glucana e β -1,3-glucana. A quantidade de quitina é superior

neste fungo, quando comparado a outros fungos dimórficos. Estudos demonstraram que existem diferenças na composição de glucanas nas duas fases: α -1,3-glucana, o principal componente da fase leveduriforme é um polissacarídeo de parede celular comum para a maioria dos fungos de importância médica, enquanto que na fase filamentosa é β -1,3-glucana (HEARN, 1997). A presença de altos níveis de α -1,3-glucana está associada com a virulência do isolado (HOGAN; KLEIN, 1994).

Entretanto, sugere-se a possibilidade de um mesmo isolado passar do fenótipo α -1,3-glucana (+) para α -1,3-glucana (-), o que explicaria a existência das formas crônica e latente da histoplasmose (HEARN; 1997). Demonstrando o quão complexa é a parede celular de *H. capsulatum* (GUIMARÃES; CERQUEIRA; NOSANCHUK, 2011) (Figura 12).

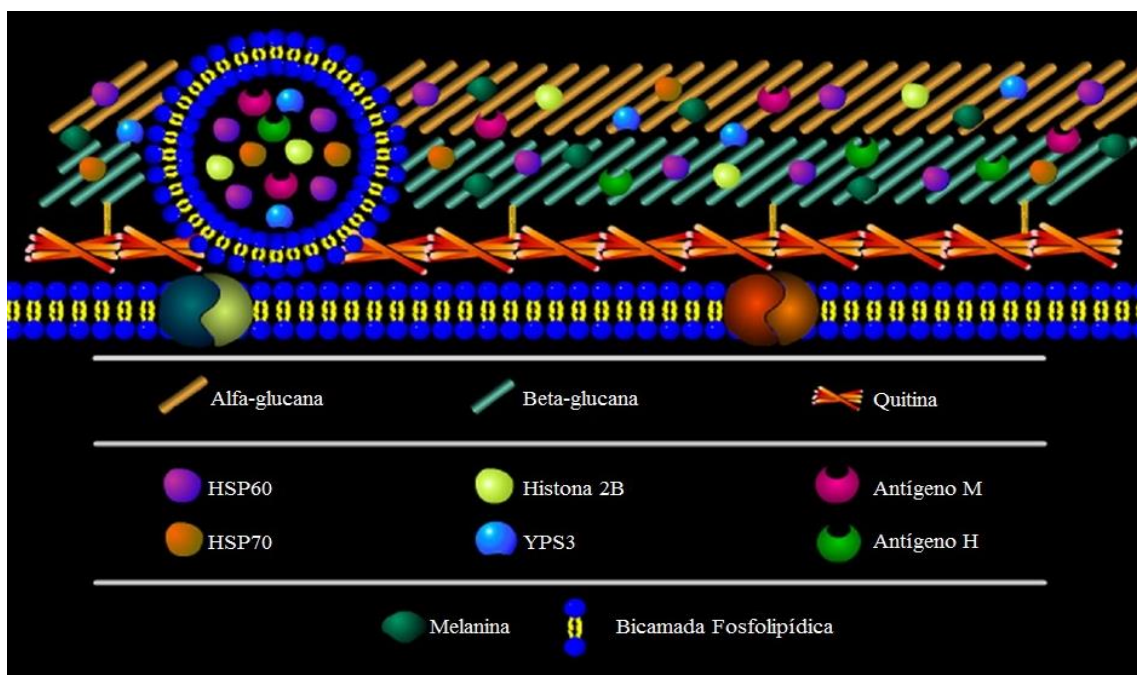


Figura 12 – Representação esquemática dos constituintes da parede celular de *H. capsulatum*. HSP70- *Heat Shock Protein* (Proteína de choque térmico) de 70kDa; HSP60- *Heat Shock Protein* de 60kDa; YPS3- *Yeast Phase Specific Protein* (Proteína específica da fase leveduriforme). (Adaptado de GUIMARÃES et al., 2011).

Alguns fatores de virulência já foram caracterizados em *H. capsulatum*, como componentes ou não da parede celular, podendo ser divididos em: carboidratos, lipídios, vesículas extracelulares, proteínas e melaninas.

Quando comparado com outros fungos dimórficos, percebe-se que *H. capsulatum* possui quantidade superior de quitina em sua parede celular.

Ressaltando que existem importantes diferenças na composição de glucanas nas duas fases, onde α -1,3-glucana é o componente principal na fase leveduriforme e β -1,3-glucana na fase filamentosa (HEARN, 1997). A classificação de uma cepa dentre dois quimiotipos também pode ser realizada através da composição da parede celular de *H. capsulatum* (DAVIS et al., 1977).

2.1.5.1 - Carboidratos da parede celular

Os carboidratos são os principais componentes da parede celular, composta por polímeros de glucanas e resíduos de β -1,4-N-acetil-glucosamina (GlcNAc) (KANETSUNA et al., 1974). As fibrilas de quitina desenvolvem o importante papel de manter a parede celular íntegra e rígida, atribuem resistência ao ambiente externo e são consideradas como o esqueleto da parede celular (RUIZ-HERRERA; OSORIO, 1974)

Em torno da quitina, existe uma camada constituída por polímeros de glicose, conectados por ligações do tipo β -1,3. Este polímero é o principal componente da parede celular de *H. capsulatum* na fase filamentosa, como também de leveduras de *H. capsulatum* do quimiotipo 1, nas quais, a camada de glucana é totalmente β conectada (DAVIS et al., 1977). Algumas das funções atribuídas à β -1,3 glucana consistem em promover o recrutamento de células inflamatórias ao sítio da infecção e indução da produção de citocinas pró-inflamatórias (FIGUEIREDO et al., 1993; MEDEIROS et al., 1999, 2004; ANJOS et al., 2002).

A modificação da biossíntese de glucanas é realizada através da transição morfológica da fase filamentosa para a fase leveduriforme, através da produção de α -1,3-glucana, a qual atribuiu-se apenas à fase leveduriforme. (KANETSUNA et al., 1974; KLIMPEL; GOLDMAN, 1988). α -1,3-glucana é constantemente encontrada em inúmeros fungos de importância médica, incluindo as demais espécies patogênicas dimórficas. No entanto, a parede celular das cepas de *H. capsulatum* pertencentes ao quimiotipo 1 têm ausência do polímero α -1,3-glucana; contudo, essas cepas possuem mais quitina e

menos glucana que o quimitipo 2 (DOMER; HAMILTON; HARKIN, 1967; DOMER et al., 1971).

Em algumas cepas *H. capsulatum* pode ocorrer espontaneamente a produção de variantes com a perda de α -1,3-glucana, o que resulta na diminuição da virulência (KUGLER et al., 2000; RAPPLEYE et al., 2007) (Figura 13).

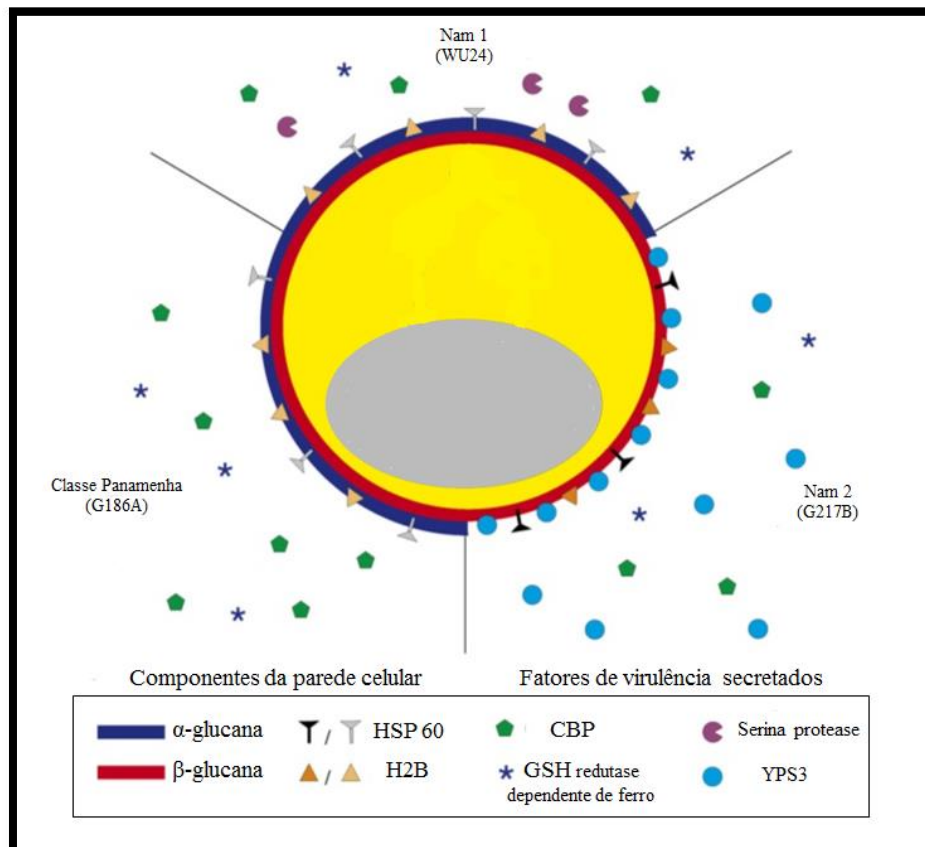


Figura 13 – Constituintes da parede celular dos diferentes quimitipos de *H. capsulatum*, distribuídos nas classes filogenéticas (Classe Panamenha, Norte americana 1 e Norte americana 2) (Adaptado de HOLBROOK; RAPPLEYE, 2008).

Esse fenômeno pode ser também induzido por sucessivas passagens em laboratório da fase leveduriforme de *H. capsulatum* (KLIMPEL; GOLDMAN, 1988; HOGAN; KLEIN, 1994). Rappleye e colaboradores (2004), após desenvolverem um sistema para interferência de RNA (RNAi) em *H. capsulatum*, realizaram a inibição da síntese de α -1,3-glucana pelo silenciamento do gene *AGS1* e demonstraram que *H. capsulatum* requer α -1,3-glucana como fator de virulência.

A redução da atividade de *AGS1* por RNAi ou substituição alélica tradicional diminuiu substancialmente a colonização pulmonar por *H. capsulatum* e a capacidade de proliferar e destruir macrófagos em cultura. Desse modo, a α -1,3-glucana parece ser um determinante de virulência designado especificamente para sobrevivência e replicação no pulmão, pois a perda de α -1,3-glucana não altera o crescimento de *H. capsulatum in vitro*.

Em outros fungos dimórficos, a perda espontânea de α -1,3-glucana também está correlacionada com a diminuição da virulência, sugerindo que este pode ser um mecanismo conservado de patogenicidade (SAN-BLAS; MORENO, 1977; KLIMPEL; GOLDMAN, 1988; HOGAN; KLEIN, 1994). A presença deste polímero permite a sobrevivência e replicação fúngica, o que irá interferir diretamente na capacidade de colonização de órgãos e estabelecimento de uma infecção bem-sucedida, além de resultar num estado de latência intracelular (MARION et al., 2006).

Histoplasma capsulatum possui um complexo de proteínas-galactomananas que desenvolvem atividades antigênicas, podendo dessa forma induzir hipersensibilidade do tipo tardia em cobaias com inibição da migração de macrófagos. (AZUMA et al., 1974; REISS et al., 1974). Em *Paracoccidioides brasiliensis*, os complexos de galactomanana aparecem envolvidos na proteção do organismo contra a serina-tiol protease, uma enzima associada com a disseminação do patógeno através da matriz extracelular (MATSUO et al., 2006).

Histoplasma capsulatum possui diversos outros carboidratos que contribuem para a composição de sua parede celular, como por exemplo, mananas e proteínas manosiladas, as quais também já foram caracterizadas como sendo importantes em *Candida albicans* (LIPKE; OVALLE, 1988; PIETRELLA et al., 2008).

Essas manoproteínas possuem alto grau de antigenicidade podendo levar a maturação e ativação de células dendríticas, seguida pela produção de citocinas pró-inflamatórias, resultando no acionamento de uma resposta pelas células T – protetoras (PIETRELLA et al., 2006). Adicionalmente, mananas possuem implicação na aderência do tecido do hospedeiro (ROSS, 2002).

2.1.5.2 - Lipídios da parede celular

Já foi observado que os lipídios são importantes moléculas bioativas em fungos, além de que na membrana celular possuem o papel crítico de componentes estruturais. A literatura elucida que diversos lipídios estruturalmente e funcionalmente distintos já foram caracterizados em fungos. Baseados em simples extrações com solventes orgânicos e determinação do total de lipídios contidos na parede celular de *H. capsulatum*, alguns estudos mostraram que essas moléculas representam de 3-10% do peso seco da parede celular, (MACWILLIAM, 1970; COX; BEST, 1972). Estudos mais recentes demonstram que embora exista sugestão de que os lipídeos possuam um papel importante na patogênese, esse mecanismo ainda não foi elucidado (ZARNOWSKI et al., 2018).

2.1.5.3 - Proteínas da parede celular

A natureza dinâmica da parede celular de *H. capsulatum*, inclui a mudança na composição de diversas proteínas que participam da detecção do ambiente, modificando a interação entre o patógeno e hospedeiro, além de defender o fungo contra o estresse oxidativo.

Proteínas de choque térmico (HSP's) estão entre as mais conservadas evolutivamente (LINDQUIST, 1986). HSP's são essencialmente importantes para manter as funções celulares, desenvolvendo papéis cruciais para a viabilidade das proteínas (SAIBIL, 2008).

Como um componente chave da resposta ao choque térmico, a expressão de HSP's é ativada quando a célula é exposta às condições adversas, como altas temperaturas, estresse oxidativo, inflamação, exposição à toxinas, hipoxia, deficiência de nitrogênio e privação de água (WU, 1995).

A proteína de choque térmico de 60kDa (HSP60) foi identificada na superfície de *H. capsulatum*, tanto dentro da célula, quanto dentro de vesículas extracelulares (VE). A HSP60 pode ser visualizada de maneira aglomerada na parede celular por meio da microscopia eletrônica (LONG et al., 2003). Essas proteínas aparecem como sendo as maiores mediadoras da ligação de *H.*

capsulatum a macrófago/monócito, por meio da integrina CR3 (CD11B/CD18) (LONG et al., 2003). Um estudo analisando HSP60 de diferentes microrganismos e mamíferos mostrou que todas as proteínas se ligam ao receptor CR3, utilizando diferentes sítios de ligação, todas suscitando resposta inflamatória em macrófagos de camundongo (HABICH et al., 2003). A expressão de diferentes níveis de HSP60 é dependente de cepa e temperatura, com o pico de expressão entre 34 e 37°C (SHEARER et al., 1987).

Os mecanismos pelos quais as proteínas de choque térmico respondem a estresse ambiental, ainda não foram bem esclarecidos. No entanto, algumas evidências sugerem que proteínas danificadas ou anormais podem ativar HSP's (SANTORO, 2000), ou esta proteína pode orquestrar uma resposta geral ao estresse (GUIMARÃES; NAKAYASU; SOBREIRA et al., 2011).

A HSP60 é imunogênica, e dessa forma vem sendo descrita como um potencial alvo para imunização passiva. Estudos demonstraram que anticorpos monoclonais contra a HSP60, administrados em camundongos, podem levar à uma proteção significativa contra *H. capsulatum*, resultando em um prolongamento da sobrevivência dos animais (GUIMARÃES et al., 2009).

A proteína de choque térmico de 70kDa (HSP70) é uma chaperona putativa, secretada por *H. capsulatum* para o meio extracelular, provavelmente dentro de VE's (ALBUQUERQUE et al., 2008), porém também encontrada na superfície celular do fungo (GOMEZ; GOMEZ; DEEPE, 1992, 1997; LOPES et al., 2010).

A HSP70 é altamente expressa pelo fungo quando submetidos à transição da fase filamentosa para a fase leveduriforme (KAMEI et al., 1992). Essa proteína também é cepa e temperatura dependente, tendo o pico de expressão a 37°C (SHEARER et al., 1987).

O antígeno M é o principal antígeno empregado no diagnóstico da histoplasmose, provocando intensa resposta imunológica celular e humoral (HAMILTON et al., 1990; DEEPE, 1994; DEEPE; DUROSE, 1995; HAMILTON, 1998, ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 1999, GUIMARÃES et al., 2006).

Anticorpos contra o antígeno M aparecem logo após a infecção, e esses anticorpos podem indicar uma prévia exposição, doença aguda ou doença crônica progressiva. Uma reação de precipitação detectando o antígeno M, pode persistir até três anos após a completa resolução e pessoas que nunca

tiveram contato com *H. capsulatum* podem se tornar reativas após o teste de reação intradérmica com histoplasmina (KLITE, 1965; KAUFMAN, 1992).

Por ser uma catalase, o antígeno M possui a capacidade de degradar moléculas de peróxido de hidrogênio em moléculas de água e oxigênio, onde dentro de fagossomos, as células fúngicas são constantemente expostas à condições de estresse oxidativo. Estudos já demonstraram que *H. capsulatum* pode permanecer com seu crescimento e morfologia não afetados, mesmo quando exposto às condições de estresse oxidativo, vinte vezes maiores que as condições fisiológicas, sendo assim foi sugerido que possa haver dois mecanismos: catalases podem ser encontradas na parede celular, fornecendo proteção local e/ou podendo ser secretada para o meio extracelular para detoxificar o ambiente de crescimento. Com isso foi comprovada a importância da catalase na resposta ao estresse oxidativo e com seus consequentes danos (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 1999; GUIMARÃES et al., 2008).

As catalases são enzimas que decompõem compostos como peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, são encontradas em todos os organismos aeróbicos e estão envolvidas na defesa contra o *stress* oxidativo, associadas à patogenicidade e virulência de certos fungos patogênicos ao homem. Com isso, estas enzimas poderiam atuar como fator de virulência para diversos microrganismos contra mecanismos oxidativos de seus hospedeiros. O envolvimento de mecanismos oxidativos na patogênese das micoses 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 (BRUMER; STEVENS, 1984; McEWEN et al., 1984; LEVITZ; DIAMOND, 1985; MORRISON et al., 1988; BRUMER; STEVENS, 1995; MELOI-BRUNERI et al., 1996).

A classe de proteínas que exibe atividade de catalase e mais extensivamente caracterizada, é composta por enzimas contendo grupamento heme, monofuncionais, sendo compostas por subunidades maiores, com peso molecular acima de 75kDa ou menores (CHELIKANI; FITA; LOWEN, 2004).

A maioria das catalases típicas apresenta um “core” conservado que compreende aproximadamente 390 aminoácidos, com quatro domínios estruturais (*N*-terminal, domínio em forma de barril, domínio de ligação e domínio helicoidal), sendo que o maior grau de homologia encontrado entre as

enzimas pertencentes a esta classe, é visto na região ao redor da histidina distal e da tirosina proximal ligantes do grupo prostético heme (ZÁMOCK; KOLLER, 1999).

Estudos evidenciaram indiretamente que catalases de *H. capsulatum* se localizavam em extratos livres de células (*cell-free extracts*) ou em células impermeabilizadas com acetona, sugerindo que essas fossem proteínas secretadas (HOWARD, 1983). Posteriormente, três diferentes catalases foram descritas em *H. capsulatum* e cada gene codificador destas catalases está presente em uma única cópia.

A catalase P (CAT P) é uma pequena subunidade monofuncional de catalase peroximal, é constitutivamente expressa durante o crescimento e tem sido sugerido que CAT P pode facilitar a detoxificação ao peróxido de hidrogênio durante o metabolismo (JOHNSON et al., 2002) e tem alta similaridade com a catalase P de *P. brasiliensis*.

A catalase A (CAT A) usualmente apresenta estrutura quaternária quando em solução, está presente na fase filamentosa e /ou quando exposta a H₂O₂ (JOHNSON et al., 2002).

A catalase B (CAT B) é também conhecida como antígeno M (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 1999). Através da demonstração de um modelo estrutural hipotético do antígeno M como um tetrâmero composto por quatro domínios estruturais, além da localização do sitio de assinatura, onde os ligantes do heme H107, N180, Y394 foram encontrados, pode-se afirmar que o antígeno M é uma catalase (CATB) que além de secretada (exoantígeno), também se localiza na superfície celular em ambas as fases do ciclo evolutivo sendo responsável pela evasão ao stress oxidativo, e permite a conversão do fungo da fase miceliana para a leveduriforme (GUIMARÃES et al., 2008).

A forte reatividade evidenciada na parede celular das leveduras de *H. capsulatum* quando empregado monoclonais (mAbs) direcionados contra a proteína M, comprovou a presença desta proteína na superfície das leveduras (GUIMARÃES et al., 2008).

O antígeno H foi descrito como um dos componentes secretados na histoplasmina, sendo obtido do sobrenadante da cultura da fase filamentosa de *H. capsulatum* (EHRHARD; PINE, 1972; ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 1994; GUIMARÃES et al., 2006). Este antígeno reage com soros de pacientes com

histoplasmose e anticorpos contra o antígeno H podem ser detectados de 1-2 anos após a resolução da doença aguda e anticorpos contra ao antígeno H usualmente desaparecem mais rápido que os anticorpos contra o antígeno M (DAVIES, 1986).

O antígeno H foi identificado como uma β -glucosidase, tendo como função conhecida, a aquisição de nutrientes, mais especificamente na aquisição de glucose por meio do metabolismo da celulose. Além dessa atividade, por ser uma β -glucosidase, o antígeno H também possui função de remodelamento da parede celular (FISHER; DEEPE Jr; WOODS, 1999).

Histonas são proteínas que geralmente estão associadas ao DNA, tanto estruturalmente quanto funcionalmente, possuem alta conservação. Apesar de estarem classicamente localizadas no núcleo das células, histonas de superfície celular foram descritas tanto em organismos eucariotos quanto em organismos procariotos. Em *H. capsulatum*, já foi descrita uma proteína antigênica, semelhante à histona 2B, de 17kDa, expressa na superfície do fungo, e especulou-se que essa proteína é importante na sinalização célula-célula e modulação da resposta imunológica pelo fungo (NOSANCHUK et al., 2003).

Estudos demonstraram que a imunização passiva com histona 2B (H2B) reduziu a carga fúngica, diminuiu o processo inflamatório e aumentou a sobrevivência em camundongos. Porém, apesar de ser reconhecida pelo sistema imune durante a infecção, a quantidade de anticorpos detectados contra este antígeno em soros prova que H2B não consiste de um antígeno imunodominante (NOSANCHUK et al., 2003; NOSANCHUK et al., 2008).

H. capsulatum possui em sua parede celular a proteína YPS3, secretando-a no meio de cultura durante o seu crescimento. A expressão desta proteína ocorre apenas na fase leveduriforme ou em tecidos infectados (BOHSE; WOODS, 2005).

O *locus* do gene codificador da proteína YPS3 é encontrado em todas as cepas de *H. capsulatum*, porém a expressão da proteína parece ser limitada à classe 2 do clado Norte Americano (Nam 2) (BOHSE; WOODS, 2007a). Acredita-se que a expressão de YPS3 esteja associada ao aumento da virulência, em cepas que são consideradas as mais virulentas entre os isolados de *H. capsulatum* (BOHSE; WOODS, 2005). Curiosamente, leveduras com

esse transcrito silenciado, não tiveram diferenças fenotípicas detectadas *in vitro* e essas leveduras silenciadas exibiram crescimento normal a 37°C e virulência similar quando comparadas com cepas selvagens em co-cultivos utilizando a linhagem celular de macrófagos murinos RAW 264.7. No entanto, no modelo *in vivo* de infecção murina, leveduras silenciadas causaram significativamente menos doença que cepas selvagens, reduzindo a carga fúngica em tecidos ricos em fagócitos, como baço e fígado. Com isso, YPS3 é claramente associado à virulência (BOHSE; WOODS, 2007b).

A proteína ligante de cálcio (CBP – *Calcium Binding Protein*), é uma proteína secretada pelas células fúngicas durante a fase leveduriforme no crescimento intracelular (BATANGHARI et al., 1998). Sua importância na virulência do fungo já foi demonstrada tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

A realização de experimentos de disrupção gênica com a deleção do locus *CBP1* demonstrou que a proteína CBP favoreceu a sobrevivência do fungo no interior de células fagocíticas. Também foi demonstrado que o crescimento de *H. capsulatum* é afetado em condições limitadas de cálcio (SEBGHATI; ENGLE; GOLDMAN, 2000).

2.1.5.4 - Vesículas extracelulares (VE)

Macromoléculas necessitam da transferência do espaço intracelular para o espaço extracelular através da rígida, complexa e densa parede celular. Vesículas extracelulares compostas por uma bicamada lipídica foram descritas na parede celular de *H. capsulatum*, as quais aparecem como solução para a secreção de proteínas através desta estrutura (ALBUQUERQUE et al., 2008).

Essas VE's fúngicas podem carrear proteínas ativas, carboidratos, lipídeos, pigmentos (BROWN et al., 2015) bem como ácidos nucléicos (ALVES et al., 2019). Muitos dos quais são constituintes da parede celular e podem estar associadas à patogênese dos fungos. Estes componentes, encontrados nas vesículas de *H. capsulatum* são determinantes patogênicos e/ou envolvidos na interação parasita-hospedeiro e hipoteticamente, as vesículas extracelulares podem funcionar como “bolsas de virulência”, uma vez que fatores de virulência estão concentrados internamente no fungo.

Essas VE's podem liberar eficientemente altas concentrações de fatores de virulência dentro do hospedeiro durante a infecção, podendo mediar diretamente danos à célula do hospedeiro ou modular a interação patógeno-hospedeiro (RODRIGUES et al., 2008; CASADEVALL et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010).

2.1.5.5 - Melanina

Diversos fungos patogênicos produzem melanina na parede celular (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2006). *H. capsulatum* também é capaz de sintetizar melanina, tanto em conídios quanto em leveduras (NOSANCHUK et al., 2002). Melaninas são pigmentos hidrofóbicos, negativamente carregados, de alto peso molecular, formados pela polimerização oxidativa de compostos exógenos fenólicos e/ou indólicos. Conídios de *H. capsulatum* podem sintetizar melanina na ausência de substratos fenólicos exógenos e com isso, sugere-se que provavelmente conídios podem melanizar no meio ambiente (NOSANCHUK et al., 2002).

A melanização pode proteger os conídios de agressões ambientais, como danos causados pela radiação UV, temperaturas extremas e agentes químicos (metais pesados e agentes oxidantes) (NOSANCHUK et al., 2002). A melanização também confere proteção contra mecanismos de defesa do hospedeiro e drogas antifúngicas (VANDUIN; CASADEVALL; NOSANCHUK, 2002; GOMEZ; NOSANCHUK, 2003). Com isso, a melanina depositada na parede celular de *H. capsulatum* confere ao fungo proteção contra uma miríade de agressões e possibilita o aumento de sua resistência estrutural. Adicionalmente a melanização desempenha um importante papel na virulência e na patogenicidade fúngica.

Quando *H. capsulatum*, é cultivado em meio quimicamente definido, na presença de 3,4- dihidroxifenilalanina (DOPA) ou (-) epinefrina, este patógeno pode produzir células melanizadas, conídios e leveduras escuras. A melanina pode ser reconhecida em ensaios utilizando anticorpos monoclonais e soros policlonais, indicando que a melanina pode ter um papel muito importante na patogenia da histoplasmosse.

Acredita-se que durante a infecção, a melanização de leveduras desempenha um papel importante na virulência e patogenicidade, uma vez que reduz a susceptibilidade de fungos, em geral, aos mecanismos de defesa do hospedeiro e drogas antifúngicas (NOSANCHUK et al., 2002; TABORDA et al., 2008; ALMEIDA-PAES et al., 2016).

2.1.5.6 - Sideróforo de hidroxamatos

A habilidade para obtenção de ferro do hospedeiro é importante para a virulência de muitos patógenos. A aquisição de ferro na patogênese de *H. capsulatum* foi investigada e foi verificado que este fungo necessita de *SID1*, um membro de um grupo de genes sideróforos, regulados por ferro, para colonização do hospedeiro. *H. capsulatum* adquire ferro através da ação da enzima férrico redutase e produção de sideróforos. Cepas deficientes em *SID1* mostraram uma incapacidade significativa no crescimento em macrófagos murinos derivados de medula óssea e consequente atenuação da infecção, a qual pode ser revertida pela adição de ferro exógeno ou restauração da expressão de *SID1*. Estes dados indicaram que *H. capsulatum* utiliza sideróforos, além de outros mecanismos de aquisição de ferro para crescimento durante o processo infeccioso (HWANG et al., 2008, HILTY; SMULIAN; NEWMAN, 2011).

2.1.5.7 - Dimorfismo

O dimorfismo é um aspecto importante na patogênese de fungos dimórficos, pois a fase filamentosa é a forma infecciosa, mas é a forma leveduriforme que sobrevive intracelularmente e causa doença (NEMECEK; WUTHRICH; KLEIN, 2006).

A mudança de temperatura de 25°C para 37°C é um estímulo suficiente para o dimorfismo, porém, outras condições ambientais como presença de cisteína e cAMP (Adenosina 3', 5'-cíclica monofosfato), podem influenciar na morfogênese de *H. capsulatum*. Este dimorfismo é essencial para a virulência,

como evidenciado em culturas mantidas a 25°C, que após serem tratadas quimicamente, se tornam incapazes de realizarem a conversão para a fase leveduriforme, tornando-se avirulentas (MEDOFF et al., 1986).

2 - JUSTIFICATIVA

A histoplasmose é endêmica em toda América, porém também se relatam casos esporádicos no homem e outros mamíferos no resto do mundo (ZANCOPÉ-OLIVEIRA; MUNIZ; PIZZINI, 2019). Esta micose sistêmica tem se tornado um sério problema entre hospedeiros imunocomprometidos, principalmente entre os portadores de HIV. A histoplasmose tem sido reportada em pelo menos 60 países, e o aumento de casos de aids tem aumentado a frequência desta infecção fúngica em diversas regiões do globo terrestre (NACHER et al., 2013).

O aumento da histoplasmose em zonas endêmicas está diretamente associado ao aparecimento da imunodepressão por diversas causas, sobretudo em pacientes infectados pelo HIV. Nestes pacientes, *H. capsulatum* atua como oportunista, produzindo formas clínicas disseminadas agudas ou subagudas (ZANCOPÉ-OLIVEIRA; MUNIZ; WANKE, 2013). Estas formas clínicas, com predominância de lesões cutâneo-mucosas, são mais frequentes no sul do continente americano (KARIMI et al., 2002, NEGRONI et al., 1991, UNIS; OLIVEIRA; SEVERO, 2004).

Isto se difere da enfermidade na América Central e do Norte onde a histoplasmose pulmonar segue sendo a apresentação clínica habitual, com os surtos epidêmicos representando um grave problema sanitário por sua frequência, e elevado número de indivíduos infectados (GARCIA-VÁSQUEZ et al., 2005, MORGAN et al., 2003, REYS et al., 2003, TAYLOR et al., 2005b).

O panorama epidemiológico da histoplasmose não corresponde à dimensão real desta enfermidade na América, devido a uma lacuna relacionada à ausência de informações reais associadas à subnotificação de doença. Recentemente, várias epidemias têm ocorrido, sem o devido registro ou notificação, em diferentes regiões. A maioria destes está associada a atividades profissionais, de ecoturismo e arqueologia. Diversas técnicas moleculares têm sido aplicadas à epidemiologia da histoplasmose visando à determinação de genótipos circulantes em determinadas regiões, e sua associação com a virulência de *H. capsulatum* e a patogenia da histoplasmose (MUNIZ et al., 2010).

Estudos pioneiros neste campo desenvolvidos com o objetivo de inserir novas informações na epidemiologia da histoplasmose foram realizados isoladamente, demonstrando um grande polimorfismo genético em *H. capsulatum* (TAYLOR; CHÁVEZ-TAPIA; REYS MONTES, 2000a, TAYLOR et al., 2000b; MUNIZ et al., 2001,). Estudos de sequenciamento multilocus (MLST) e DNA *fingerprintings* de alguns isolados de *H. capsulatum* de diversas regiões brasileiras estratificou genótipos associados com as regiões de proveniência (MUNIZ et al., 2001, ZANCOPE-OLIVEIRA; TAVARES; MUNIZ, 2005; MUNIZ et al., 2010, DAMASCENO et al., 2019).

Avanços na classificação filogenética de *H. capsulatum* têm sido demonstrados através de diversas análises genéticas que suportam a alta diversidade deste fungo dimórfico (VITÉ-GARIN et al., 2014, TEIXEIRA et al., 2016, SEPULVEDA et al., 2017, DAMASCENO et al., 2019). Eventos de recombinação em patógenos, tais como *H. capsulatum*, associados com o cruzamento sexual podem gerar novas cepas mais ou menos virulentas. Até o presente, poucos estudos desta natureza foram desenvolvidos com cepas provenientes do Brasil (MUNIZ et al., 2010, ALMEIDA-SILVA et al., 2018; DAMASCENO et al., 2019) e de outros países latino-americanos (RODRIGUEZ-ARELLANES et al., 2013).

Conseqüentemente, a necessidade de identificar as características ecotípicas de *H. capsulatum* que possam estar relacionadas com surtos epidêmicos de menor ou maior risco, demanda um maior conhecimento de fatores fenotípicos e genotípicos associados à distribuição de isolados de *H. capsulatum*, tanto clínicos como ambientais, poderá ser de utilidade para as autoridades de Saúde Pública com o objetivo de estabelecer medidas futuras de educação e divulgação para a prevenção da infecção fúngica e por fim evitar novos surtos em zonas rurais e urbanas que possam colocar em risco um grande número de indivíduos.

Diversas questões sobre a relação fungo-hospedeiro e a interação de *H. capsulatum* em seu meio ambiente ainda são temas importantes para serem investigados. Portanto, o conhecimento da relação que existe entre o *mating type* e a fonte de isolamento, bem como a frequência real dos tipos sexuais tanto em isolados clínicos como da natureza de distintas procedências geográficas e, finalmente sua verdadeira relação com a virulência das cepas

torna-se necessário. No trabalho de Bubnick e Smulian (2007), estes questionamentos não foram totalmente esclarecidos, devido ao pequeno número de isolados estudados (cinco cepas locais e duas mutantes avirulentas) e, também, provenientes somente de casos clínicos de duas regiões geográficas distintas (Estados Unidos e Panamá).

Embora, a frequência dos tipos de compatibilidade sexual de *H. capsulatum* isolados de pacientes e do ambiente ainda é restrita no Brasil, recentemente um trabalho proveniente de nosso grupo demonstrou populações recombinantes de *H. capsulatum* provenientes da região Nordeste do país, com alto grau de diversidade haplotípica e com diferentes taxas dos *mating types* *MAT1-1* e *MAT1-2*.

Entretanto, não foram verificadas associação destes fenótipos com os aspectos clínicos da histoplasmose. Além disso, informações sobre a associação dos tipos de compatibilidade sexual e sua virulência são escassas, diferente dos relatos em outros fungos patogênicos. Tem-se sugerido que a distribuição dos casos letais de histoplasmose é muito relacionada com a forma epidêmica adquirida em ambientes fechados, como minas e cavernas, e, portanto, isolados destes ambientes seriam mais virulentos que os adquiridos de espaços abertos (TAYLOR et al., 1999).

As diferenças genéticas previamente observadas por vários autores 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 (TEIXEIRA et al., 2016).

Tem sido sugerido que polimorfismo genético observado entre isolados de *H. capsulatum* poderia estar correlacionado com a patogenia e manifestações clínicas da histoplasmose, uma vez que lesões de pele são muito mais frequentes em casos de histoplasmose ocorridos em algumas regiões brasileiras (KARIMI et al., 2002) e a não ocorrência deste tipo de manifestação em pacientes com histoplasmose no México e nos EUA. Entretanto, não podemos descartar características fenotípicas, tais como a presença de cepas *MAT1-1* e/ou *MAT1-2*, que poderiam estar alterando a virulência deste fungo, também pudessem ser responsáveis por estes eventos.

Portanto, é necessária a elucidação das características fenotípicas e moleculares de *H. capsulatum* proveniente de diferentes regiões geográficas e associação com a sua fisiopatogenia.

Tem-se demonstrado que a dispersão do *H. capsulatum* na natureza pode estar vinculada a quirópteros migratórios, os quais atuam como potenciais reservatórios e dispersores do fungo em natureza (TAYLOR et al., 2005a, 2005b). Além disso, Teixeira e colaboradores (2016) sugerem, por análises filogenéticas, a presença de uma espécie críptica, filogenética e autóctone denominada RJ. Portanto, estudar os fenótipos e genótipos autóctones brasileiros de *H. capsulatum* e fazer comparação com os presentes em outras regiões nos permitiriam conhecer o fluxo das cepas em nossa região e avaliar a introdução de genótipos exógenos.

Estudos utilizando a técnica de tipagem por sequenciamento de genomas completos (*Whole Genome Sequencing Typing*) vêm se tornando uma ferramenta de extrema importância na epidemiologia molecular na detecção de surtos, na taxonomia e evolução molecular, bem como resistência a antifúngicos em fungos patógenos humanos (ENGELTHALER et al., 2011; FARRER et al., 2015; MEYER, 2015; CUOMO, 2017).

As técnicas de genotipagem utilizadas até o final dos anos 2000 como RFLP, RAPD, sequenciamento por MLST e microssatélites hoje se tornaram extremamente laboriosas, de alto custo e baixa resolução quando comparado com o sequenciamento genômico de alto desempenho. Obviamente que todo conhecimento taxonômico do gênero *Histoplasma* se deve a estes marcadores (CARTER et al., 2001; DAMASCENO et al., 2016; KASUGA et al., 2003; MUNIZ, et al., 2010; TAYLOR et al., 2012), porém devido à grande incongruência filogenética e diversidade genética deste fungo, principalmente na América Latina, torna-se necessário o sequenciamento dos genomas de *Histoplasma*. Estes estudos propostos tem o intuito tanto de aumentar o número de marcadores moleculares bem como utilizar tais informações para estudos de epidemiologia molecular e monitoramento de surtos.

De acordo com o último levantamento taxonômico, existem pelo menos 13 espécies crípticas no gênero *Histoplasma* e, somente três destas são representados por genomas completos (TEIXEIRA et al., 2016; SEPULVEDA et al., 2017). Além desta escassez de informação, nenhum isolado oriundo de

espécies brasileiras teve seu genoma sequenciado, o que, por exemplo, impossibilita o acesso a informações genéticas das principais cepas circulantes no Brasil e na América do Sul. Além disto, estudo de função gênica, proteômica e sequenciamento de RNA em cepas sul-americanas de *Histoplasma* ficam limitados pela falta de genomas de referência. Atualmente somente quatro genomas de *Histoplasma* estão disponíveis em banco de dados genômicos e nenhum genoma de *Histoplasma* de espécies oriundas do Brasil foi até então sequenciado.

A variabilidade genética também pode ter implicações diagnósticas, como acontece no complexo de espécies do gênero *Paracoccidioides*. De acordo com o consenso brasileiro em paracoccidioidomicose (PCM) (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017) duas espécies, *P. lutzii* e *P. brasiliensis*, são reconhecidas como causadoras da PCM, sendo que *P. brasiliensis* representa um complexo de cinco espécies filogenéticas (S1a, S1b, PS2, PS3, PS4) (MACEDO et al., 2019).

Um estudo mostrou que a diferença genética entre as duas espécies, agentes da PCM faz com que indivíduos residentes em regiões endêmicas da espécie *lutzii*, possam ter resultados negativos em sorologias realizadas com antígeno produzido pela espécie *brasiliensis*, ocorrendo também o oposto, mostrando assim, que diferenças genéticas podem ter implicações no campo da saúde pública, uma vez que essas diferenças podem resultar em resultados falso-negativos, sendo a ausência de diagnóstico e intervenção clínica correta, podendo levar a óbito (TEIXEIRA et al., 2014).

Em *H. capsulatum* ainda não existe esse tipo de informação, conseqüentemente, esta é a primeira vez que se realizará um estudo na histoplasmose com a junção de todos esses dados, a fim de alcançar um conhecimento da situação regional referente aos aspectos relacionados à epidemiologia da histoplasmose, no estado do Rio de Janeiro e no Brasil. Esta abordagem conjunta permitirá ampliar os conhecimentos sobre as características fenotípicas de cepas autóctones, o genótipo e a virulência destes isolados.

3 - OBJETIVOS

Nosso principal objetivo foi caracterizar ecotípica e taxonomicamente de isolados clínicos e ambientais de *H. capsulatum* no estado do Rio de Janeiro, e associação com suas respectivas procedências geográficas, fontes de isolamento e formas clínicas da histoplasnose, assim como estabelecer a possível relação com virulência.

3.1 - Objetivos específicos

1. Identificar os marcadores de compatibilidade sexual em isolados clínicos e ambientais de *H. capsulatum* provenientes de pacientes do estado do Rio de Janeiro;
2. Caracterizar taxonomicamente isolados clínicos e ambientais provenientes de pacientes do estado do Rio de Janeiro;
3. Associar os marcadores de compatibilidade sexual com a espécie filogenética e distintas procedências geográficas, fonte de infecção e formas clínicas da histoplasnose;
4. Estabelecer a relação entre o tipo de compatibilidade sexual e a espécie filogenética com a virulência de isolados clínicos das diferentes espécies filogenéticas (Panamá, RJ, Northeast, LAmB1 e Unkonwn1).

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Desenho de estudo

Estudo observacional e retrospectivo, de natureza analítica e exploratória, de isolados clínicos e ambientais de *H. capsulatum*.

4.2 - População de estudo

Foram incluídos 34 isolados clínicos de origem humana, 5 isolados de origem animal e 11 ambientais (solo) de *H. capsulatum*, obtidos de diferentes espécimes clínicos e procedências geográficas no estado do Rio de Janeiro pertencentes à Coleção de Fungos Patogênicos do Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI-FIOCRUZ). Cepas ATCC 22636 *MAT1-1/+* e ATCC 22635 *MAT1-2/-* foram utilizadas como referência no estudo de compatibilidade sexual, e isolado G-217B (ATCC 26032) foi usada como controle nos ensaios de virulência. Todos os isolados de *H. capsulatum* estavam sendo conservados em óleo mineral a 25°C e *in natura* a 4°C.

4.3 - Cálculo amostral

Para este estudo, foi utilizada uma amostragem de conveniência, a qual inclui amostras sem probabilidades previamente especificadas. Esse tipo de amostragem, não probabilística, pode ocorrer quando, embora se tenha a possibilidade de atingir toda a população, retira-se a amostra de uma parte que seja prontamente acessível (COSTA NETO, 1977). Dessa forma, trabalhamos com 50 isolados, já disponíveis na coleção de fungos do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – FIOCRUZ.

4.4 - Fenotipagem

4.4.1 - Caracterização macro e micromorfológica das colônias fúngicas

Os isolados de *H. capsulatum* previamente conservados em óleo mineral a 25°C e armazenados *in natura* a 4°C foram inicialmente semeados em duplicata em meio ágar batata dextrose (PDA - Difco Laboratories) e incubados a 25°C, para análise das características morfológicas das colônias em sua fase miceliana. Características fenotípicas como tipo de colônia (filamentosa e leveduriforme), textura e cor e produção de pigmento foram primeiramente observadas macroscopicamente. Posteriormente, foram realizadas culturas em lâmina, incubadas a 25°C em meio PDA, por 7 dias e coradas com lactofenol-azul de algodão (Sigma-Aldrich), para observação das características micromorfológicas do fungo na fase filamentosa, como tipo de hifas e produção de propágulos (macroconídios e microconídios).

4.4.2 - Capacidade de conversão micélio-levedura

Para verificação do dimorfismo foram realizados repiques dos isolados para conversão em meio de cultura ML-GEMA (2,1% de Muller-Hinton Broth, 1,0g de Agar, 2,0g de dextrose, 0,2g de cisteína, 15 ml de gema de ovo, H₂O q.s.p. 100ml) e incubados a 35-37°C. A avaliação da conversão pelos isolados foi realizada através da macromorfologia de colônia, e microscopia ótica, onde se observou o tamanho das células e o aspecto unibrotante das leveduras.

4.5 - Identificação molecular e filogenia dos isolados

4.5.1 - Extração de DNA

A partir da fase leveduriforme de cada isolado, após obtenção de colônia única, foi realizada a extração de DNA, de acordo com protocolo desenvolvido por Muniz e colaboradores (2010) que possui como etapas principais: lise celular (química e mecânica), precipitação de proteínas com uso de fenol-clorofórmio álcool-isoamílico, precipitação com etanol e tratamentos enzimáticos com RNase e Proteinase K. Após o tratamento com RNase e proteinase K, o DNA foi purificado por meio da utilização de fenol-clorofórmio álcool-isoamílico (25:24:1). Em seguida, foi realizado um processo de precipitação, utilizando 1mL de isopropanol 100% e posterior uso de 1mL de etanol a 70%. Posteriormente, o DNA foi ressuspensão em água e sua integridade foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão TBE (0,89M de TRIS, 0,89M de ácido bórico e 0,02M EDTA dissódico; pH 8,4) e posterior coloração com brometo de etídio (Roche Molecular Biochemicals). A concentração final do DNA foi mensurada por espectrofotometria em equipamento NanoVue (GE Healthcare Life Sciences).

4.5.2 - Identificação dos tipos de compatibilidade sexual

A identificação molecular dos tipos de compatibilidade sexual foi realizada utilizando os primers *MAT1-1S* (5'-CGTGGTTAGTTACGGAGGCA-3') e *MAT1-1AS* (5'-TGAGGATGCGAGTGATGGGA-3'), desenhados para a região idiomórfica do locus *MAT1-1*; e *MAT1-2S* (5'-ACACAGTAGCCCAACCTCTC-3') e *MAT1-2AS* (5'-TCGACAATCCCATCCAATACCG-3'), desenhados para a região idiomorfa do locus *MAT1-2*; a amplificação obtida por esses dois pares de *primers* gera um fragmento de 440pb e 528pb, respectivamente (BUBNICK & SMULIAN, 2007). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em um volume final de 25µL, contendo 200µM de cada desoxinucleosídeo trifosfato (dNTP) (Invitrogen), 1,5mM de MgCl₂, 50ng/µL de cada *primer*, 2,5U *TAq* DNA polimerase (Invitrogen), tampão comercial da *TAq* a 1X (Invitrogen) e

75ng de cada amostra de DNA. Os ciclos da reação foram compostos de uma desnaturação inicial de 3 minutos a 95°C; 35 ciclos subsequentes, sendo cada ciclo composto por uma desnaturação de 30 segundos a 95°C, hibridização de 30 segundos a 58°C e uma extensão de 1 minuto e 30 segundos a 72°C; e após a realização dos ciclos, uma extensão final de 10 minutos a 72°C. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1%, com voltagem de 90V, e o gel foi corado com brometo de etídio para observação dos resultados (RODRIGUEZ-ARRELANES et al., 2013). Paralelamente, padronizamos uma PCR multiplex para determinação do tipo de compatibilidade sexual o qual realiza o as etapas de amplificação em uma única reação e não mais separadamente (ALMEIDA-SILVA et al., 2018)

4.5.3 - Sequenciamento multilocus – MLST

Foi realizado o sequenciamento parcial de quatro genes nucleares (*ole1*-delta-9 desaturase do ácido graxo; *tub1*- α -tubulina; *arf* - fator de ribosilação do ADP; e *H-anti* - precursor do antígeno H) constitutivos do genoma de *H. capsulatum* de acordo com o protocolo descrito por Kasuga e colaboradores (2003). Para isso, foram utilizados respectivamente, os *primers*: *arf1* (5'-AGAATATGGGGCAAAAAGGA-3') e *arf2* (5'-CGCAATTCATCTTCGTTGAG-3'); *h-anti13* (5'-CGCAGTCACCTCCATACTATC-3') e *h-anti4* (5'-GCGCCGACATTAACCC-3'); *ole3* (5'-TTTAAACGAAGCCCCACGG-3') e *ole4* (5'-CACCCACCTCCAACAGCAGCA-3'); *tub1*(5'-GGTGGCCAAATCGCAAATC-3') e *tub2* (5'-GGCAGCTTTCCGTTCCCTCAGT-3') (KASUGA; TAYLOR; WHITE, 1999).

As reações de PCR foram alcançadas em um final de 50 μ L, contendo 100ng de DNA genômico; 0,45 μ M de cada *primer*; 1,0U de AmpliTaq DNA Polymerase (Perkin-Elmer), 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 1,5mM de MgCl₂, 50mMKCl, e 0,2mM de dNTP.

Os ensaios de PCR foram realizados em Termal iCycler (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA) programado da seguinte forma: (a) 15 seg de desnaturação a 94°C, (b) 32 ciclos constituídos de 30 seg de pareamento dos *primers* a 65°C e 1 min de extensão a 72°C, seguidos de

extensão final de 5 min a 72°C. A temperatura de pareamento no primeiro ciclo foi de 65°C, sendo reduzida em 0.7°C a cada um dos 12 ciclos subsequentes, atingindo assim uma temperatura de 56°C. A partir do 13º ciclo, a temperatura de pareamento da PCR permaneceu a 56°C nos 20 ciclos restantes, caracterizando dessa maneira, um protocolo denominado de *Touchdown* PCR (MUNIZ et al., 2010). O sequenciamento foi realizado de acordo com o método de Sanger e colaboradores (1977) no Laboratório de Sequenciamento da Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ, onde se utilizou BigDye reagente e o sequenciador automático Applied Biosystems ABI Prism 3730 (Applied Biosystem, Foster CA, USA).

O sequenciamento foi realizado nas direções 5´ e 3´ em um volume de reação de 10µL, contendo 4µL de “premix terminator”, 100 ng de DNA, 3,5 pMoles de cada primer.

4.5.4 - Análises filogenéticas

Todas as sequências foram editadas com o programa Sequencher, (Versão 4.9 - Gene Codes Corporation). A similaridade entre as espécies foi realizada através da submissão da sequência nucleotídica no programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool - NIH). Após a edição dos fragmentos de cada gene obtidos pelo MLST, os mesmos foram manualmente concatenados na seguinte ordem: *arf*, *H-anti*, *ole* e *tub*, obedecendo de maneira peremptória, o tamanho preconizado de cada região. Foi utilizado o mesmo banco de dados utilizado por Teixeira e colaboradores (2016) para comparar a total diversidade do gênero *Histoplasma* até o presente. As análises filogenéticas foram realizadas no *software* MEGA (Versão 10), utilizando o método de Máxima Verossimilhança. Análises posteriores também foram realizadas através do *software* IQTREE, no qual foram descritas características das sequencias estudadas, como, quantidade total de posições nucleotídicas e dentro destas, a quantidade de posições parcimônia-informativas, SNP´s e sítios constantes. A matriz combinada foi analisada através dos métodos filogenéticos. Na análise pelo *software* IQ-TREE, foi utilizada a função –m MODEL, que permite um

melhor a seleção do melhor modelo (ModelFinder - K2P + Inv Gamma) usado em todas as filogenias testadas.

4.5.5 - Análises da diversidade haplotípica

Tendo como base as mesmas sequências lineares utilizadas para as análises filogenéticas, também foram realizadas análises de diversidade haplotípica. Para isso, foram utilizados dois *softwares*. O primeiro, DNAsp (Versão 5.10) foi utilizado para calcular a diversidade haplotípica e o segundo Network (Versão 5.0.1.0), foi utilizado para a construção e representação gráfica da rede de haplótipos (MACEDO et al., 2019).

4.5.6 - Análises Filogenômicas

Aproximadamente 1µg de DNA genômico foi utilizado para montagem da biblioteca genômica, usando o kit de preparação de biblioteca KAPA para plataformas de sequenciamento Illumina® (KAPA Biosystems) seguindo o protocolo do fabricante. Adaptadores previamente quantificados usando o KAPA Library Quantification Kit (KAPA Biosystems) foram inseridos e sequenciados usando HiSeq 2500 Illumina® seguindo todas as recomendações do fabricante. Os adaptadores de sequenciamento Illumina foram removidos usando Trimmomatic v 0.36 e alinhados com a cepa *H. mississippiensis* (NA1) (AAJI00000000.1) ou *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) (ABKI00000000.2) através da ferramenta Burrows-Wheeler Aligner (BWA - v 0.7.7).

A monofilia e a singularidade genética da população *H. suramericanum* - população RJ foi verificada utilizando diferentes abordagens: i) A árvore dos genomas foi calculada no *software* IQ-TREE, usando a opção -m MFP (ModelFinder) para seleção de modelos nos critérios de máxima verossimilhança (ML). O suporte dos ramos foi testado usando 1.000 réplicas de *bootstrap*, juntamente com o teste de razão de verossimilhança aproximada, associado ao teste de Shimodaira-Hasegawa. As árvores filogenéticas foram visualizadas através do *software* FigTree v1.4. ii) A análise genética da população de *Histoplasma* foi avaliada usando a Análise de Componentes

Principais (PCA) usando o pacote adegenet disponível para o *software* R. As funções *fasta2genlight* e *glPca* foram utilizadas para calcular os componentes principais (PCs) usando 2 eixos de variação contínuos, bem como uma árvore Neighbor-Joining (NJ) (NJ) foi calculada com base nos valores de Eigen. iii) Os *softwares* fastSTRUCTURE v1.0 e ADMIXTURE foram usados para decifrar o cenário populacional provável mais parcimonioso de *Histoplasma*, comparando frequências de alelos do genoma completo de diferentes linhagens do sudeste do Brasil (RJ), com outras linhagens. Os polimorfismos foram considerados desvinculados no modelo de ADMIXTURE, e a estrutura populacional de cada indivíduo foi avaliada testando-se $K = 2$ a $K = 10$ ($K = n^{\circ}$ de populações). Parcelas individuais de cores foram usadas para representar linhagens homozigotas, enquanto que as barras de cores mistas representam genótipos misturados (heterozigotos), e a proporção de cada alelo foi representada como porcentagem. O melhor K (cenário de população) para o fastSTRUCTURE foi testado com base no script *chooseK.py*. Os valores de verossimilhança de cada simulação populacional no modelo ADMIXTURE foram acessados individualmente e o modelo com a melhor precisão preditiva foi escolhido para explicar a estrutura da população.

5 - ENSAIOS DE VIRULÊNCIA

Após a realização dos testes moleculares e consequente determinação das espécies filogenéticas de *H. capsulatum*, utilizamos isolados representativos de cada espécie filogenética baseada no MLST (01/16 – Northeast, 03/16 – LamB1, 39942 – Panamá, 23/11 – Unknown1 e 28/11 – RJ) para a caracterização da virulência dos grupos específicos. Duas estratégias foram utilizadas: a primeira baseada na determinação da virulência *in vitro* utilizando ensaios de interação com macrófagos, seguida do ensaio de *killing*, o qual determina a atividade fungicida destas células fagocíticas; ambos os procedimentos foram realizados conforme protocolos descritos previamente (GUIMARÃES et al., 2009). Como segunda estratégia, determinamos a virulência *in vivo* utilizando um modelo distinto, onde utilizamos larvas do lepidóptero *Galleria mellonella*, por ser um prático e eficaz modelo no estudo de

virulência fúngica e fatores do hospedeiro (THOMAZ et al., 2013). Para esta etapa do estudo, selecionamos cinco isolados.

5.1 - Ensaios *in vitro*

5.1.1 - Ensaios de interação com macrófagos

Macrófagos da linhagem RAW 264.7 em monocamadas foram cultivados em Meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10% do meio de aminoácidos não essenciais (NCTC-109 SIGMA-ALDRICH) e 1% de aminoácidos não essenciais (Life Technologies). As células foram incubadas a 37°C *overnight*, em uma placa de poliestireno de 96 poços na presença de 5% de CO₂, respeitando uma concentração de 10⁵ células por poço. Após o cultivo em meio HAM F12, as células leveduriformes de *H. capsulatum* foram lavadas três vezes com tampão fosfato-salino (PBS) e adicionadas aos macrófagos, numa proporção 2:1 e as placas foram incubadas a 37°C, com 5% de CO₂ por 2 horas. Após esse processo, as leveduras que não interagiram com as células fagocíticas foram removidas por lavagem utilizando PBS e subsequente fixação nos poços utilizando solução de metanol a 40%. Até 200 macrófagos foram contados por cada campo e o percentual de fagocitose foi determinado como a quantidade de macrófagos com leveduras internalizadas dividido pelo número total de macrófagos e o índice fagocítico como número médio de leveduras por macrófago, sendo essa análise realizada por FACSCalibur (BD Biosciences, USA) entre o número de células leveduriformes intracelulares e o número de macrófagos contados (GONÇALVES et al., 2018).

5.1.2 - Ensaios de sobrevivência de *H. capsulatum* em macrófagos

Para verificar a capacidade fungicida dos macrófagos, as células leveduriformes de *H. capsulatum* foram ressuspensas em meio DMEM, em uma proporção 5:1 (macrófagos/levedura), utilizando para esse experimento

placas de 96 poços, contendo 10^5 macrófagos por poço. As placas foram incubadas a 37°C sob uma atmosfera com 5% de CO₂. Os poços foram lavados com PBS gelado e os macrófagos foram lisados por adição de água estéril, por 45 min a TA. Alíquotas de diferentes diluições foram plaqueadas em placas contendo BHI-Sangue a 5% e incubadas a 37°C por um período de 10-15 dias. Após isso foram determinados o número de unidades formadoras de colônia (CFU) e avaliadas a porcentagem de atividade fungicida dos macrófagos para cada isolado (CORDERO et al., 2016).

5. 2 - Ensaio *in vivo*

5.2.1 - Infecção em *Galleria mellonella*

Para este ensaio utilizamos larvas de lepidóptera *Galleria mellonella*, com larvas pesando entre 0,10 e 0,15g, priorizando os insetos que não possuíam marcas externas de cor cinza. As larvas foram incubadas a 4°C por 30 minutos antes da inoculação, para impedir a movimentação e assim facilitar a infecção. Vinte larvas por grupo (INI 01/16, INI 03/16, 39942, IPEC 23/11, IPEC 28/11, G217B, PBS e Sham) foram inoculadas com um inóculo de 1×10^6 leveduras de *H. capsulatum* diluídos em PBS estéril (10uL), dentro do hemocelo, utilizando micro seringa com agulha de 0,75mm de diâmetro. Como controle negativo, o mesmo número de larvas foi inoculado somente com PBS, com a finalidade de monitorar uma possível morte por danos físicos. Um grupo experimental adicional (Sham) foi acompanhado, onde as larvas não receberam qualquer tipo de inoculação. Todas as larvas foram mantidas em placas de Petri estéreis em ambiente escuro, e incubadas na temperatura de 37°C, sendo a mortalidade avaliada duas vezes ao dia. Os grupos foram fotografados no tempo 0 (zero) (momento da inoculação) e diariamente até o final do experimento. A morte das larvas foi avaliada pela ausência de movimentação, onde normalmente apresentavam tonalidade escura. Estas foram removidas das placas e descartadas. Curvas de sobrevivência, demonstrando a porcentagem de larvas vivas diariamente, foram obtidas para verificar o efeito de cada isolado separadamente. As curvas de morte foram avaliadas por análise estatística utilizando o teste não-paramétrico de Mantel-Cox através do *software* GraphpadPrism (Versão 6) (THOMAZ et al., 2013).

5.3 - Microscopia de Fluorescência

A microscopia de fluorescência foi utilizada para determinação do perfil de expressão de polissacarídeos de parede celular através da ligação de lectinas às células leveduriformes de *H. capsulatum*. As células foram marcadas com ConA (Concanavalina A) em vermelho, que se liga a resíduos

de manose. A Dectina-1-Fc em verde, que se liga à β -1,3-glucana e o Uvitex 2B em azul, que se liga à quitina total. Inicialmente as células leveduriformes foram cultivadas em meio HAM's F12 por 48h, as quais foram centrifugadas a 1100g por 10 minutos, a 4°C e lavadas por três vezes com PBS (Tampão salina fosfato) (KH₂PO₄ 1,4 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, pH 7.4) e em seguida foram fixadas com paraformaldeído (4%) por 2 horas a 37°C. Logo após, uma concentração celular de 1×10^6 foi bloqueada com PBS acrescido de 1% de BSA, por 1 hora à temperatura ambiente. A incubação com ConA obedeceu uma concentração final de 100 μ g/mL, já a incubação com Dectina 1-Fc foi realizada numa concentração de final de 5 μ g/mL, ambas incubações foram realizadas por um período de 1 hora, sob agitação e protegidas da luz, sendo uma incubação subsequente com 2 μ g/mL de anticorpo policlonal de cabra anti-IgG de camundongo (Alexa 488), durante 1 hora. A marcação com Uvitex 2B foi realizada utilizando uma solução de 10 mg/mL em PBS e incubação das células por 1 minuto, sob agitação. Tais marcações foram observadas em microscópio de fluorescência (Carl Zeiss MicroImaging, Inc.), com uma ampliação de 100X e a edição das imagens obtidas, sendo separadas por marcação, foi realizada utilizando dois *softwares*: Fiji (NIH, Bethesda) e Adobe Photoshop CC 2019 (Adobe Systems Software).

6 - RESULTADOS

6.1 - População de estudo

Isolados de *H. capsulatum* ($n=50$), todos provenientes do Estado do Rio de Janeiro, previamente isolados e armazenados na Coleção de Fungos Patogênicos do Setor de Diagnóstico Micológico do Laboratório de Micologia (INI-Fiocruz) foram incluídos no estudo. As características dos isolados estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1 – *Histoplasma capsulatum* analisados no presente estudo

Isolado	Origem	Fonte/Espécime	Forma Clínica	Isolamento
AC 05	Ambiental	Solo	NA	Niterói
CO4	Ambiental	Solo	NA	Petrópolis
EP 02	Ambiental	Solo	NA	Itaipava
IGS 19	Ambiental	Solo	NA	Ilha Grande
IGS 4/5	Ambiental	Solo	NA	Ilha Grande
IT 04	Ambiental	Solo	NA	Itaipava
RPS 35	Ambiental	Solo	NA	Rio da Prata
RPS 45	Ambiental	Solo	NA	Rio da Prata
RPS 51	Ambiental	Solo	NA	Rio da Prata
TI 01	Ambiental	Solo	NA	Tinguá
TI 05	Ambiental	Solo	NA	Tinguá
CÃO4	Animal	Fígado e baço	NA	Itaipava
IPEC 02/13	Animal	Hemocultura	NA	Rio de Janeiro
IPEC 05/12	Animal	Swab de lesão	NA	Rio de Janeiro
IPEC 07/12	Animal	Biópsia de linfonodo	NA	Rio de Janeiro
RS 36	Animal	Fígado e baço	NA	Ilha Grande
84502	Humana	Hemocultura	Disseminada	Rio de Janeiro
13H	Humana	Hemocultura	Disseminada	Rio de Janeiro
129H	Humana	Hemocultura	Disseminada	Rio de Janeiro
20231	Humana	Swab de orofaringe	Disseminada	Rio de Janeiro
11354	Humana	Hemocultura	Disseminada	Rio de Janeiro
3416	Humana	Escarro	HPC	Rio de Janeiro
3612	Humana	Biópsia de pulmão	Disseminada	Rio de Janeiro
36GAL	Humana	Sangue	Disseminada	Rio de Janeiro
39439	Humana	Aspirado MO	Disseminada	Rio de Janeiro
39942	Humana	Biópsia	ND	Rio de Janeiro
6503	Humana	Biópsia de gânglio	Disseminada	Rio de Janeiro
84564	Humana	Biópsia de pele	Disseminada	Rio de Janeiro
18H	Humana	Hemocultura	Disseminada	Rio de Janeiro
HC 40039	Humana	Aspirado MO	Disseminada	Rio de Janeiro
INI 01/16	Humana	Aspirado MO	Disseminada	Rio de Janeiro
INI 02/16	Humana	Biópsia de pele	Disseminada	Rio de Janeiro
INI 03/16	Humana	Aspirado MO	Disseminada	Rio de Janeiro
INI 04/16	Humana	Escarro	Disseminada	Rio de Janeiro
INI 05/16	Humana	Fragmento gânglio	Disseminada	Rio de Janeiro
INI 06/16	Humana	Aspirado MO	Disseminada	Rio de Janeiro
INI 07/16	Humana	Aspirado MO	Disseminada	Rio de Janeiro
IPEC 01/12	Humana	Aspirado MO	Disseminada	Rio de Janeiro
IPEC 01/13	Humana	Hemocultura	Disseminada	Rio de Janeiro
IPEC 02/14	Humana	Biópsia de pele	Disseminada	Rio de Janeiro
IPEC 04/12	Humana	Aspirado MO	Disseminada	Rio de Janeiro
IPEC 04/14	Humana	Aspirado MO	Disseminada	Rio de Janeiro
IPEC 06/12	Humana	Aspirado MO	Disseminada	Rio de Janeiro
IPEC 09/12	Humana	LBA	HPC	Rio de Janeiro
IPEC 11/12	Humana	Biópsia de pele	Disseminada	Rio de Janeiro
IPEC 23/11	Humana	LBA	Disseminada	Rio de Janeiro
IPEC 24/11	Humana	Hemocultura	Disseminada	Rio de Janeiro
IPEC 26/11	Humana	Aspirado MO	Disseminada	Rio de Janeiro
IPEC 27/11	Humana	Swab de orofaringe	Disseminada	Rio de Janeiro
IPEC 28/11	Humana	Aspirado MO	Disseminada	Rio de Janeiro

Legenda: MO = Medula óssea; NA = Não se aplica; ND = Não disponível; LBA = Lavado broncoalveolar; IPEC = Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas; INI = Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas; HPC = Histoplasmo Pulmonar crônica; RPS = Rio da Prata – Solo; RS = Roedor Silvestre; TI = Tinguá; IGS = Ilha Grande – Solo; IT = Itaipava; AC = Aldeia Curumim.

Foi observado que os isolados de origem ambiental, dentre os 50 estudados, foram coletados de solo de regiões do estado do Rio de Janeiro. Dois coletados em Tinguá (TI01 e TI05), três coletados na região de Rio da Prata (RPS 35, RPS 45 e RPS 51), dois isolados coletados em Niterói (IT04 e AC 05), dois coletados na Ilha Grande (IGS 4/5 e IGS 19), além de um isolado coletado em Itaipava e outro em Petrópolis, sendo os isolados EP02 e CO4, respectivamente. Ainda quanto à fonte de isolamento, observamos isolados de origem animal e isolados de origem humana, correspondendo a diferentes percentuais dentro da amostragem total (Figura 14).

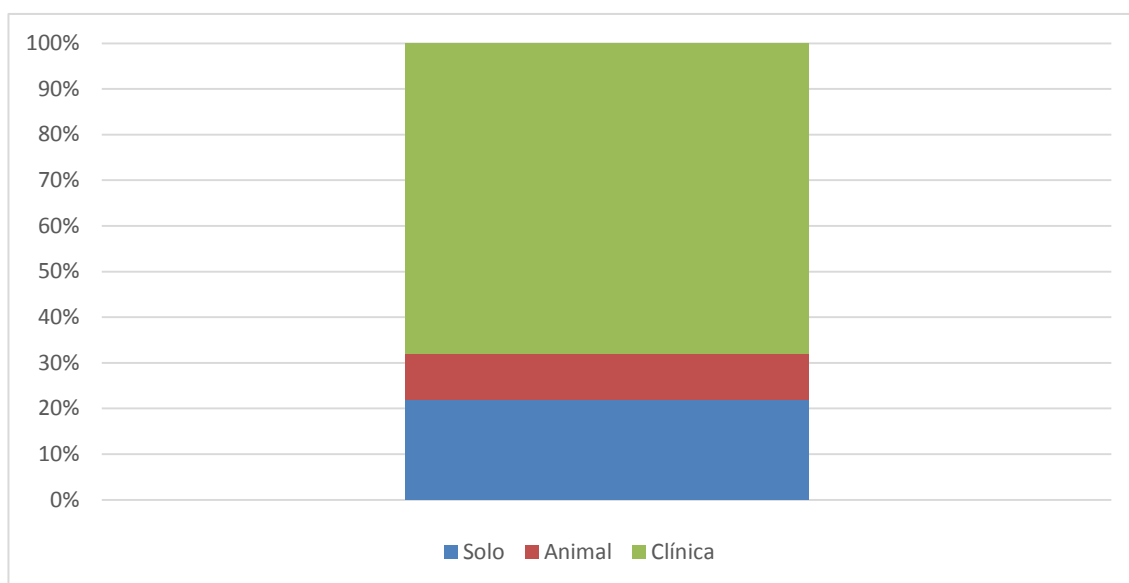


Figura 14 – Percentual dos isolados de origem ambiental, de origem animal e de origem clínica quanto à fonte de isolamento. 22% (11) são de origem ambiental, 10% (5) são de origem animal e 68% (34) são de origem humana.

Dentre os isolados clínicos, 26 são oriundos de pacientes do sexo masculino e oito do sexo feminino, além disso, a grande maioria é oriunda de pacientes com a forma disseminada (91,1%), dentre os quais, observamos isolados oriundos de aspirado de medula óssea, de hemocultura, biópsia (biópsia de gânglio, biópsia de pele, biópsia de pulmão), swab de orofaringe, fragmento de gânglio, escarro e lavado broncoalveolar.

Dessa forma, observou-se que entre os pacientes com histoplasmose disseminada, os isolados oriundos de aspirado de medula óssea foram os mais frequentes, seguidos dos de hemocultura, biópsia de pele, swab de orofaringe e fragmento de gânglio, escarro e lavado broncoalveolar com iguais percentuais (Figura 15).

Isolamento na Histoplasmose Disseminada

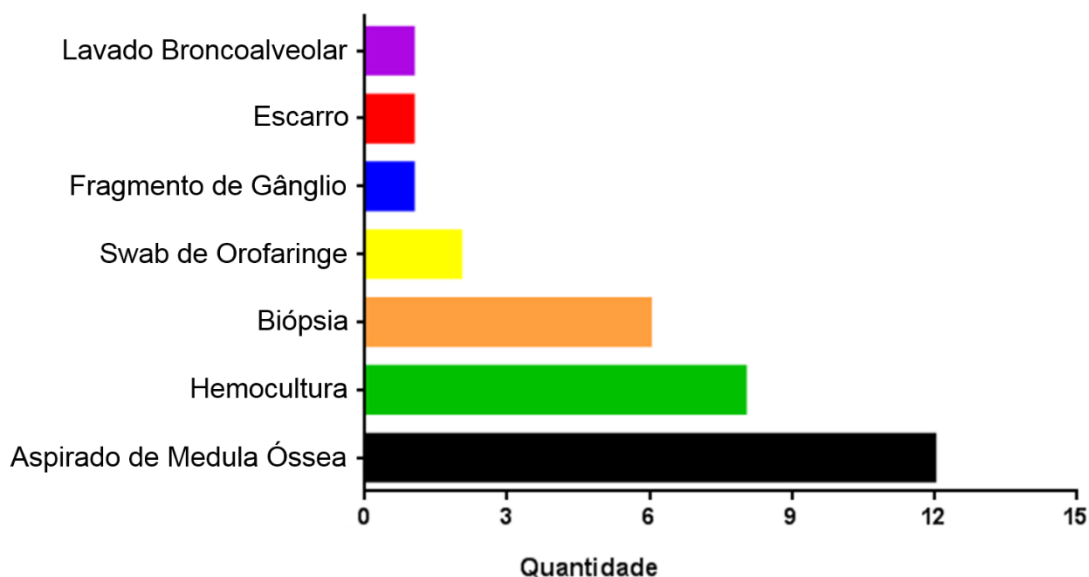


Figura 15 – Isolamento de *H. capsulatum* em diferentes espécimes clínicos oriundos de pacientes com histoplasmose disseminada. Dentre os isolados, 38,7% são isolados de medula óssea, 25,8% são de hemocultura, 19,4% são de biópsia de pele, 6,5% são de swab de orofaringe e 3,2% são de fragmento de gânglio, escarro e lavado broncoalveolar.

Isolados fúngicos provenientes de pacientes com outras formas da histoplasmose, também foram avaliados. No entanto, com uma proporção bem reduzida quando comparados com a infecção disseminada. Apenas dois isolados da forma pulmonar crônica foram observados, e além destes, um último isolado (39942), não teve a forma clínica descrita.

6.2 - Confirmação morfológica da espécie

Na avaliação dos aspectos macromorfológicos dos isolados, após incubação dos mesmos a 25°C, por 21 dias, em meio PDA, observou-se morfologia característica de *H. capsulatum* da fase filamentosa, com colônias micelianas, de aparência cotonosa, com coloração variando do branco a marrom (Figura 16A). Na avaliação microscópica das mesmas condições de cultivo, foi possível observar a presença de hifas hialinas, septadas e ramificadas, assim como a presença de macro e microconídios (Figura 16B).

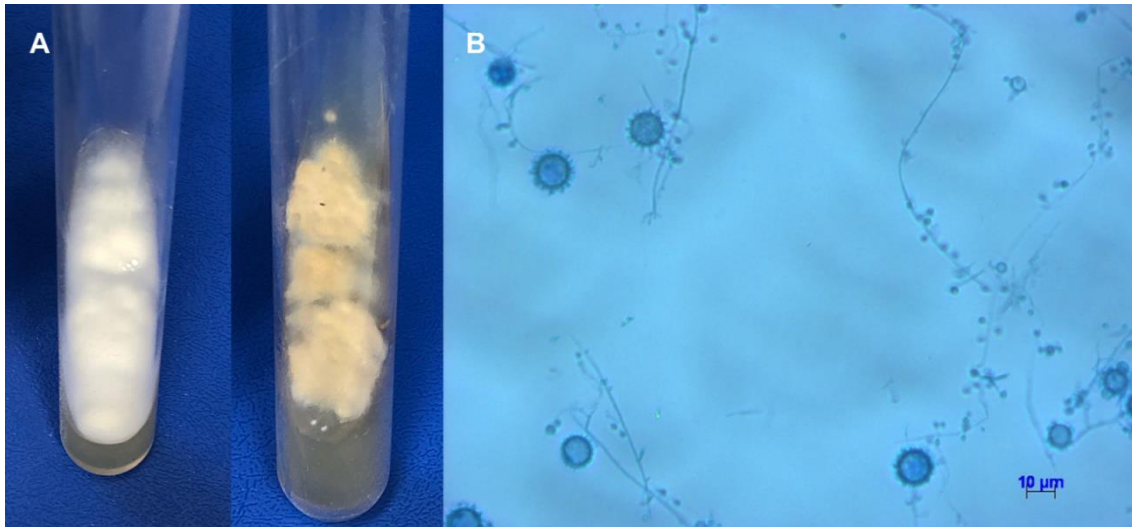


Figura 16 – Forma filamentosa de *H. capsulatum*. (A) – Macromorfologia evidenciando os aspectos cotonoso e pulverulento e as colorações branco e bege, respectivamente. (B) – Micromorfologia evidenciando hifas hialinas, septadas com presença de microconídios e macroconídios tuberculados Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Entre os 50 isolados estudados foi possível observar que 30 isolados apresentaram a coloração branca e aspecto cotonoso após o período de 21 dias de cultivo em meio PDA.

Os outros 20 isolados que apresentaram a coloração bege e aspecto pulverulento como características macroscópicas após o mesmo período. Não houve isolados com a coloração branca e aspecto pulverulento, da mesma forma que o aspecto cotonoso não foi observado entre os isolados que produziram a coloração bege (Tabela 2).

Tabela 2: Coloração dos isolados incluídos no presente estudo

Coloração da Cultura	Isolado
Branca/Cotonosa	13H, 129H, 3416, 3612, 39439, 39942, 6503, 84502, 84564, CAO4, CO4, EP02, HC18, IGS19, INI 01/16, IPEC 04/12, IPEC 04/14, IPEC 05/12, IPEC 06/12, IPEC 07/12, IPEC 09/12, IPEC 11/12, IT04, RPS35, RPS45, RPS51, RS36, TIO1, TIO5, 36GAL.
Bege/Pulverulento	20231, 11354, AC05, 40039, IGS4/5, INI 02/16, INI 03/16, INI 04/16, INI 05/16, INI 06/16, INI 07/16, IPEC 01/12, IPEC 01/13, IPEC 02/13, IPEC 02/14, IPEC 23/11, IPEC 24/11, IPEC 26/11, IPEC 27/11, IPEC 28/11.

Legenda: AC = Aldeia Curumim, IGS = Ilha Grande Solo, IPEC = Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, INI = Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, RPS = Rio da Prata Solo, IT = Itaguaí, RS = Roedor silvestre.

Avaliando a coloração dos isolados entre as três fontes de isolamento (ambiental, animal e humana), foi possível observar que independente da fonte de isolamento, é possível encontrar isolados com os dois principais aspectos (Cotonoso/Branco e Pulverulento/Bege), no entanto em diferentes proporções (Figura 17).

A correlação dos dados entre coloração e aspecto da colônia demonstraram significância estatística pelo teste exato de Fischer ($p < 0,0001$).

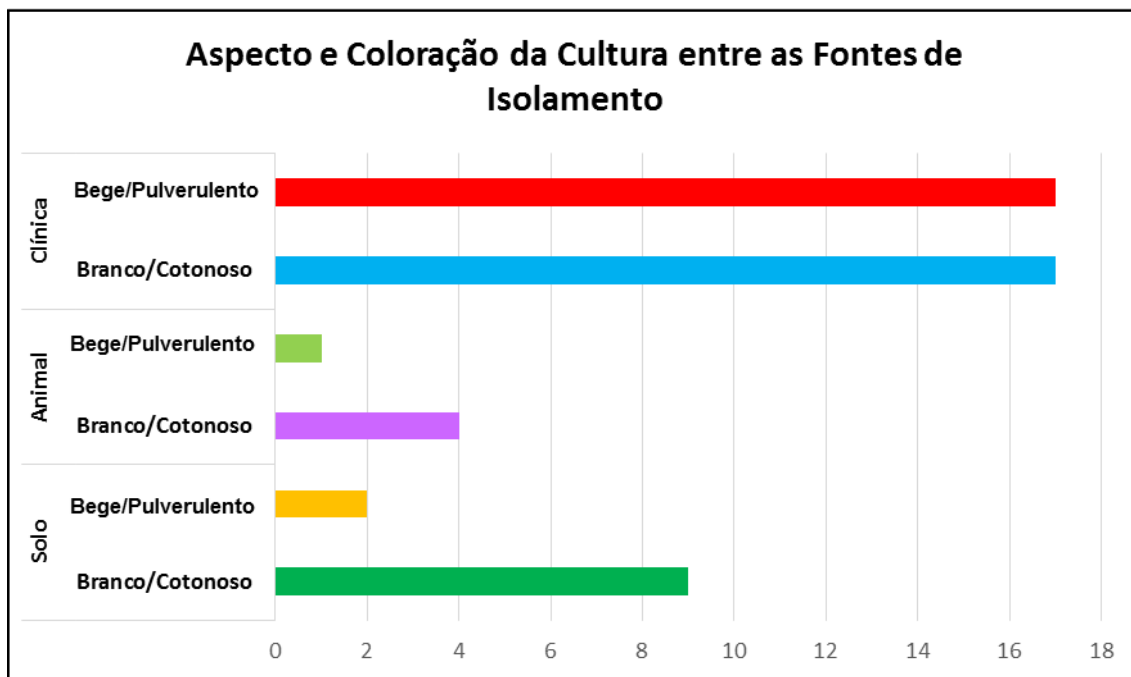


Figura 17 – Coloração e aspecto das culturas quanto às fontes de isolamento. Entre os isolados de origem clínica, 17 isolados apresentaram cada um dos aspectos, entre os isolados de origem animal, um apresentou o aspecto pulverulento e coloração bege e quatro apresentaram o aspecto cotonoso e coloração branca e entre os isolados de origem ambiental, dois apresentaram o aspecto pulverulento e coloração bege, enquanto nove apresentaram coloração branca de aspecto cotonoso.

Além da análise tanto macro, quanto microscópica, da fase filamentosa, a confirmação morfológica de *H. capsulatum* também dependeu da avaliação da conversão para a fase leveduriforme.

Com essa finalidade, após a conversão dos isolados em meio MLGema e incubação a 37°C por 15 dias, foi possível observar que os isolados apresentaram colônias de aparência cremosa, de coloração bege e que à observação microscópica, foi possível visualizar leveduras unibrotantes, estruturas compatíveis com a fase leveduriforme de *H. capsulatum*, dessa maneira, evidenciando o caráter dimórfico do fungo.

Foi possível observar que os isolados que apresentaram o aspecto bege/pulverulento, convertiam mais rapidamente para a fase leveduriforme, com aproximadamente 15 dias de cultivo, ao passo que os isolados que apresentaram o aspecto branco/cotonoso convertiam de maneira mais demorada, sendo por vezes necessária mais de uma passagem em meio MLGema para total conversão.

A micromorfologia da fase leveduriforme foi verificada através da confecção de lâminas coradas com lactofenol azul-de-algodão após o crescimento das colônias em meio ML-GEMA por 14 dias 37°C. Dos 50 isolados, todos apresentaram leveduras unibrotantes, com 100% de conversão, sendo assim, caracterizando *H. capsulatum*, tanto na macromorfologia quando na micromorfologia da fase leveduriforme (Figura 18).

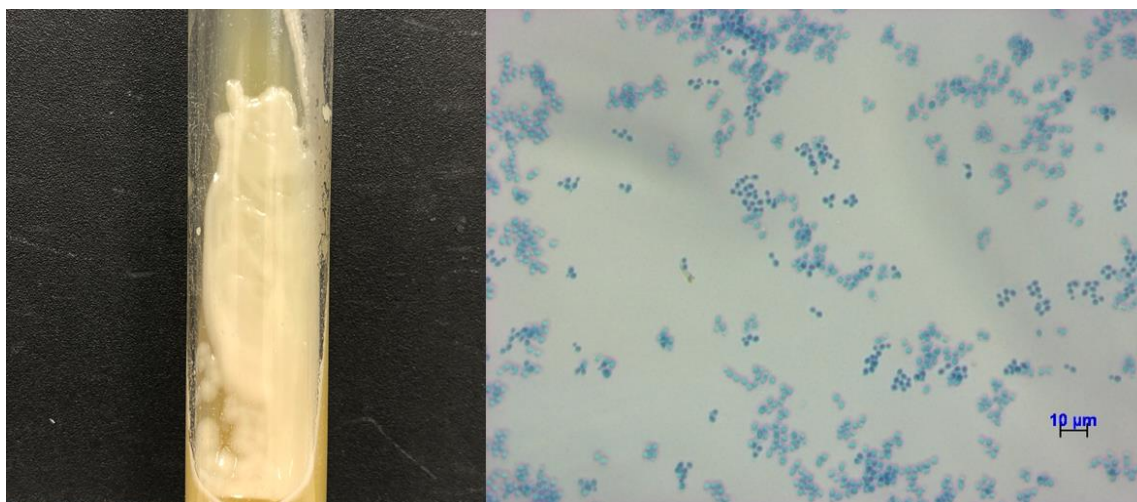


Figura 18 – Macro e micromorfologia da fase leveduriforme de *H. capsulatum*. Colônias de aspecto cremoso na macroscopia e leveduras unibrotantes na microscopia, após cultivo em meio ML-Gema a 37°C e coloração com azul de algodão. Fonte: Próprio autor.

6.3 - Ensaio moleculares

6.3.1 - Identificação molecular dos tipos de compatibilidade sexual

A caracterização molecular dos tipos de compatibilidade sexual foi determinada pela reação de PCR convencional na qual, entre os 50 isolados, 31 foram classificados como *MAT1-1* e 19 classificados como *MAT1-2* (Tabela 3).

Tabela 3: Distribuição dos isolados entre os tipos de compatibilidade sexual *MAT1-1* e *MAT1-2*

Isolados do tipo <i>MAT1-1</i>	13H, 20231, 11354, 3416, 3612, 39349, 6503, 84502, 84564, AC05, CO4, EP02, HC18, IGS19, IGS4/5, INI 02/16, INI 03/16, INI 04/16, INI 05/16, IPEC 02/13, IPEC 06/12, IPEC 09/12, IPEC 11/12, IPEC 26/11, IT04, RPS35, RPS45, RPS51, RS36, TI01, TI05.
Isolados do tipo <i>MAT1-2</i>	129H, 39942, CAO4, 40039, INI 01/16, INI 06/16, INI 07/16, IPEC 01/12, IPEC 01/13, IPEC 02/14, IPEC 04/12, IPEC 04/14, IPEC 05/12, IPEC 07/12, IPEC 23/11, IPEC 24/11, IPEC 27/11, IPEC 28/11, 36GAL.

Legenda: AC = Aldeia Curumim, IGS = Ilha Grande Solo, IPEC = Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, INI = Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, RPS = Rio da Prata Solo, IT = Itaguaí, RS = Roedor silvestre.

Foi possível observar a presença de isolados do tipo *MAT1-1* em todas as fontes de isolamento, ao passo que não foi observado o tipo *MAT1-2* entre os isolados de solo (Figura 19).

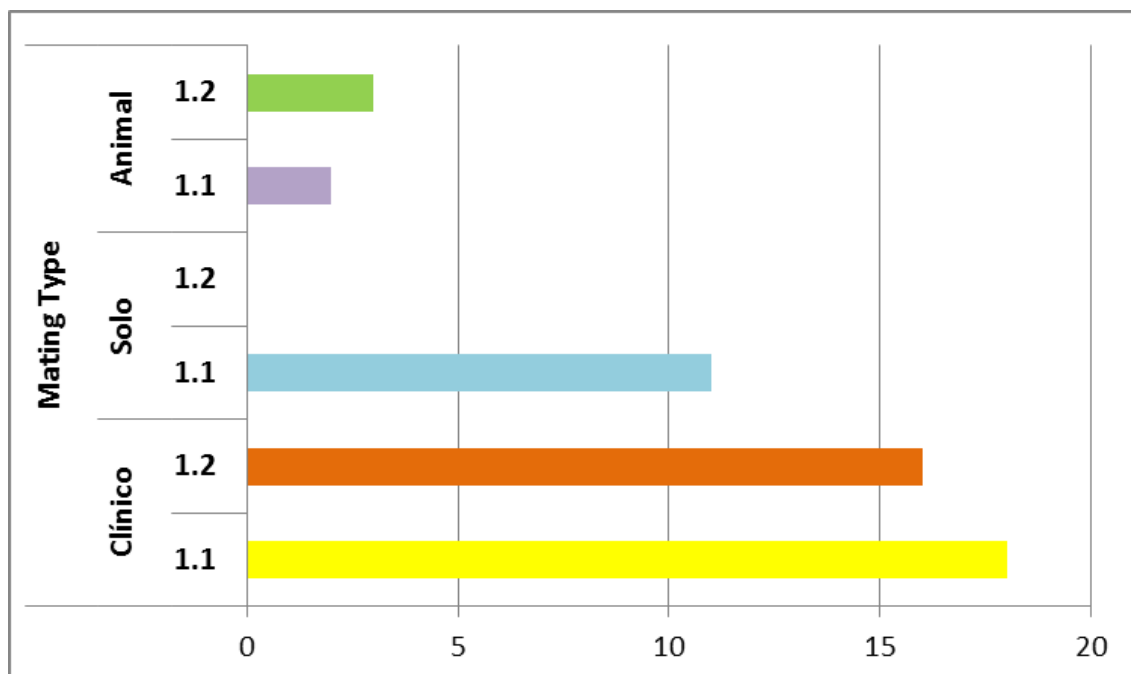


Figura 19 – Distribuição dos tipos de compatibilidade sexual quanto à fonte de isolamento: clínica, ambiental (solo) ou animal dos cinquenta isolados empregados no estudo.

Além dos resultados da classificação geral dos isolados, foi possível observar que as reações para detecção dos tipos de compatibilidade sexual poderiam ser feitas em uma única reação, onde desenvolvemos a PCR multiplex para estas análises.

A detecção simultânea de ambos os tipos, se dá pelo peso molecular de cada fragmento amplificado. Os fragmentos característicos de *MAT* 1.1 são evidenciados com 412 pares de bases, ao passo que os fragmentos de *MAT* 1.2 geram 569 pares de bases, o que é facilmente distinguível em gel de agarose (Figura 20).

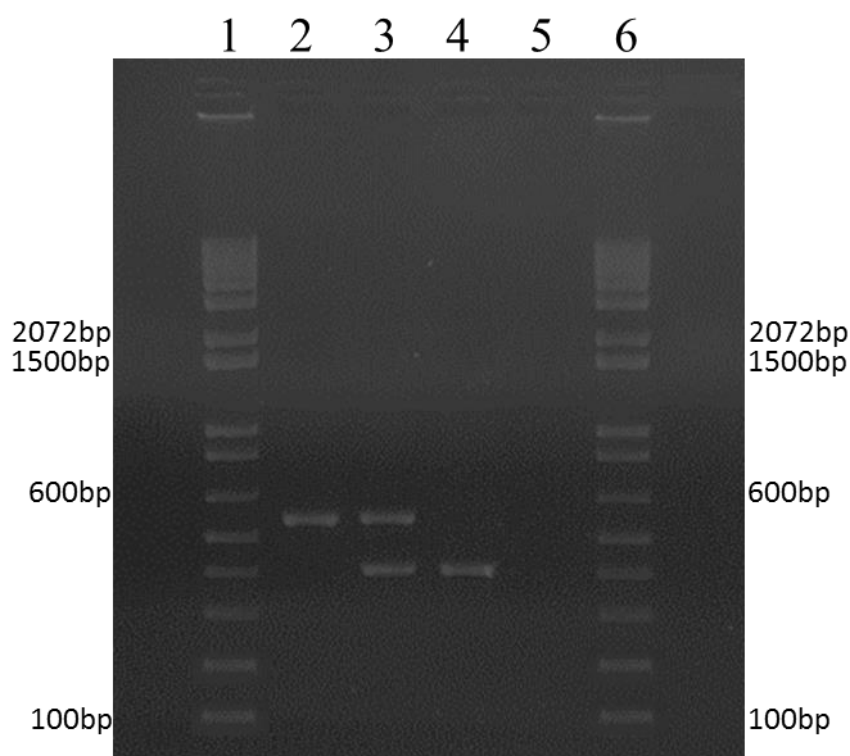


Figura 20 – Detecção de dois mating types. Slot 1 e 6 = Peso molecular (100bp DNA Ladder – Invitrogen), 2 = Amplificação de 569 pares de bases correspondendo ao isolado G186A (ATCC 26029), 3 = Amplificação de dois fragmentos, o maior corresponde ao isolados G186A e o menor corresponde ao isolado G217B, 4 = Amplificação de 412 pares de bases correspondendo ao isolado G217B (ATCC 26032) e 5 = Controle negativo.

Após a realização desses ensaios com as cepas de referência, realizamos os testes supracitados com os isolados do presente estudo e observamos que resultados se mantiveram. Para essa etapa realizamos os testes com uma amostragem de conveniência dentro do nosso próprio estudo, sendo 12 amostras, analisadas juntamente com outras 14 amostras já previamente caracterizadas (RODRIGUEZ-ARELLANES et al., 2013).

O teste foi realizado com finalidade de comparação das duas maneiras e observou-se que tanto nas cepas de referência como nas amostras do nosso estudo, os resultados não se alteram (Figura 21 e Tabela 4).

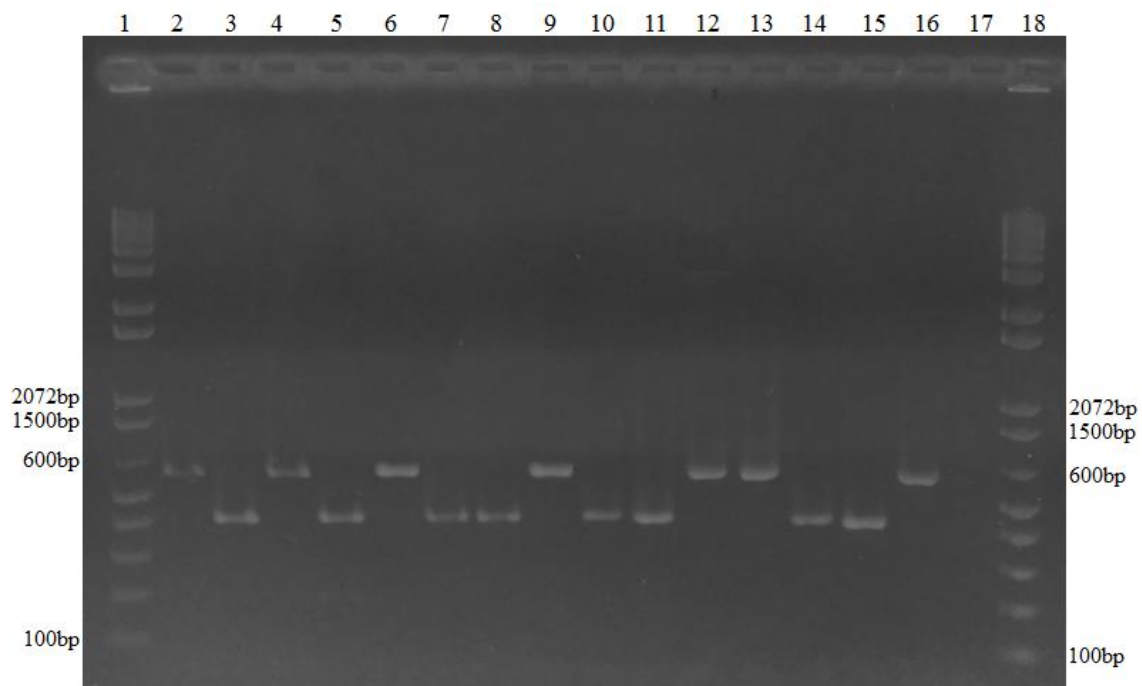


Figura 21 - Gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio para análise da amplificação da região parcial do *locus MAT1*, com amostras positivas para as duas regiões idiomórficas (*MAT1-1* e *MAT1-2*) do *locus*. 1 e 18 = Peso molecular 100bp (Invitrogen), 3, 5, 7, 8, 10, 11 e 14 são respectivamente as amostras CO4, AC05, IPEC 11/12, INI 02/16, IT04, RPS 35 E IGS 4/5, são amostras positivas para o tipo *MAT1-1* com 412 pares de bases. Os slots 2, 4, 6, 9, 12 e 13, são respectivamente as amostras 129H, HC 40039, 39942, CÃO 4, INI 01/16 e IPEC 04/12, positivas para *MAT1-2*, com 569 pares de bases. Slot 15 = Cepa padrão (G217B – ATCC 26032) *MAT 1-1*, Slot 16 – Cepa padrão (G186A – ATCC 26029) *MAT 1-2*, Slot 17 = Controle negativo

Tabela 4: Características gerais dos isolados utilizados na otimização da técnica de detecção dos MAT 1-1 e 1-2 (ALMEIDA-SILVA et al., 2018).

Isolado	Fonte	Origem	Mating Type	
			Uniplex PCR	Multiplex PCR
18H	Humana	RJ	MAT1-1	MAT1-1
37307	Humana	RJ	MAT1-1	MAT1-1
247BL	Humana	MS	MAT1-1	MAT1-1
M396/08	Animal	SP	MAT1-1	MAT 1-1
M1084/08	Animal	SP	MAT1-1	MAT1-1
M487/08	Animal	SP	MAT1-1	MAT1-1
M975/08	Animal	SP	MAT1-1	MAT1-1
AC05	Solo	RJ	MAT1-1	MAT1-1
TI01	Solo	RJ	MAT1-1	MAT1-1
IGS19	Solo	RJ	MAT1-1	MAT1-1
RPS51	Solo	RJ	MAT1-1	MAT1-1
CO2	Solo	RJ	MAT1-1	MAT1-1
CO4	Solo	RJ	MAT1-1	MAT1-1
IGS4/5	Solo	RJ	MAT1-1	MAT1-1
129H	Humana	RJ	MAT1-2	MAT1-2
39942	Humana	RJ	MAT1-2	MAT1-2
HC40039	Humana	RJ	MAT1-2	MAT1-2
INI 01/16	Humana	RJ	MAT1-2	MAT1-2
INI 06/16	Humana	RJ	MAT1-2	MAT1-2
IPEC 01/12	Humana	RJ	MAT1-2	MAT1-2
2090603	Humana	RJ	MAT1-1	MAT1-1
39439	Humana	RJ	MAT1-1	MAT1-1
HC 18	Humana	RJ	MAT1-1	MAT1-1
INI 02/16	Humana	RJ	MAT1-1	MAT1-1
INI 03/16	Humana	RJ	MAT1-1	MAT1-1
IPEC 02/13	Humana	RJ	MAT1-1	MAT1-1

Legenda: RJ = Rio de Janeiro, MS = Mato Grosso do Sul, SP = São Paulo, INI = Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, IPEC = Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, IGS = Ilha Grande Solo, RPS = Rio da Prata Solo, AC = Aldeia Curumin, TI = Tinguá.

Após a correlação dos dados morfológicos (aspecto e coloração da colônia) na fase filamentosa, com os resultados de MAT, tanto MAT 1-1 quanto MAT 1-2, não foram observadas significância estatística pelo teste de Qui-quadrado (X^2) ($p = 0,2585$).

6.3.2 Análises filogenéticas por MLST (*Multi Locus Sequence Typing*)

A realização das análises filogenéticas se deu por meio do sequenciamento multilocus onde foram obtidos os fragmentos previamente preconizados, 459 pares de bases para o fragmento do gene *arf*, 408 pares de bases para o gene *H-anti*, 424 pares de bases para o gene *ole* e 278 pares de bases para o fragmento do gene *tub1* (KASUGA et al., 2003). Após a edição das sequências pelo programa *Sequencher* versão 4.9 (Genes Codes Corporation), os quatro fragmentos foram manualmente concatenados, gerando uma sequência linear de 1601, na qual foi possível observar: 272 posições parcimônia-informativas, 143 *Single Nucleotide Polimorphisms* – Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP's) e 1186 sítios constantes pares de bases. A partir da sequência concatenada, foram realizadas análises de diversidade genética e assim foi possível demonstrar a alta diversidade genética entre os 50 isolados estudados. A sequência linear dos 50 isolados foi analisada pelo *software* MEGA (versão 10) e foi possível observar a existência de seis clados filogenéticos de origem monofilética:

- O clado I é composto por 12 isolados de origem humana (06/16 27/11, 04/12, 28/11, HC18, 07/12, 01/12, 05/12, 05/16, 01/13, 40039 e 02/13);
- O clado II é formado por 6 isolados também de origem humana (02/14, 24/11, 11354, 07/16, 39439 e 26/11);
- O clado III é majoritariamente composto por isolados de solo, no qual se agruparam 16 isolados, sendo dez de origem ambiental/solo (RPS 45, RPS51, AC05, IT04, EP02, TI01, TI05, IGS19, IGS4/5 e RPS35), cinco de origem clínica (6503, 3612, 04/14, 06/12 e 3416) e o isolado RS36, de origem animal;
- O clado IV é formado por dois isolados, um de origem ambiental/solo (CO4) e um (CAO4) de origem animal;
- O clado V é formado por mais quatro isolados (23/11, 20231, 36GAL e 39942) de origem clínica;
- O clado VI é formado por dez amostras (09/12, 13H, 04/16, 129H, 01/16, 84502, 84564, 03/16, 11/12 e 02/16), todas de origem clínica (Figura 22).

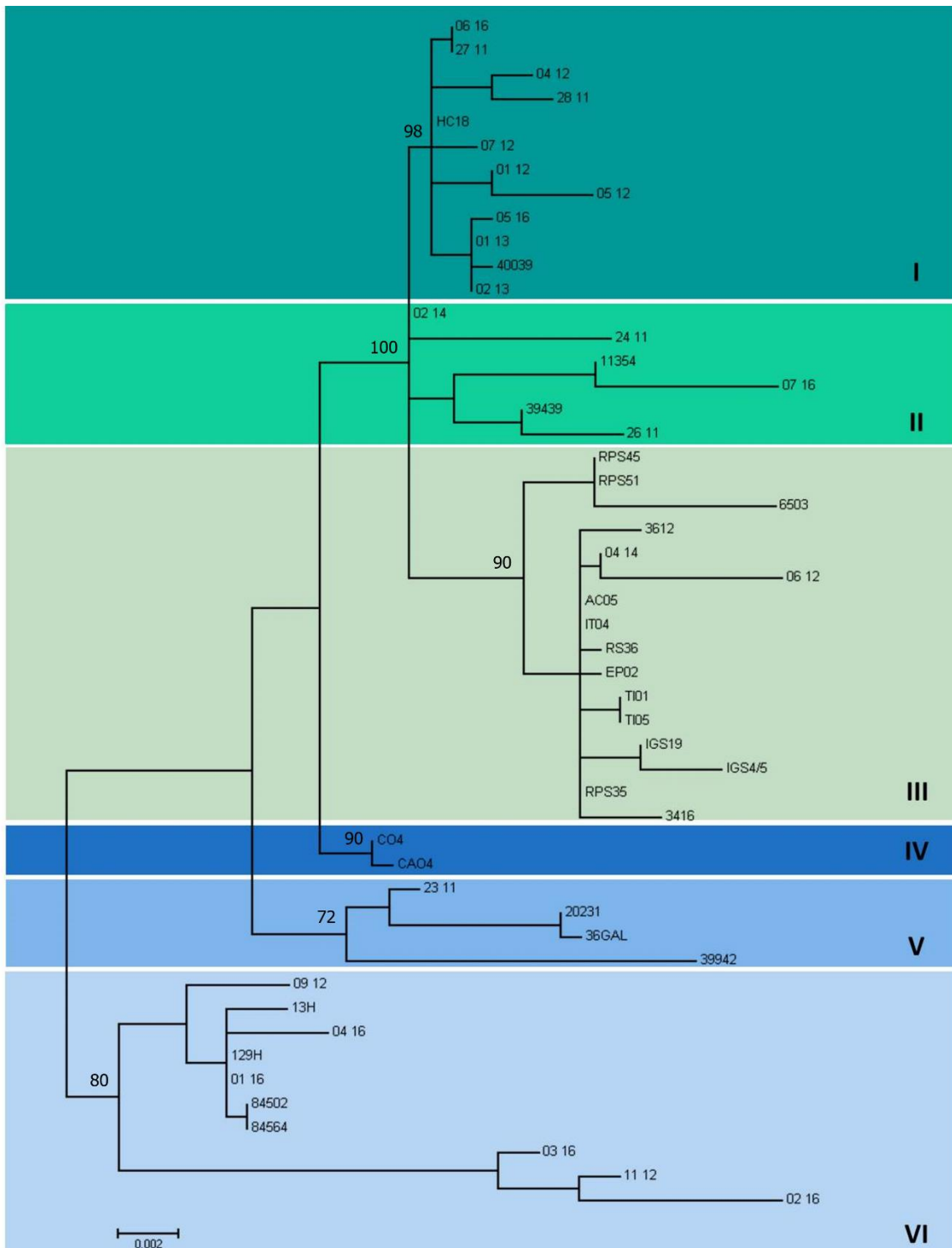


Figura 22: Relações filogenéticas entre os 50 isolados empregados no estudo. Análise baseada na combinação dos quatro *loci*, utilizando o método de Maximum Likelihood. Inferência realizada no *software* MEGA (Versão 10.), utilizando bootstrap de 1.000 réplicas, sendo o tamanho dos ramos proporcionais à distância. A determinação dos clados (cores) foi realizada utilizando percentuais acima de 70%.

Posteriormente, a sequência linear dos quatro genes concatenados foi submetida à uma análise de relações filogenéticas frente a sequências depositadas no GENBANK, oriundas de diversos países. Foram selecionadas além das 50 sequências oriundas do presente estudo, 238 sequências previamente depositadas. Dessa maneira, observou-se que 16 isolados demonstraram relações filogenéticas com amostras pertencentes a outros clados previamente descritos.

Cinco isolados (20231, 36GAL, 23/11, 11354 e 07/16) se agruparam no clado filogenético Unknown1; três isolados (03/16, 11/12 e 02/16) se agruparam no clado LAmB1; um isolado (39942) se agrupou no clado Panamá e sete isolados (09/12, 04/16, 129H, 01/16, 84502, 84564 e 13H) se agruparam no clado Northeast.

Os demais 34 isolados se agruparam no clado descrito recentemente por Teixeira e colaboradores (2016) denominado RJ, demonstrando relações filogenéticas com outros isolados oriundos do estado do Rio de Janeiro, cujas sequências já tinham sido previamente depositadas no GENBANK.

O clado RJ agrupou um total de 58 isolados, dentre os quais, 24 já tinham sido previamente depositados e 34 isolados do presente estudo. Dentre os 34 isolados agrupados do presente estudo, 18 isolados são de origem clínica, 5 de origem animal e além desses, também agrupou os onze isolados de origem ambiental.

Ao observar as trajetórias evolutivas dos isolados pertencentes a esse clado, é possível destacar que embora o clado RJ seja um clado grande, com principal origem monofilética, engloba outros clados menores, os quais também se originam monofileticamente. No entanto, para determinação da população RJ, observamos o ramo principal, que se divide junto ao clado LAmA1 (Figura 23).

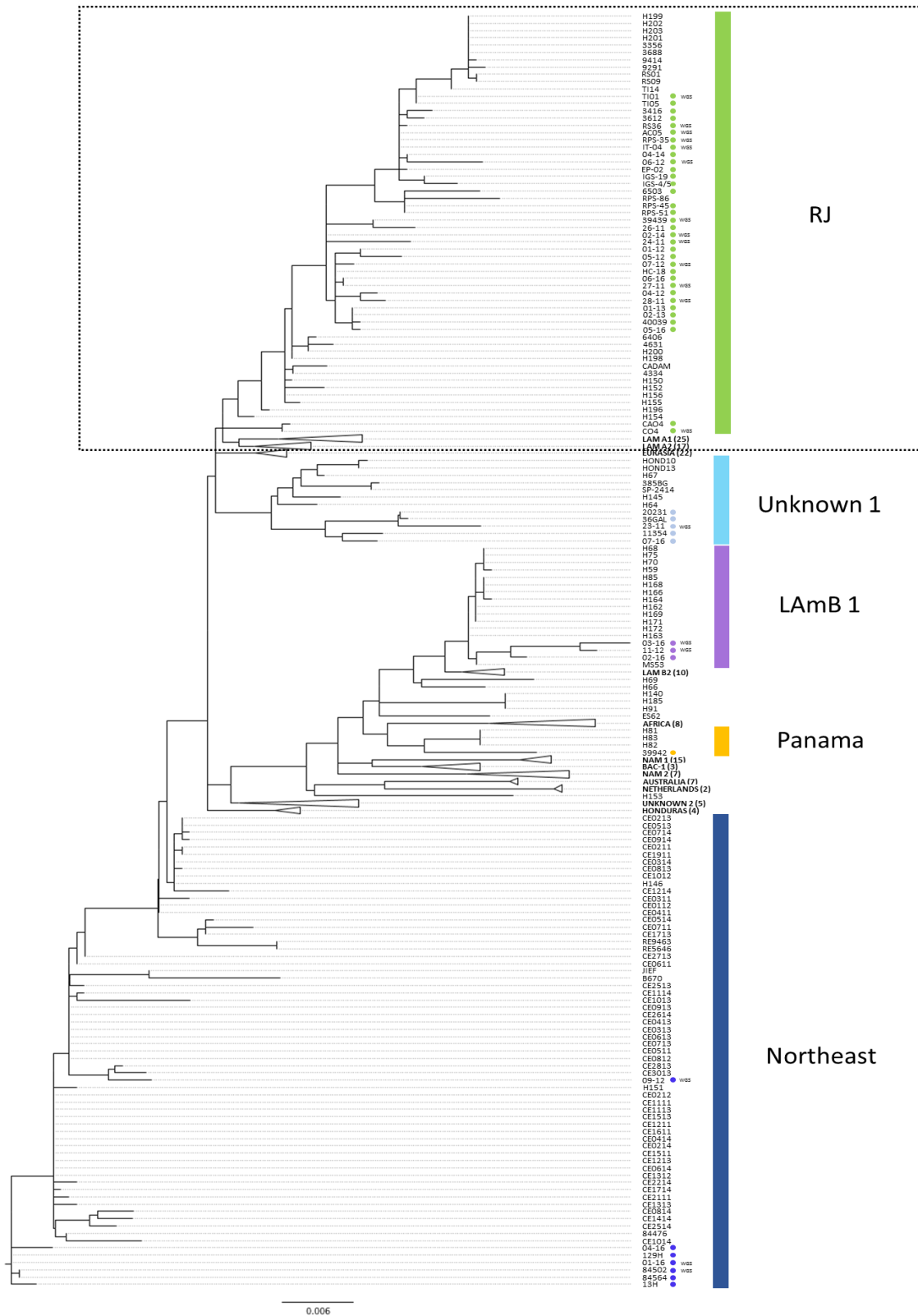


Figura 23 - Relações filogenéticas dos 50 isolados estudados (círculos) utilizando o método *Maximum Likelihood*, no *Software* IQTREE. Análise baseada nos quatro *loci* concatenados, frente às 238 sequências de *H. capsulatum* depositadas no GENBANK, evidenciando o agrupamento dos isolados do Rio de Janeiro no clado RJ em outros clados (LAMB1, Unknown1, Panama e Northeast/Nordeste) previamente descritos na literatura (Teixeira et al., 2016).

As análises por MLST também permitiram determinar a variabilidade nucleotídica dentro de cada fragmento de gene estudado. Foi observado que no fragmento do gene *arf*, o qual compreende parcialmente os éxons I e II e o íntron I completo, 8 regiões polimórficas são encontradas no éxon I entre as posições 1 e 79, sendo a posição 63 a que possui o maior número de variações nucleotídicas. Já no íntron I, observa-se 24 posições polimórficas, sendo as posições 147 e 196 as que mais apresentam variação nucleotídica, e no éxon II, entre as sete posições polimórficas, a posição 374 é a que mais apresenta variabilidade nucleotídica (Figura 24).

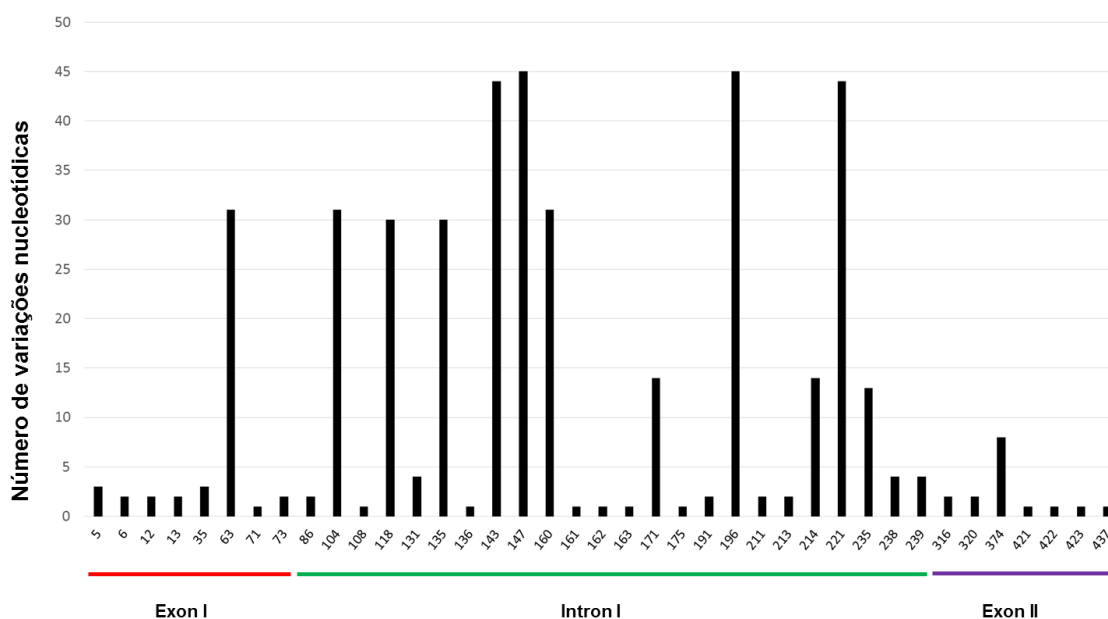


Figura 24 – Variações nucleotídicas (n=39) no fragmento estudado do gene *arf*. A maior frequência de posições nucleotídicas polimórficas se encontra no íntron I.

O fragmento do gene *anti-H*, apresentou 44 posições polimórficas, distribuídas entre o éxon I (parcial), íntron I, éxon II e íntron II (completos) e éxon III (parcial), dentre as quais, as posições 18 e 24 são as duas que mais apresentam variação nucleotídica no éxon I. No íntron I, as posições 124 e 149 são as que mais polimórficas, ao passo que no éxon II, a posição 243 é a posição que mais se destaca. Já no íntron II e éxon III, as posições que mais apresentam variação nucleotídica são as 364 e 394, respectivamente (Figura 25).

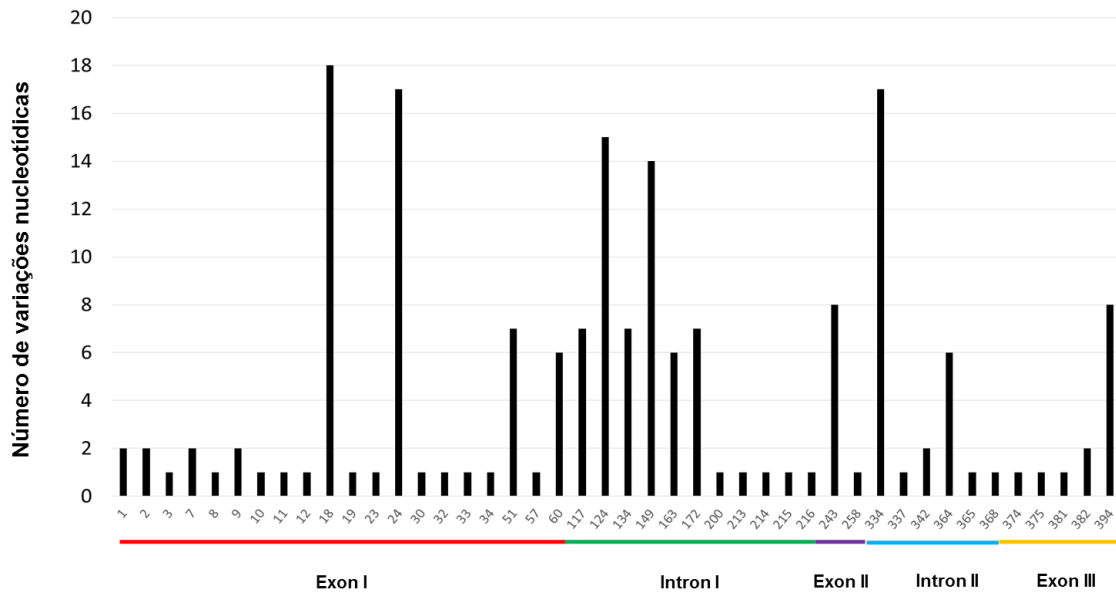


Figura 25 – Variação nucleotídica (n=44) no fragmento estudado do gene *H-anti*. Distribuição entre o éxon I, íntron I, éxon II, Íntron II e éxon III. Observando que as maiores variações nucleotídicas ocorrem no éxon I.

No fragmento do gene *ole* foram observadas 21 posições nucleotídicas polimórficas, distribuídas entre o éxon I, íntron e éxon II. No éxon I, as posições 12 e 47 são as duas que mais apresentam variação nucleotídica. No íntron I, os maiores números de variações nucleotídicas foram observados nas posições 290, 292 e 360, ao passo que no éxon II, as duas posições correspondentes (408 e 409), apresentaram a mesma quantidade de variação nucleotídica (Figura 26).

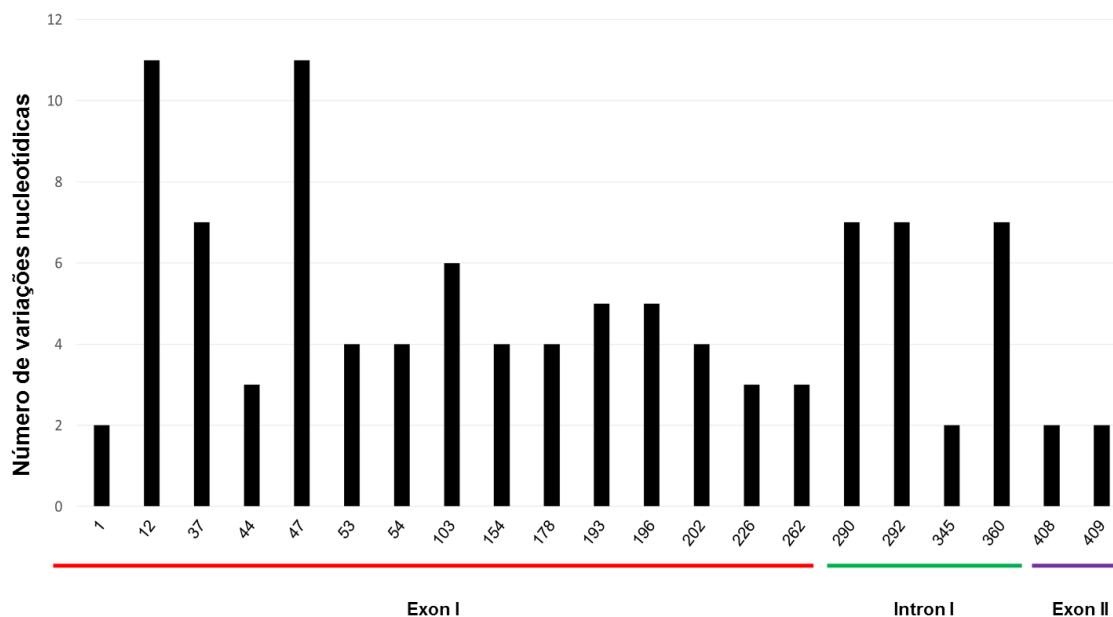


Figura 26 – Variação nucleotídica ($n=21$) no fragmento estudado do gene *ole*. Distribuição entre o éxon I, íntron I e éxon II. Observando que as maiores variações nucleotídicas do éxon I ocorrem nas posições 12 e 47, no íntron I, ocorrem nas posições 290, 292 e 360 e no éxon II, ocorrem de igual maneira nas posições 408 e 409.

No fragmento parcial do gene *tub*, foram observadas 21 posições nucleotídicas polimórficas, distribuídas entre o éxon I, íntron I, éxon II e íntron II. No éxon I, a posição 17 foi a posição que apresentou maior variação nucleotídica, ao passo que no íntron I, a posição 105 foi a que mais se destacou, apresentando não só a maior variação nucleotídica dessa região, como de todo o fragmento. No éxon II, quatro posições se destacaram, apresentando as maiores variações, 133, 139, 177 e 210, sendo a penúltima, a que mais contém variação. No íntron II as posições 221 e 225 apresentaram o mesmo número de variações nucleotídicas (Figura 27).

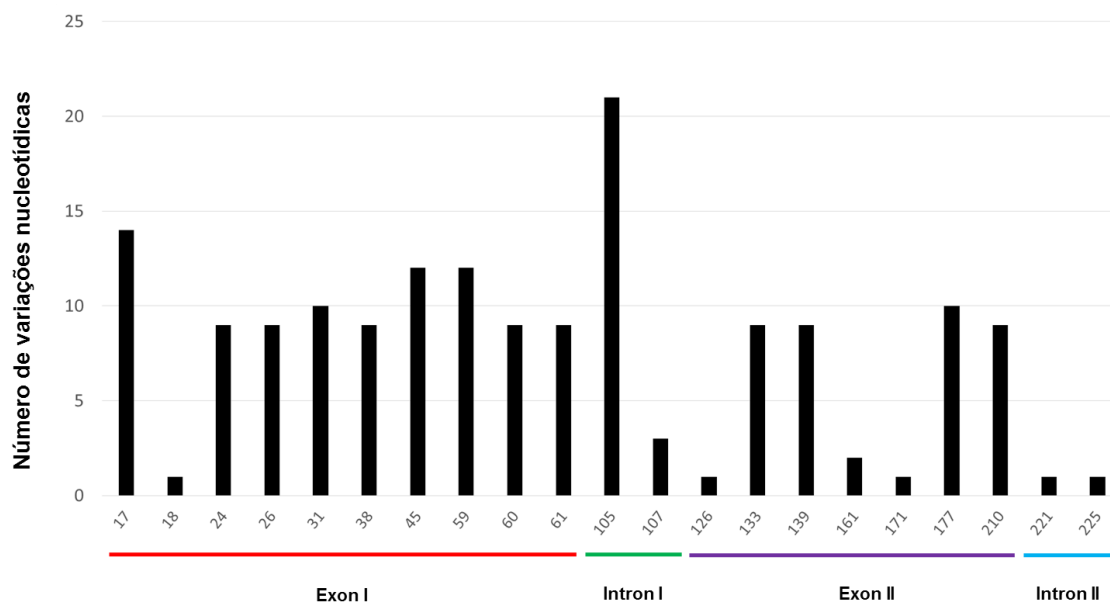


Figura 27 – Variação nucleotídica ($n=21$) no fragmento estudado do gene *tub*. Distribuição entre o éxon I, íntron I e éxon II e íntron II. Observando que as maiores variações nucleotídicas do éxon I ocorrem nas posições 17, no íntron I, ocorre na posição 105, no éxon II, ocorrem nas posições 133, 139, 177 e 210, sendo a posição 177 com um número levemente maior e no íntron II, ocorre de igual maneira nas posições 221 e 225.

6.3.3 Diversidade Haplótipica

Dentro de cada clado observado na análise realizada pela técnica de MLST, foi realizada uma análise de diversidade haplotípica. Nessa análise, além dos isolados do presente estudo, foram utilizadas as sequências dos isolados que também se agruparam nos respectivos cladros previamente descritos (TEIXEIRA et al., 2016). Dessa forma, foi possível observar os índices de diversidade dentro cada clado. O clado LAmB1 agrupou um total de 17 isolados divididos em nove haplótipos, sendo o haplótipo cinco com cinco isolados, os haplótipos um e três com três isolados cada e o outros seis haplótipos com um isolado cada. Ainda no clado LAmB1, observou-se o agrupamento de quatro isolados de origem brasileira (02/16, 03/16, 11/12 do estado do Rio de Janeiro e MS53 de Mato Grosso), quatro isolados de origem colombiana (três de Medellín e um de Bogotá), sendo majoritariamente composto por nove isolados de origem argentina (Figura 28A e Tabela 5).

No clado Unknown 1, observou-se o agrupamento de 12 isolados, distribuídos em 11 haplótipos, dos quais apenas o haplótipo oito agrupou dois isolados. Todos os outros 10 haplótipos incluíram somente 1 isolado. Os haplótipos Hap8, Hap9, Hap10 e Hap11 englobaram 5 isolados oriundos da

população incluída neste estudo, isolados 20231, 36GAL, 23/11,11354 e 07/16 respectivamente. Os outros isolados são oriundos de Honduras, um de origem Colombiana, um do Mato Grosso, um de São Paulo e um do Suriname (Figura 28B e Tabela 6).

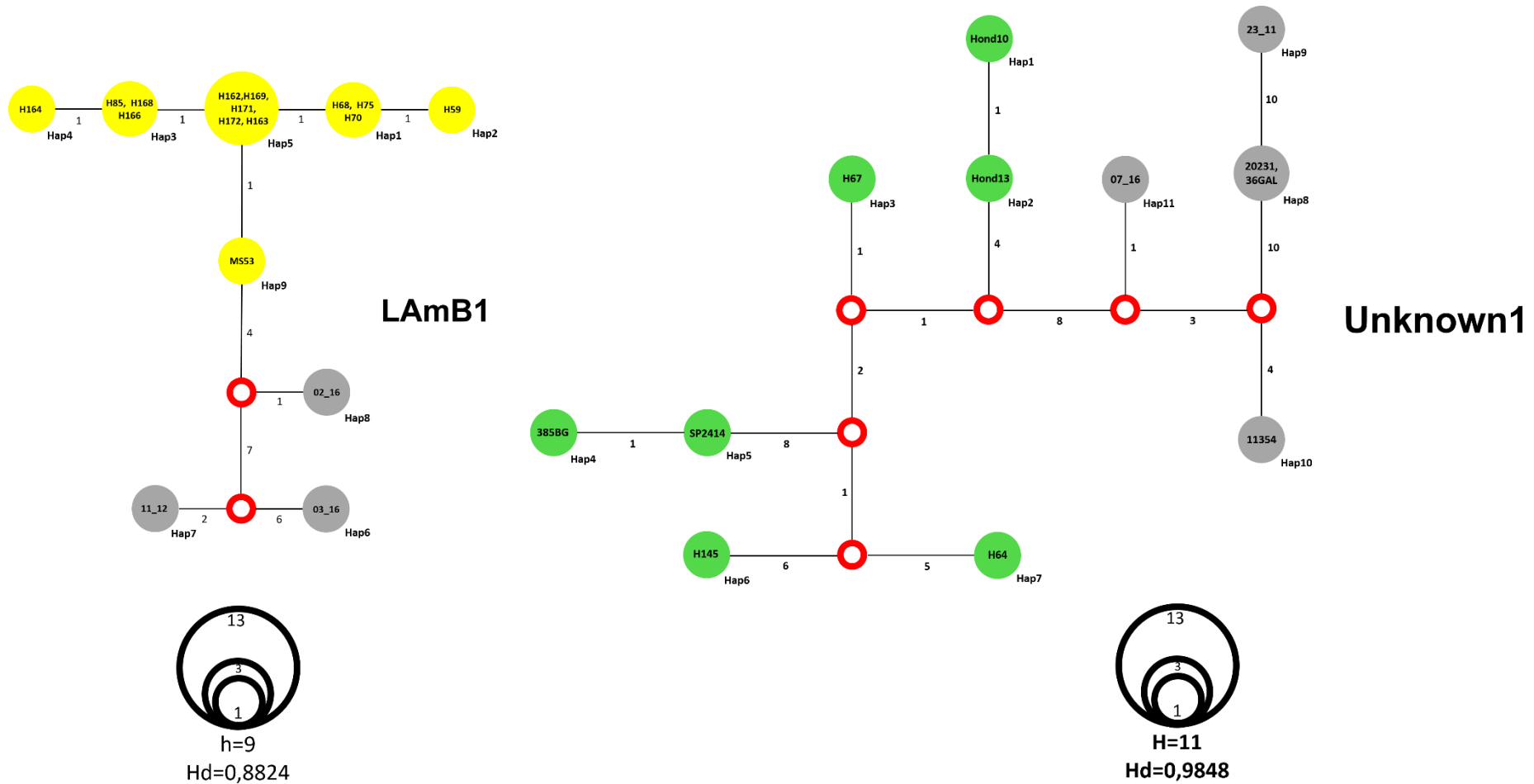


Figura 28 - Rede haplotípica dos clados LAmB1 (Amarelo) e Unknown1 (Verde). (A) – Agrupamento de 17 isolados distribuídos em 9 haplótipos, dos quais, 3 (6, 7 e 8) são isolados do Rio de Janeiro, tendo o clado uma diversidade haplotípica de 0,8824. (B) – Agrupamento de 12 isolados distribuídos em 11 haplótipos, dos quais, 4 (8, 9, 10 e 11) são isolados do Rio de Janeiro, tendo o clado uma diversidade haplotípica de 0,9848. Hap = Haplótipo; Números entre as linhas = número de mutações entre os haplótipos; Círculo vermelho = Median vector (ancestral hipotético); Diâmetro = Frequência de haplótipos. O número de mutações entre cada haplotipo é mostrado em cada correspondente vértices. Amostras isoladas no Rio de Janeiro representadas em cinza.

Tabela 5 – Isolados agrupados no clado LAmB1 distribuídos em nove haplótipos

Hap	Nº isolados	Identificação	Origem
1	3	H68, H75 e H70	Medellin – Colômbia
2	1	H59	Bogotá - Colômbia
3	3	H85, H168 e H166	Argentina
4	1	H164	Argentina
5	5	H162, H169, H171, H172 e H163	Argentina
6	1	INI 03/16	Rio de Janeiro-BR
7	1	IPEC 11/12	Rio de Janeiro-BR
8	1	INI 02/16	Rio de Janeiro-BR
9	1	MS53	Mato Grosso - BR

Legenda: BR = Brasil, IPEC = Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, INI = Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Hap = Haplótipo.

Tabela 6 – Isolados agrupados no clado Unknown1 distribuídos em onze haplótipos.

Hap	Nº isolados	Identificação	Origem
1	1	Hond10	Honduras
2	1	Hond13	Honduras
3	1	H67	Medellin - Colômbia
4	1	385BG	Mato Grosso - BR
5	1	SP2414	São Paulo
6	1	H145	Suriname
7	1	H64	Bogotá - Colômbia
8	2	20231 e 36GAL	Rio de Janeiro - BR
9	1	IPEC 23/11	Rio de Janeiro - BR
10	1	11354	Rio de Janeiro - BR
11	1	INI 07/16	Rio de Janeiro - BR

Legenda: BR = Brasil, IPEC = Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, INI = Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Hap = Haplótipo.

Os clados RJ e Nordeste são os clados que possuem o maior número de isolados agrupados. O clado RJ possui um agrupamento de 58 isolados, dos quais, apenas seis foram isolados no estado de São Paulo e foram agrupados nos haplótipos Hap38, Hap39, Hap41, Hap42 e Hap44, sendo todos os outros 38 isolados pertencentes ao estado do Rio de Janeiro, agrupados em 27 haplótipos) revelando que a população RJ apresenta alta variabilidade genética, com o maior índice de diversidade haplotípica (H_d) entre os clados/populações estudadas (Figura 29 e Tabela 7).

O clado Nordeste possui um agrupamento de 64 isolados, sendo oito oriundos do Rio de Janeiro, dos quais, seis são do presente estudo agrupados no haplótipos Hap33, Hap34, Hap35 e Hap36, além de outros dois isolados previamente depositados no GenBank (Hap 17 e Hap 32), um isolado de São Paulo (Hap25) e dois (Hap13) do estado de Pernambuco, sendo os demais 53 isolados, oriundos do estado do Ceará, agrupados em 28 haplótipos, revelando que a população NE apresenta a segunda mais alta diversidade haplotípica entre os clados/populações estudadas (Figura 30 e Tabela 8).

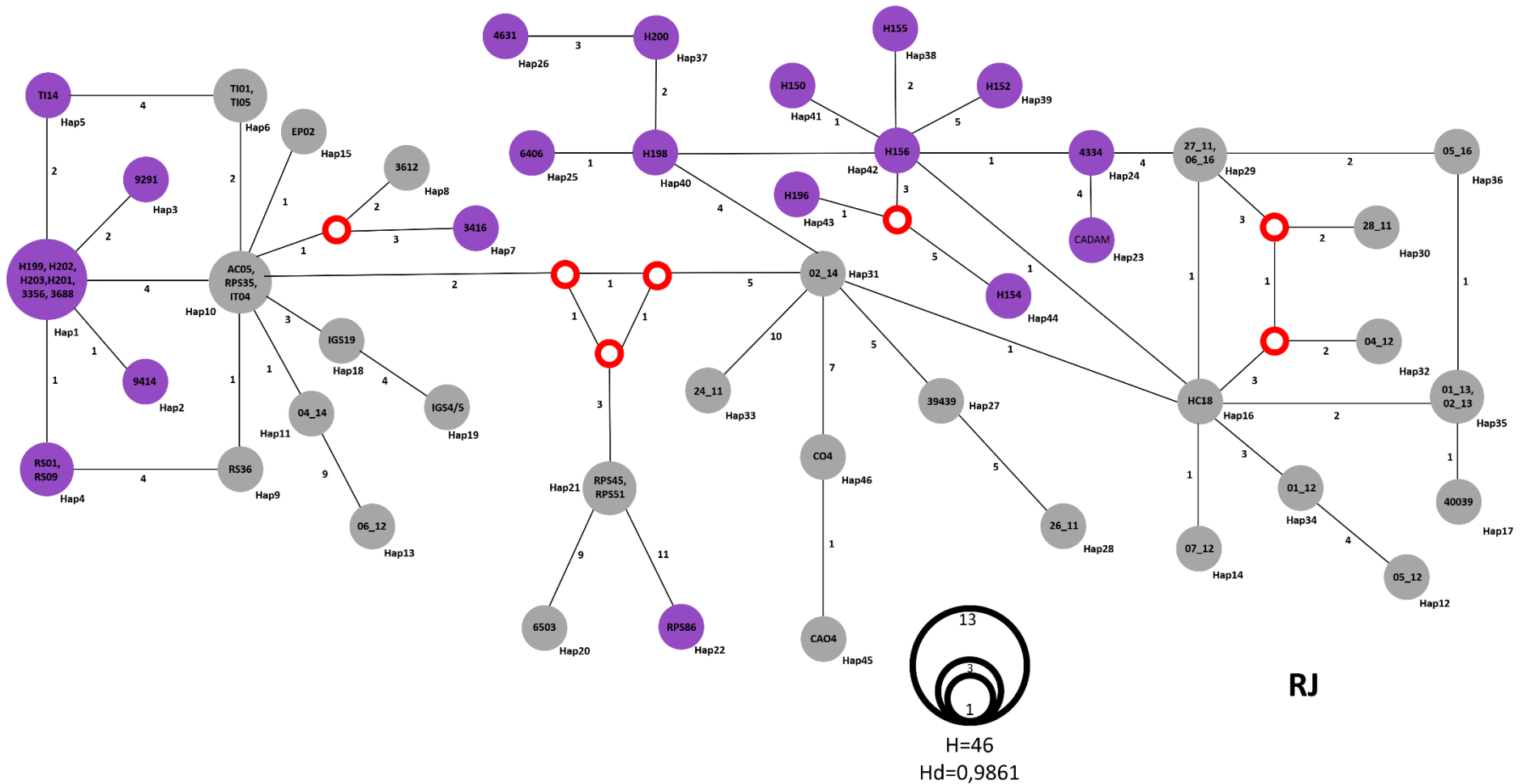


Figura 29 - Rede haplotípica do clado RJ composto por 58 isolados. Distribuição em 46 haplótipos, dos quais 31 são formados por amostras do presente estudo (Cinza) e 20 formados por amostras previamente depositadas no GENBANK (lilás), sendo os haplótipos 38, 39, 41, 42 e 44 formados por amostras isoladas no estado de São Paulo. Diversidade haplotípica de 0,9861. Hap = Haplótipo; Números entre as linhas = número de mutações entre os haplótipos; Círculo vermelho = Median vector (ancestral hipotético); Diâmetro = Frequência de haplótipos. O número de mutações entre cada haplótipo é mostrado em cada correspondente vértice.

Tabela 7 – Isolados grupados no clado RJ distribuídos em 46 haplótipos

Hap	Nº isolados	Identificação	Origem
1	6	H199, H202, H203, H201, 3356 e 3688	Rio de Janeiro - BR
2	1	9414	Rio de Janeiro - BR
3	1	9291	Rio de Janeiro - BR
4	2	RS01 e RS09	Rio de Janeiro - BR
5	1	TI14	Rio de Janeiro - BR
6	2	TI01 e TI05	Rio de Janeiro - BR
7	1	3416	Rio de Janeiro - BR
8	1	3612	Rio de Janeiro - BR
9	1	RS36	Rio de Janeiro - BR
10	3	AC05, RPS35 e IT04	Rio de Janeiro - BR
11	1	IPEC 04/14	Rio de Janeiro - BR
12	1	IPEC 05/12	Rio de Janeiro - BR
13	1	IPEC 06/12	Rio de Janeiro - BR
14	1	IPEC 07/12	Rio de Janeiro - BR
15	1	EP02	Rio de Janeiro - BR
16	1	HC18	Rio de Janeiro - BR
17	1	40039	Rio de Janeiro - BR
18	1	IGS19	Rio de Janeiro - BR
19	1	IGS4/5	Rio de Janeiro - BR
20	1	6503	Rio de Janeiro - BR
21	2	RPS45 e RPS51	Rio de Janeiro - BR
22	1	RPS86	Rio de Janeiro - BR
23	1	CADAM	Rio de Janeiro - BR
24	1	4334	Rio de Janeiro - BR
25	1	6406	Rio de Janeiro - BR
26	1	4631	Rio de Janeiro - BR
27	1	39439	Rio de Janeiro - BR
28	1	IPEC 26/11	Rio de Janeiro - BR
29	2	IPEC 27/11 e INI 06/16	Rio de Janeiro - BR
30	1	IPEC 28/11	Rio de Janeiro - BR
31	1	IPEC 02/14	Rio de Janeiro - BR
32	1	IPEC 04/12	Rio de Janeiro - BR
33	1	IPEC 24/11	Rio de Janeiro - BR
34	1	IPEC 01/12	Rio de Janeiro - BR
35	2	IPEC 01/13 e IPEC 02/13	Rio de Janeiro - BR
36	1	05_16	Rio de Janeiro - BR
37	1	H200	Rio de Janeiro - BR
38	1	H155	São Paulo - BR
39	1	H152	São Paulo - BR
40	1	H198	Rio de Janeiro - BR
41	1	H150	São Paulo - BR
42	1	H156	São Paulo - BR
43	1	H196	Rio de Janeiro - BR
44	1	H154	São Paulo - BR
45	1	CAO4	Rio de Janeiro - BR
46	1	CO4	Rio de Janeiro - BR

Legenda: AC = Aldeia curumin, BR = Brasil, CADAM = Cadela amarela, RS = Roedor silvestre, IGS = Ilha Grande Solo, IPEC = Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, INI = Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, RPS = Rio da Prata Solo, IT = Itaguaí = TI = Tinguá

Tabela 8 – Isolados grupados no clado Nordeste distribuídos em 36 haplótipos

Hap	Nº isolados	Identificação	Origem
1	2	CE0213 e CE0513	Ceará - BR
2	1	CE0714	Ceará - BR
3	1	CE0914	Ceará - BR
4	2	CE0211 e CE1911	Ceará - BR
5	3	CE0314, CE1012 e H146	Ceará - BR
6	1	CE0813	Ceará - BR
7	2	CE0112 CE041	Ceará - BR
8	1	CE1214	Ceará - BR
9	1	CE0514	Ceará - BR
10	1	CE1713	Ceará - BR
11	1	CE0711	Ceará - BR
12	1	CE0311	Ceará - BR
13	2	RE9463 e RE5646	Pernambuco - BR
14	2	CE2713 e CE0611	Ceará - BR
15	1	CE1114	Ceará - BR
16	1	JIEF	Ceará - BR
17	1	B670	Rio de Janeiro - BR
18	9	CE2513, CE0913, CE2614, CE0413, CE0511, CE0613, CE0713, CE0812 e CE0313	Ceará - BR
19	12	CE0614, CE1213, CE1511, CE0212, CE1111, CE1113, CE1211, CE1513, CE0414, CE0214, CE1312 e CE2111	Ceará - BR
20	1	CE1714	Ceará - BR
21	1	CE2813	Ceará - BR
22	1	CE3013	Ceará - BR
23	1	CE1013	Ceará - BR
24	1	IPEC 09/12	Ceará - BR
25	1	H151	São Paulo - BR
26	1	CE2214	Ceará - BR
27	1	CE1313	Ceará - BR
28	1	CE0814	Ceará - BR
29	1	CE1414	Ceará - BR
30	1	CE2514	Ceará - BR
31	1	CE1014	Ceará - BR
32	1	84476	Rio de Janeiro - BR
33	1	INI 04/16	Rio de Janeiro - BR
34	2	129H e INI 01/16	Rio de Janeiro - BR
35	2	84502 e 84564	Rio de Janeiro - BR
36	1	13H	Rio de Janeiro - BR

Legenda: BR = Brasil, CE = Ceará, INI = Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, IPEC = Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

Quando comparamos os índices de diversidade haplotípica nas 4 populações estudadas foi observado o mais alto no clado RJ confirmando a grande diversidade nesta população, sendo inclusive mais diversa que a população Nordeste, a qual já foi previamente analisada e que também apresentou uma grande diversidade haplotípica (DAMASCENO et al., 2019) (Tabela 9).

Tabela 9: Índices de diversidade haplotípica dos clados RJ, Nordeste, Unknown1 e LAmB1

CLADO	Número de Isolados	Número de Haplótipos	Índice de diversidade haplotípica (Hd)
RJ	58	46	0,9861
Nordeste	64	36	0,9444
Unknown1	12	11	0,9848
LAmB1	17	9	0,8824

O esquema de análise por MLST também permitiu diferenciar filogeneticamente duas amostras oriundas de um mesmo paciente natural da região Nordeste do país e diagnosticado no INI, sendo o isolado 04/16 proveniente de uma amostra de escarro e o isolado 05/16 de fragmento de gânglio obtido por biópsia e. O isolado 04/16 se agrupou no clado Northeast ao passo que o isolado 05/16 se agrupou no clado RJ. Além disso, o MLST também permitiu evidenciar que as amostras que se agruparam nos clados Northeast e LAmB1 foram as mesmas que se agruparam na análise genômica (a ser descrita a seguir), evidenciando uma concordância entre as duas metodologias de análise de diversidade genética.

6.4 Análises filogenômicas

Para as análises filogenômicas, foram sequenciados 18 genomas dentre os 50 isolados estudados e sequenciados para a técnica de MLST. Para essa análise, foi utilizado um genoma (*H. mississippiense* – NAm1, Cepa Downs) de referência para ao alinhamento inicial. Comparando os genomas dos 18 isolados sequenciados (AC05, IT04, RS36, TI01, INI 03/16, 39439, CO4,

RPS35, INI 01/16, IPEC 09/12, IPEC 23/11, IPEC 07/12, IPEC 28/11, IPEC 24/11, IPEC 02/14, IPEC 11/12, IPEC 27/11, IPEC 06/12), com os 30 genomas depositados no GENBANK, foram identificadas 2.011,009 mutações na matriz final de SNP, na qual, 116.549 possuíam padrões distintos, 1.470,938 foram parcimônia-informativa e 540,071 foram consideradas como singletons (mutações encontradas em um único indivíduo).

Após a análise inicial, na qual foi observada a diversidade nucleotídica, foi gerada uma árvore não enraizada, a qual claramente demonstra a presença de oito clados, da seguinte forma: RJ, Colombia, Northeast Brazil (BR), Africa, *H. capsulatum* (Panama), Lam B1, *H. ohiensi* (Nam 2) e *H. mississippiense* (NAm 1).

Os isolados MZ5 da Colômbia e 27/14 parecem ter sua própria trajetória evolutiva. Os clados RJ, Colombia, Northeast (BR) e a linhagem MZ5 compartilham um ancestral comum e estão limitadas ao continente sul-americano. Já o clado LAmB1 está sendo relatado pela primeira vez por meio de análise filogenômica e está intimamente relacionado com a espécies norte-americanas de *Histoplasma*: *H. ohiense* e *H. mississippiense* (Figura 31).

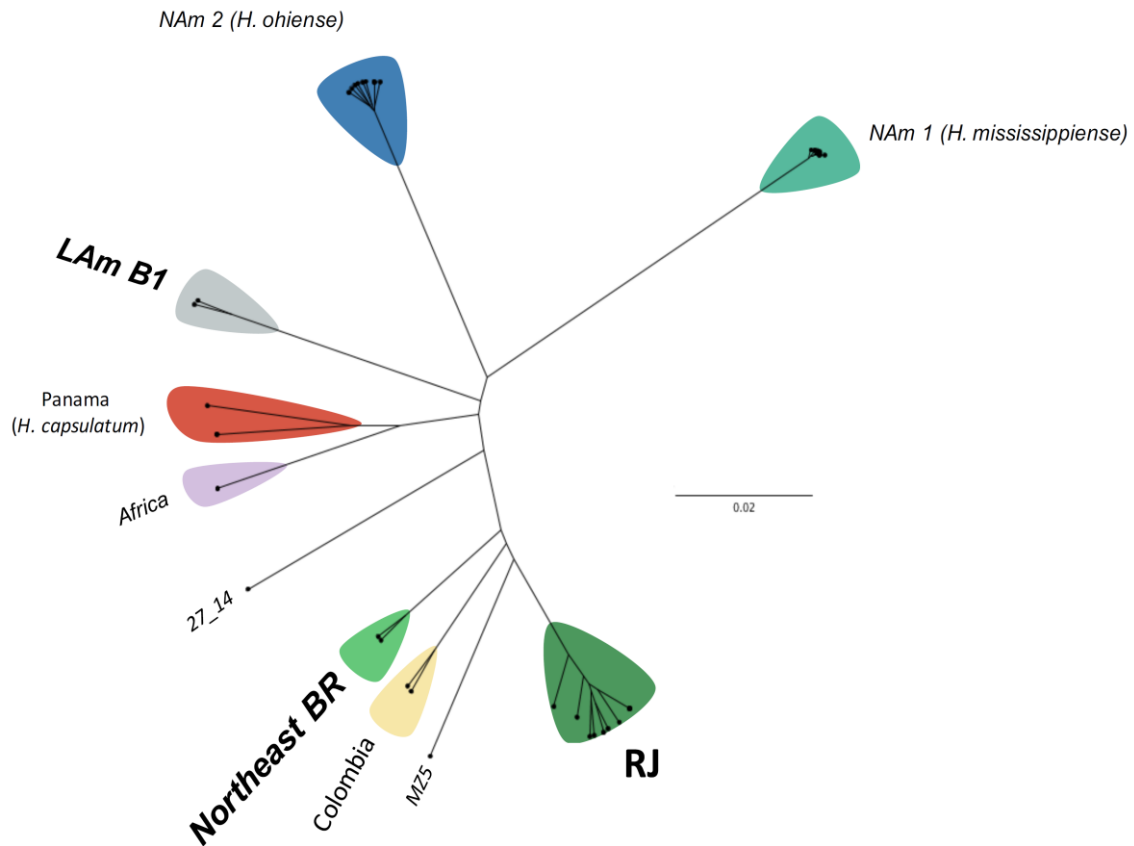


Figura 31 – Análises filogenômicas entre os 18 isolados frente a 30 genomas depositados no GENBANK evidenciando a existência de oito clados (*H. mississippiense*, *H. ohiense*, LAmB1, Panama, Africa, Northeast BR e RJ) além das linhagens colombianas 27_14 e MZ5, onde os clados Northeast BR, Colombia, RJ e a linhagem MZ5 possuem uma ancestralidade comum.

A singularidade genética da população do RJ também foi confirmada por dois métodos de análise de estrutura populacional. O método fastSTRUCTURE (FastSTRC), no qual os valores da verossimilhança marginal coletados simularam até dez populações ($K = 2$ a $K = 10$), sugeriram que o conjunto de dados possui 5 populações principais de *Histoplasma*, distribuídos da seguinte forma: (1) *Histoplasma suramericanum* (clados RJ, Colômbia Nordeste e linhagem MZ5); (2) *H. capsulatum sensu stricto* (Panamá) e África; (3) LAmB1; (4) *H. ohiense* e (5) *H. mississippiense*.

A análise dos gráficos pelo fastSTRUCTURE demonstra que a população RJ é composta por linhagens homozigóticas, ao passo que as linhagens colombianas (MZ5, 21_14 e 3_11) e Nordeste (INI 01/16 e IPEC 09/12) são compostas por genótipos mistos entre RJ e *H. capsulatum sensu stricto* (Panamá) (Figura 32).

A ancestralidade individual também foi determinada pelo *software* ADMIXTURE e a partir de $K = 5$, também revelou um padrão similar em que a população do RJ permaneceu homocigótica. Como o algoritmo ADMIXTURE permite a implementação de linhagens homocigóticas, foi explorado a distribuição populacional permitindo que 10 populações ($K = 10$) representassem os oito clados filogenômicos (Figura 32), assim como as duas linhagens crípticas MZ5 e 27_14.

A estrutura populacional geral foi mantida e poucos grupos adicionais foram observados: (1) A população do RJ foi dividida em dois grupos: RJ ambiental e RJ clínico; (2) A linhagem MZ5, o clado colombiano (21_14 e 3_11) e Nordeste foram divididos em grupos únicos e (3) *H. capsulatum sensu stricto* e África também foram divididos em linhagens separadas e (4), a linhagem críptica 27_14 foi incorporada na população de *H. capsulatum sensu stricto* (Figura 32).

Por fim, foi avaliado a distribuição genética por meio da Análise de Coordenadas Principais (PCA) e cinco agrupamentos distintos foram destacados com a estrutura populacional similar à análise fastSTRC, utilizando $K = 5$. Os clados RJ, Nordeste e *H. capsulatum sensu stricto* / LAmB1 / África são separados do *H. mississippiense* ao longo do eixo PC1, responsável por 54% da variação total. Por outro lado, PC2 *H. ohioense* e *H. mississippiense* são lanceados pelo eixo PC2 que explica 46% da variação total (Figura 33).

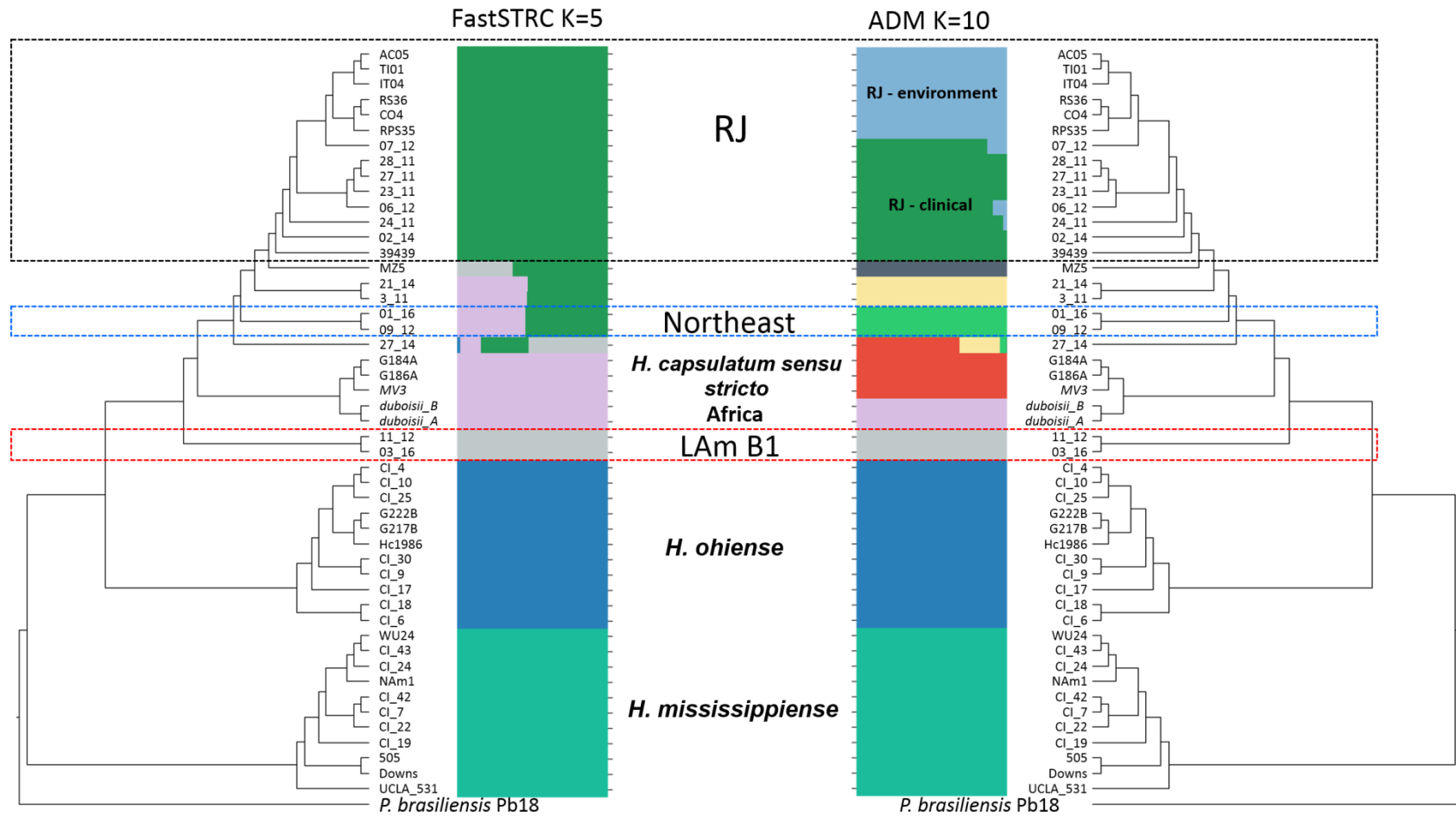


Figura 32 - Estrutura populacional baseada nas análises filogenômicas. Constatação da origem monofilética do clado RJ, além de cinco populações inferidas pelo *software* FastSTRC, na qual a população RJ possui uma linhagem monofilética e homocigótica. Na análise pelo *Software Admixture*, também se observa a linhagem monofilética da população RJ, além da evidência de uma população de isolados de origem clínica e uma população de isolados de origem ambiental, caracterizando indivíduos heterocigotos. Além do agrupamento de isolados da população RJ, observa-se isolados que se agrupam em outras populações, como Northeast (azul) e LAmB1 (vermelho).

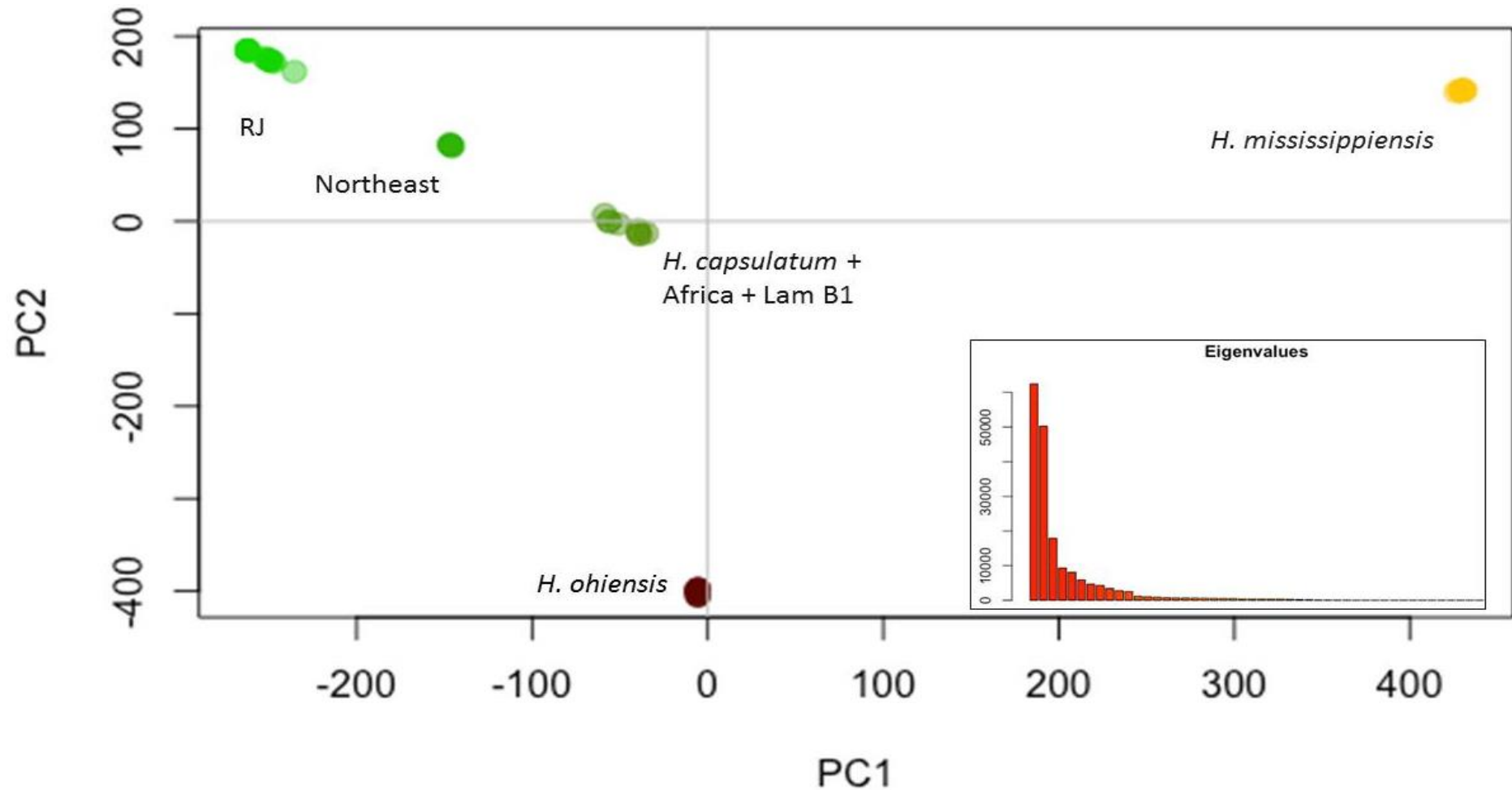


Figura 33 - Distribuição genética por meio da análise dos componentes principais. Evidência de cinco agrupamentos distintos (representados pelas cores verde, amarela e marrom), no qual as populações RJ, Northeast, *H.capsulatum*+Africa+LAmB1, *H. ohioensis* e *H. mississippiensis* se distribuem de maneira separada ao longo dos eixos x e y PC1 e PC2. Eigenvalues: razão da importância explicativa dos fatores em relação às variáveis.

6.5 Ensaios de Virulência

Para a etapa dos ensaios de virulência, foram selecionados cinco isolados de origem clínica, um isolado de cada clado nos quais as amostras estudadas se agruparam. Os isolados pertencem a diferentes clados gerados por MLST: INI 01/16 Nordeste, INI 03/16 LAmB1, 39942 Panamá, IPEC 23/11 Unknown1 e IPEC 28/11 RJ. Ao realizarmos experimentos de interação entre isolados clínicos e macrófagos (RAW 264.7), observamos diferentes percentuais de interação entre os isolados estudados. O isolado INI 03/16 apresentou aproximadamente 80% de associação, enquanto o isolado IPEC 23/11 e a cepa padrão G217B (ATCC) apresentaram percentuais de associação em torno de 50% cada.

O isolado INI 01/16, apresentou cerca de 20% de taxa de associação, seguido pelo isolado IPEC 28/11, o qual apresentou apenas 10% de associação. O isolado 39942 apresentou menor associação com macrófagos. Dentre os isolados utilizados neste estudo, somente o isolado IPEC 28/11 não apresentou significância estatística quando comparado com a cepa G217B (Figura 34).

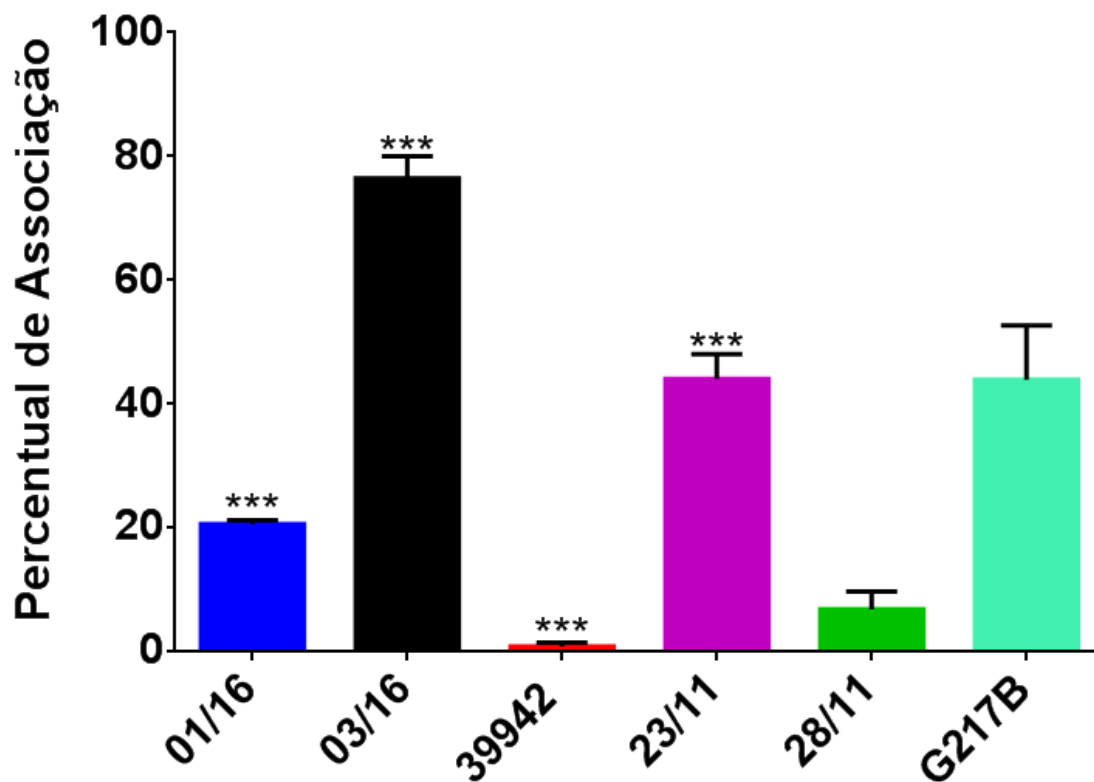


Figura 34 - Percentual de associação dos isolados estudados com macrófagos da linhagem RAW 264.7. As células previamente marcadas por NHS-Rodamina foram submetidas a interação com macrófagos respeitando o MOI 1:2. Após o tempo de 90 minutos os sistemas foram lavados por 3 vezes com PBS estéril, fixadas e recolhidas para análise por FACS. Diferentes percentuais de associação foram observados quando comparados com a cepa padrão G217B. Os experimentos foram repetidos por três vezes e as análises estatísticas foram obtidas pelo método ANOVA. $p \leq 0,001$ (***)

Os experimentos de capacidade fungicida após incubação dos isolados estudados com macrófagos da linhagem RAW 264.7, nos tempos de 2 horas e 24 horas, demonstraram diferentes comportamentos desses isolados após a fagocitose. Após duas horas de fagocitose, todos os isolados apresentaram uma média de 400 unidades formadoras de colônias, sendo a cepa padrão (G217B) a que apresentou uma contagem levemente maior. No tempo de duas horas, o isolado 39942 foi o único que apresentou significância estatística quando comparado com a cepa padrão G217B ($p \leq 0,05$).

Após o período de 24 horas, observamos uma diminuição na contagem dessas unidades, as quais tiveram seus números reduzidos em todos os isolados e nesse tempo de 24 horas, além do isolado 39942, os isolados 01/16 e 23/11 também apresentaram significância estatística quando comparadas com G217B ($p \leq 0,05$). Já nas comparações entre o mesmo isolado nos dois diferentes tempos, observamos que mais uma vez, apenas o isolado 39942 apresentou significância estatística (Figura 35).

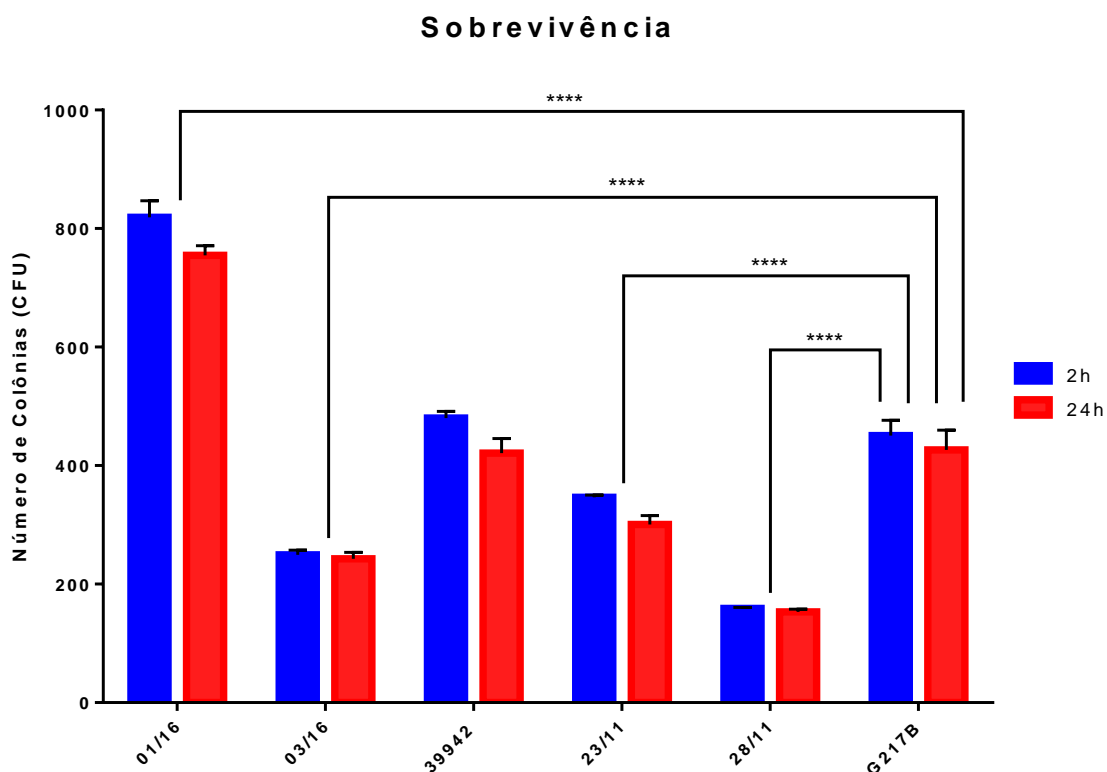


Figura 35 - Número de unidades formadoras de colônias após ensaio de fagocitose com macrófagos da linhagem RAW 264.7. Ensaio realizado respeitando o MOI 1:2 (macrófago/levedura). Após os períodos de 2 horas e 24 horas, os macrófagos foram lisados e 1×10^3 leveduras foram plaqueadas em BHI-Sangue 5% e incubados a 37°C por 10 dias. Diferentes contagens de CFU's foram observadas nos diferentes tempos quando comparados com a cepa padrão G217B. Os experimentos foram repetidos por três vezes e as análises estatísticas foram obtidas pelo método ANOVA. $p \leq 0,05$ (*).

Subsequentemente, realizamos o ensaio de virulência em larvas do modelo lepidóptero *G. mellonella*. A melanização das larvas começou a ser observada em um período de três horas após a infecção, pelo grupo inoculado com o isolado IPEC 28/11, o grupo que apresentou a melanização mais intensa entre os grupos estudados (Figura 36).

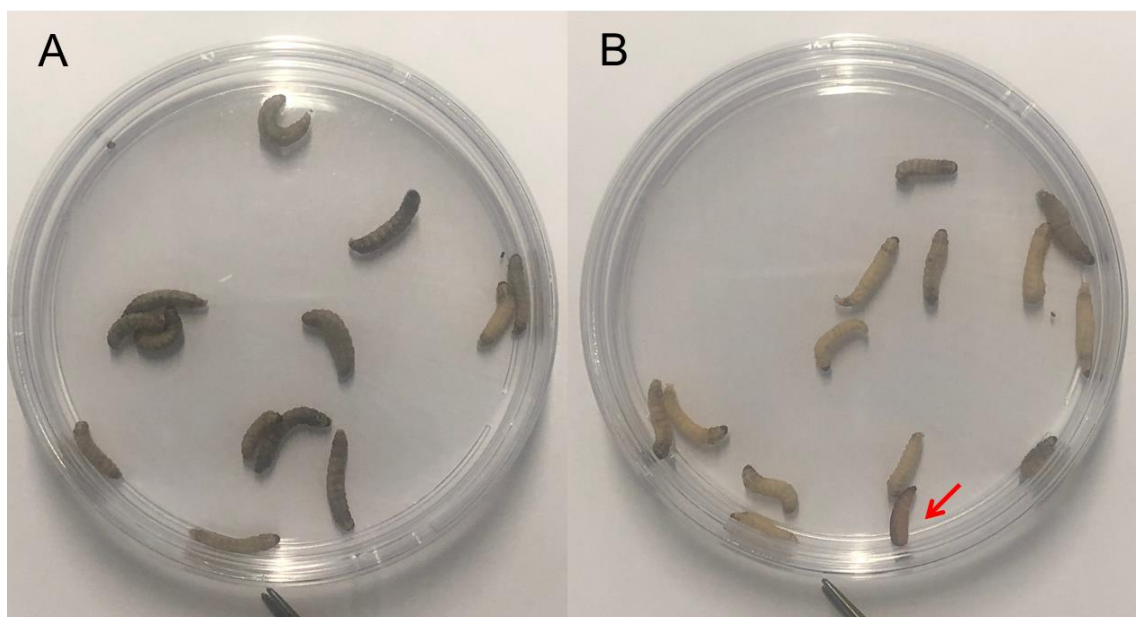


Figura 36 – Melanização das larvas infectadas. (A) Melanização das larvas do isolado IPEC 28/11, o qual apresentou uma intensa melanização após três dias de infecção (B) Larvas inoculadas com o isolado 01/16, apresentando menor grau de melanização após 10 dias de infecção, no entanto, apesar de menor melanização, observa-se larvas mortas (seta vermelha).

Entre os grupos de larvas infectadas com o inóculo fúngico de 1×10^6 , observou-se que nos grupos controles (Sham – não infectado e PBS) não houve morte após o período de 20 dias. No grupo inoculado com a cepa padrão G217B, mais de 20% dos indivíduos sobreviveram à infecção após o período de 20 dias. Dois isolados (IPEC 23/11 e INI 03/16), apresentaram uma taxa de sobrevivência semelhante, próximo a 80% após o período. O isolado 39942 apresentou a terceira mais alta taxa de morte, com um percentual de sobrevivência de 30% e os isolados 01/16 e 28/11 foram responsáveis por causar a maior taxa de morte entre os isolados, não havendo indivíduos resistentes à infecção após um período de 14 e 17 dias, respectivamente.

Os testes estatísticos demonstram significância estatística entre as curvas de sobrevivência pelo teste de Mantel Cox ($p < 0,0001$) e entre os

isolados que apresentaram as maiores taxas de mortalidade (INI 01/16 e IPEC 28/11), os testes também demonstram significância estatística pelo teste de Pearson ($p \leq 0,05$). (Figura 37).

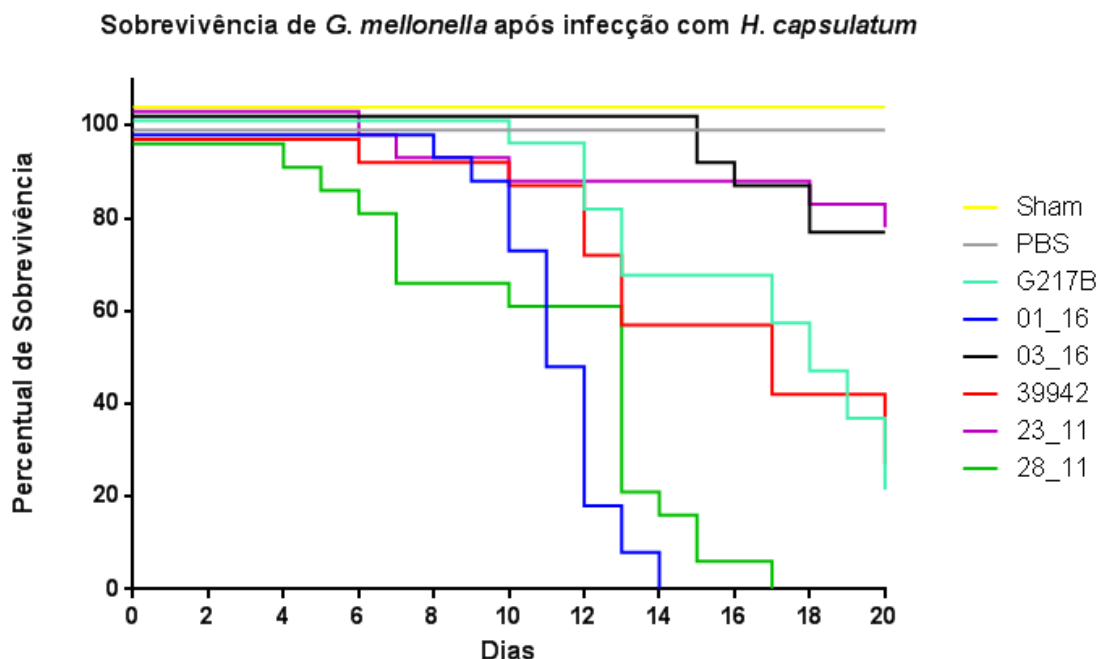
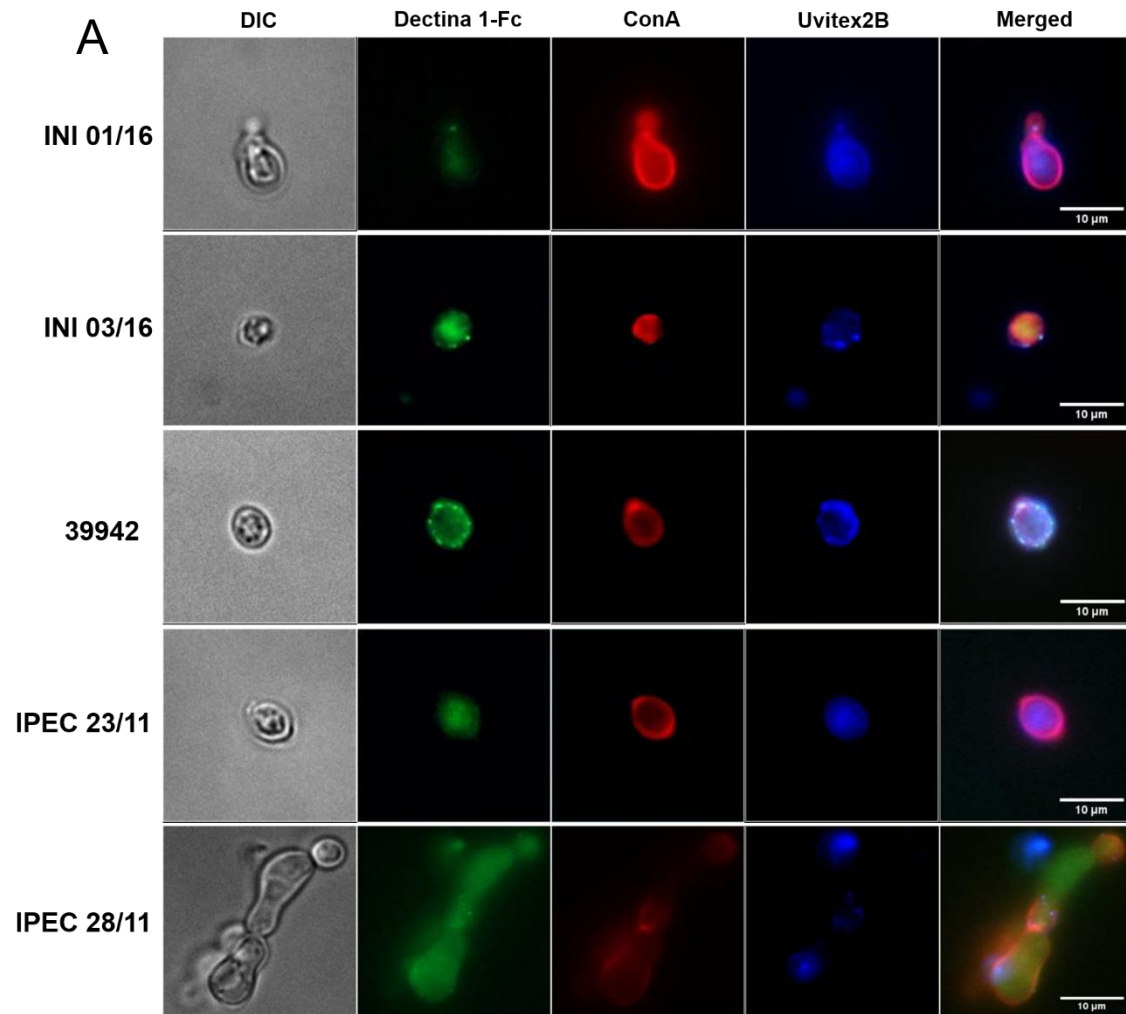


Figura 37 - Sobrevivência de larvas do modelo *G. mellonella* após infecção com *H. capsulatum*. Diferentes percentuais de sobrevivência de larvas após 20 dias de infecção com os isolados do presente estudo, respeitando um inóculo de 1×10^6 . Os grupos inoculados com PBS e sem inóculo (Sham) não apresentaram exemplares mortos após o período testado. As curvas de foram mais acentuadas nos isolados 01/16 e 28/11, os quais apresentam entre si, significância estatística ($p = 0,05$), sendo a análise global, também estatisticamente significativa pelo teste de Mantel Cox ($p < 0,001$).

6.6 Microscopia de Fluorescência

Todos os isolados apresentaram intensidade de fluorescência para todos os fluorocromos utilizados, no entanto, observamos diferentes perfis de ligação das lectinas à parede celular dos isolados estudados nessa etapa. Na ligação com Dectina1-Fc, que reconhece e interage com β -1,3-glucanas, observamos uma maior intensidade de fluorescência no isolado INI 01/16.

O isolado 39942 apresentou mais alta intensidade de fluorescência com ConA. Os isolados INI 03/16, INI 23/11 e INI 28/11 apresentaram intensidade de fluorescência semelhante tanto com Dectina1-Fc, quanto com ConA e Uvitex2B (Figura 38A). As análises estatísticas demonstram significância quando os dados foram analisados pelo método de ANOVA ($p < 0,05$) (Figura 38B).



Microscopia de Fluorescência

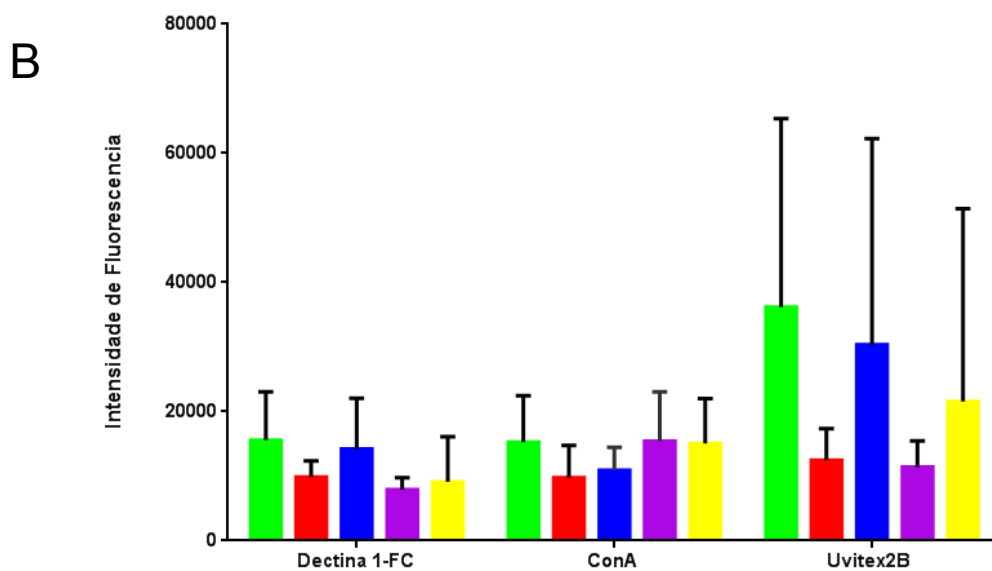


Figura 38 – (A) Microscopia de fluorescência evidenciando o perfil de ligação de Dectina 1-Fc, ConA e Uvitex2B dos isolados INI 01/16, INI 03/16, 39942, INI 23/11 e INI 28/11 e (B) Intensidade de fluorescência dos isolados marcados com lectinas e seus respectivos fluorocromos: INI 01/16 (verde), INI 03/16 (vermelho), 39942 (azul), INI 23/11 (lilás) e INI 28/11 (amarelo), lectinas conjugadas com seus respectivos fluoróforos.

7 ASSOCIAÇÃO DOS DADOS

Correlacionando todos os dados obtidos em nosso estudo dos 50 isolados, não observamos relação entre os métodos realizados e respectivas respostas obtidas. Entretanto, todas as amostras provenientes de solo foram classificadas dentro da espécie filogenética RJ, e todos foram *MAT1-1*. Observamos isolados de histoplasmose disseminada em todas as espécies filogenéticas baseadas no MLST, assim como os dois tipos de *mating type* também relacionados nas diferentes espécies e em casos de histoplasmose disseminada (Tabela 10).

Tabela 10 – Correlação dos resultados dos 50 isolados estudados quanto à fonte, forma clínica, isolamento, mating type e espécie filogenética

Isolado	Fonte/Espécime	Forma Clínica	Isolamento	Mating Type	Espécie Filogenética
AC 05	Solo	NA	Niterói	1.1	RJ
CO4	Solo	NA	Petrópolis	1.1	RJ
EP 02	Solo	NA	Itaipava	1.1	RJ
IGS 19	Solo	NA	Ilha Grande	1.1	RJ
IGS 4/5	Solo	NA	Ilha Grande	1.1	RJ
IT 04	Solo	NA	Niterói	1.1	RJ
RPS 35	Solo	NA	Rio da Prata	1.1	RJ
RPS 45	Solo	NA	Rio da Prata	1.1	RJ
RPS 51	Solo	NA	Rio da Prata	1.1	RJ
TI 01	Solo	NA	Tinguá	1.1	RJ
TI 05	Solo	NA	Tinguá	1.1	RJ
CÃO4	Fígado e baço	NA	Itaipava	1.1	RJ
IPEC 02/13	Hemocultura	NA	Rio de Janeiro	1.1	RJ
IPEC 05/12	Swab de lesão	NA	Rio de Janeiro	1.2	RJ
IPEC 07/12	Biópsia de linfonodo	NA	Rio de Janeiro	1.2	RJ
RS 36	Fígado e baço	NA	Ilha Grande	1.2	RJ
84502	Hemocultura	Disseminada	Rio de Janeiro	1.1	Nordeste
13H	Hemocultura	Disseminada	Rio de Janeiro	1.1	Nordeste
129H	Hemocultura	Disseminada	Rio de Janeiro	1.2	Nordeste
20231	Swab de orofaringe	Disseminada	Rio de Janeiro	1.1	Unknown1
11354	Hemocultura	Disseminada	Rio de Janeiro	1.1	Unknown1
3416	Escarro	HPC	Rio de Janeiro	1.1	RJ
3612	Biópsia de pulmão	Disseminada	Rio de Janeiro	1.1	RJ
36GAL	Sangue	Disseminada	Rio de Janeiro	1.2	Unknown1
39439	Aspirado MO	Disseminada	Rio de Janeiro	1.1	RJ
39942	Biópsia	ND	Rio de Janeiro	1.2	RJ
6503	Biópsia de gânglio	Disseminada	Rio de Janeiro	1.1	RJ
84564	Biópsia de pele	Disseminada	Rio de Janeiro	1.1	Nordeste
18H	Hemocultura	Disseminada	Rio de Janeiro	1.1	RJ
HC 40039	Aspirado MO	Disseminada	Rio de Janeiro	1.2	RJ
INI 01/16	Aspirado MO	Disseminada	Rio de Janeiro	1.2	Nordeste
INI 02/16	Biópsia de pele	Disseminada	Rio de Janeiro	1.1	LAmB1
INI 03/16	Aspirado MO	Disseminada	Rio de Janeiro	1.1	LAmB1
INI 04/16	Escarro	Disseminada	Rio de Janeiro	1.1	Nordeste
INI 05/16	Fragmento gânglio	Disseminada	Rio de Janeiro	1.1	RJ
INI 06/16	Aspirado MO	Disseminada	Rio de Janeiro	1.2	RJ
INI 07/16	Aspirado MO	Disseminada	Rio de Janeiro	1.2	Unknown1
IPEC 01/12	Aspirado MO	Disseminada	Rio de Janeiro	1.2	RJ
IPEC 01/13	Hemocultura	Disseminada	Rio de Janeiro	1.2	RJ
IPEC 02/14	Biópsia de pele	Disseminada	Rio de Janeiro	1.2	RJ
IPEC 04/12	Aspirado MO	Disseminada	Rio de Janeiro	1.2	RJ
IPEC 04/14	Aspirado MO	Disseminada	Rio de Janeiro	1.2	RJ
IPEC 06/12	Aspirado MO	Disseminada	Rio de Janeiro	1.1	RJ
IPEC 09/12	LBA	HPC	Rio de Janeiro	1.1	Nordeste
IPEC 11/12	Biópsia de pele	Disseminada	Rio de Janeiro	1.1	LAmB1
IPEC 23/11	LBA	Disseminada	Rio de Janeiro	1.2	Unknown1
IPEC 24/11	Hemocultura	Disseminada	Rio de Janeiro	1.2	RJ
IPEC 26/11	Aspirado MO	Disseminada	Rio de Janeiro	1.1	RJ
IPEC 27/11	Swab de orofaringe	Disseminada	Rio de Janeiro	1.2	RJ
IPEC 28/11	Aspirado MO	Disseminada	Rio de Janeiro	1.2	RJ

Legenda; AC = Aldeia Curimim, INI = Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas. IPEC = Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, MO = Medula óssea, LBA = Lavado broncoalveolar, NA = Não avaliado, ND = Não disponível, HPC = histoplasmose pulmonar crônica, RJ = Rio de Janeiro.

8 DISCUSSÃO

A histoplasmosose tem sido reportada em pelo menos 60 países, e o aumento de casos de aids tem aumentado a frequência desta infecção fúngica em diversas regiões do globo terrestre (NACHER et al., 2013; ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2019). Acredita-se que a histoplasmosose seja altamente endêmica no estado do Rio de Janeiro, sendo o estado que historicamente apresentou um dos maiores índices de positividade no teste da histoplasmina entre os dados disponíveis na literatura (WANKE, 1985), além de possuir o maior índice de isolamento de *H. capsulatum* do solo (ALMEIDA et al., 2019).

O diagnóstico da histoplasmosose é proporcionalmente mais frequente em homens, sendo uma proporção de aproximadamente 5:1 (homem/mulher) no Brasil (ALMEIDA et al., 2019). Esses dados estão relacionados à maior prevalência de HIV na população masculina do Brasil (DAMASCENO et al., 2013).

Em nosso estudo, foram observados resultados bem semelhantes aos encontrados na literatura especializada. Entre os 34 *H. capsulatum* isolados de origem humana foi encontrada a proporção de 3,25 homens para cada mulher, o que corrobora um recente estudo que demonstra por meio de revisão sistemática que no Brasil, que entre 207 artigos analisados, com um total de 3.530 pacientes envolvidos, 78,3% eram homens, totalizando uma proporção de 4 homens para cada mulher (ALMEIDA et al., 2019).

Outro dado que corrobora os dados já descritos, é referente ao isolamento de *H. capsulatum* em pacientes portadores de HIV. Em nosso estudo, entre os 34 isolados oriundos de pacientes, 12 isolados foram obtidos de aspirado de medula óssea, sete de hemocultura e seis de biópsia de pele, sendo um total de 25 amostras isoladas dos espécimes clínicos que a literatura cita como sendo os mais frequentemente utilizados e que apresentam os melhores rendimentos para isolamento de *H. capsulatum* em paciente imunocomprometidos (ALMEIDA et al., 2019).

No que se refere aos aspectos morfológicos de *H. capsulatum* em cultivo, como a textura e coloração da cultura, descreve-se na literatura, que estas características fenotípicas poderiam estar potencialmente associadas à virulência de isolados. Na década de 70 *H. capsulatum* foi dividido em dois

tipos: *albino* (A) e *brown* (B), os quais são relacionados sendo menos e mais virulentos, respectivamente (TEWARI; BERKHOUT, 1972). Este mesmo estudo descreveu as características morfológicas do tipo *albino* como sendo formado por colônias brancas, de aspecto cotonoso, compostas por hifas hialinas, com poucos macroconídios e com muitos microconídios. Já o tipo *brown*, é descrito como sendo formado por colônias de coloração variando de castanho a marrom, pulverulentas, com hifas de coloração mais escura, abundância de macroconídios e microconídios. Os autores descreveram que o tipo *brown*, utilizado no estudo, causou maior taxa de mortalidade em camundongos infectados com os dois tipos, e também foram os que apresentaram também maior resistência a antifúngicos (TEWARI; BERKHOUT, 1972).

Embora na literatura exista a sugestão de que os dois fenômenos podem ocorrer de igual maneira, ou seja, tanto o tipo *albino* quanto o *brown* possuem potencial patogênico, esses campos ainda podem ser muito explorados, uma vez que os estudos que abordaram esse tema, majoritariamente se restringem ao início dos anos 70 (TEWARI; BERLHOUT, 1972).

Dessa forma, sugere-se que estudos de associação dos caracteres fenotípicos e virulência das cepas deveriam ser desenvolvidos para que haja uma compreensão maior da biologia e fisiologia de *H. capsulatum*, uma vez que, embora os dois tipos pareçam ter potencial patogênico semelhante, observamos que os isolados pertencentes ao tipo *brown* convertem de maneira mais rápida para a fase leveduriforme, ao passo que os isolados pertencentes ao tipo *albino*, em contrapartida, precisam frequentemente de ao menos três passagens para que haja conversão.

Apesar do escasso número de trabalhos com esse tema, um estudo recente do nosso grupo, demonstrou que as diferenças fenotípicas, tais como, textura, cor e micromorfologias de *H. capsulatum* não puderam ser associados as manifestações clínicas da histoplasmose. Nossos dados corroboram estes achados. Também foi demonstrado infecção dupla por *H. capsulatum* em um dos nossos pacientes, dados similares aos observados por Damasceno e colaboradores em 2019, onde cepas do tipo *albino* e *brown* foram isoladas do mesmo paciente demonstrando novamente a grande plasticidade fenotípica desta espécie fúngica.

Dado que merece atenção no presente estudo, foi a inclusão de isolados oriundos de fontes ambientais (22%), uma vez que poucos estudos no Brasil, a maioria provenientes do nosso grupo de pesquisa, os quais buscaram demonstrar a presença de *H. capsulatum* em solo de possíveis regiões endêmicas concomitantes de leishmaniose e histoplasiose, avaliar seu genótipo e fenótipo e comparar com amostras oriundas de outras procedências geográficas.

Recente publicação demonstra que *H. capsulatum* possui tropismo por algumas características físico-químicas do solo, sugerindo que as melhores condições para o desenvolvimento de *H. capsulatum* em seu nicho ecológico natural são as que possuem uma distância euclidiana de 0 a 222 metros a partir de uma fonte de água, com mais de 20% de área coberta com vegetação e um pH variando de 7.2 a 7.6 (MAIGA et al., 2018).

Os isolados ambientais abordados no presente estudo, são provenientes de fontes ambientais com as condições propostas por Maiga e colaboradores (2018). Duas dessas amostras são de Petrópolis, duas são de Tinguá, três de Rio da Prata, duas de Niterói e duas de Ilha Grande, regiões que possuem grande parte do território coberto por vegetação, temperatura média de 13°C a 23°C, pluviosidade de 1.500 a 2.600mm. Além disso, a Reserva Biológica do Tinguá, localizada majoritariamente em Nova Iguaçu, município da Baixada Fluminense, abriga aproximadamente 0,6% do território estadual, sendo a maior Reserva Biológica de Mata Atlântica, com solo com pH variando de 6.9 a 7.4 (MMA/IBAMA, 2006).

Dessa maneira observa-se uma relação de *H. capsulatum* com fatores abióticos (solo, pH, umidade), os quais, em determinados níveis e concentrações, podem favorecer o seu desenvolvimento em ambiente natural. Os morcegos são um dos principais carreadores de *H. capsulatum* em natureza, os quais podem, após inalação e infecção, liberar através do seu trato gastrointestinal propágulos viáveis, fazendo com que *H. capsulatum* possa assim colonizar um novo ambiente favorável ao seu desenvolvimento (HOFF; BIGLER, 1981).

Esses ambientes colonizados por *H. capsulatum* podem formar um tipo de cadeia cíclica, pois *H. capsulatum* e morcegos, podem por vezes coexistir, assim, os morcegos podem favorecer o desenvolvimento de *H. capsulatum* por

meio da eliminação de excretas as quais também favorecem o crescimento do fungo no meio ambiente, por providenciarem um ambiente rico em matéria orgânica, fundamental para o ciclo de vida de *H. capsulatum* no solo, além de potencialmente se infectarem com *H. capsulatum* já presente no ambiente e assim disseminar *H. capsulatum* para outros ambientes, uma vez que as características físico-químicas do trato intestinal desses mamíferos são as mesmas dos ambientes nos quais *H. capsulatum* apresenta melhor desenvolvimento (ULLOA et al., 2006).

Duas das regiões das quais os isolados ambientais são oriundos, a região de Ilha Grande, assim como a região serrana do Rio de Janeiro, são regiões conhecidamente povoadas por morcegos (ESBÈRARD et al., 2006). Também se associa que grande parte do território coberto por árvores e cavernas, como a região de Ilha Grande, facilmente pode contribuir para surgimento de surtos epidêmicos, uma vez que essas áreas são frequentadas sem a devida precaução (ALLOCATI et al., 2016).

Deve-se também, notoriamente, monitorar a presença de morcegos em tais regiões, uma vez que esses animais são extremamente importantes na cadeia epidemiológica e na emergência/reemergência de diversas doenças infecciosas, entre elas a histoplasmose (ALLOCATI et al., 2016)

Recentemente foi descrito na região sudeste do Brasil, a coinfeção entre *H. capsulatum* e vírus da raiva em morcegos (MENOZZI et al., 2019) e no Rio de Janeiro tem aumentado o número de casos de raiva em animais domésticos, transmitida por morcegos hematófagos e não hematófagos, o que levanta um alerta para o ciclo silvestre da doença (SOUZA et al., 2014).

Um fator importante que pode contribuir para a emergência de patógenos silvestres em ambiente urbano é a fragmentação do seu habitat natural, dessa maneira, a emergência tanto de casos de raiva, quanto de casos de histoplasmose, pode estar ligada com o aumento do desmatamento no Rio de Janeiro (COSTA et al., 2019).

Dessa forma, pode-se sugerir que os locais dos quais *H. capsulatum* foi isolado sejam realmente nichos ecológicos deste patógeno, pois são regiões que apresentam características físico-químicas muito semelhantes às descritas no território americano (MAIGA et al., 2018).

A espécie *H. capsulatum* (forma assexuada anamorfa) é um organismo eucariota haplóide e possui um sistema de reprodução sexuada do tipo heterotático onde micélio com hifas não diferenciadas são associadas a uma determinada compatibilidade sexual ou *Mating Types* (*MAT1-1/MAT1-2* locus).

Em diversos modelos microbianos tem-se tentado demonstrar a correlação entre os diferentes *mating types* e um determinado perfil de virulência. Em fitopatógenos, sapróbios de solo, como *Curvularia lunata*, estudos demonstram não haver correlação entre os *mating types* I e II com o perfil de virulência e origem geográfica de isolados chineses (ZHANG et al., 2019).

Em outros modelos fúngicos, também houve uma tentativa de se evidenciar essa hipótese, onde em um estudo utilizou 20 isolados de *Aspergillus fumigatus*, divididos em dois grupos (ambiental e clínico), sendo, no grupo ambiental, três isolados *mating type* 1.1 e sete isolados do tipo 1.2, e no grupo clínico cinco isolados de cada *mating type*.

Todos os isolados foram inoculados em larvas do modelo *G. mellonella* e foi observado que os isolados do tipo *MAT1-1*, mataram as larvas mais rapidamente, quando comparadas com os isolados do tipo 1.2 (CHEEMA; CHRISTIANS, 2011). Aliado a isso, estudos prévios já haviam demonstrado que a proporção de isolados do tipo 1.1 foi muito maior em casos de aspergilose invasiva do que entre isolados de outras fontes (ALVAREZ-PEREZ et al., 2010).

Associações entre *mating types* e virulência também já foram evidenciadas em *C. neoformans* e os dados demonstram que os padrões de virulência, além da diferença de *mating type*, podem estar associados a um perfil genético (KWON-CHUNG; EDMAN; WICKES, 1992; NIELSEN et al., 2005). Em isolados de *C. neoformans* sorotipo D, que diferem apenas o *mating type*, observou-se diferentes perfis de virulência em modelo murino (KWON-CHUNG; EDMAN; WICKES, 1992), ao passo que em isolados congênicos de *C. neoformans* do sorotipo A (*C. grubii*), não foram observadas tais associações (NIELSEN et al., 2003). Estudos posteriores também sugerem que regiões genômicas fora do locus de *mating type* contribuem para diferentes perfis de virulência entre as células **a** e **α** de *C. neoformans* (NIELSEN et al., 2005).

Em *H. capsulatum*, historicamente o *mating type* 1-1 (*MAT1-1*), foi durante muito tempo sugerido na literatura como sendo o idiomorfo mais virulento de *H. capsulatum*, uma vez que esse idiomorfo, proporcionalmente era muito mais encontrado em amostras clínicas, sendo uma proporção de 7:1 em estudos pioneiros (KWON-CHUNG; WEEKS; LARSH, 1974). Em achados mais recentes, os resultados quanto à proporção dos dois tipos de compatibilidade sexual em isolados de *Histoplasma africa* (anteriormente *Histoplasma duboisii*), demonstram uma proporção inversa, com maior predomínio de *mating type* 1-2 (*MAT1-2*) em isolados de origem clínica (VALERO et al., 2018).

Além da sugestão de que um tipo de compatibilidade sexual pudesse ser mais virulento que o outro, embora existam apenas dois tipos, na literatura, acredita-se que esses tipos de compatibilidade sexual também possam servir como marcadores de origem geográfica.

Estudos comparando os tipos de compatibilidade sexual entre isolados de origem brasileira e mexicana, sendo 14 isolados de cada país, observaram a existência dos dois tipos entre os isolados mexicanos ao passo que entre os isolados de origem brasileira, houve apenas a detecção de *MAT1-1* sugerindo que no Brasil não existia o tipo *MAT1-2* (RODRIGUÉZ-ARELLANES et al., 2013). Estes dados foram totalmente descartados após a ampliação deste tipo de análise em isolados brasileiro, já que tanto em isolados no estado do Rio de Janeiro, bem como no Ceará, existem os dois tipos de compatibilidade sexual entre isolados de origem humana (ALMEIDA-SILVA et al., 2018, DAMASCENO et al., 2019). Entretanto, nas nossas amostras autóctones de ambiental (solo), houve a predominância do tipo *MAT1-1* (ALMEIDA-SILVA et al., 2018).

Contradizendo todas as sugestões que até então existem na literatura, estudos antigos já haviam demonstrado a existência de diferenças significativas no potencial de virulência dos dois tipos de *mating types* de *H. capsulatum* quando avaliados em modelo de infecção murino (CAMPBELL; BERLINER, 1973; KWON-CHUNG, 1981). Os nossos achados corroboram os dados que sugerem não haver diferenças entre patogenicidade dos *MAT1-1* e *MAT1-2*.

Na análise geral, observamos uma proporção de 1,6 isolados do tipo *MAT1-1* para cada isolado do tipo *MAT1-2*. Entre os isolados de origem

humana, observamos uma proporção próxima de 1:1 e esses dados foram semelhantes aos resultados obtidos por Valero e colaboradores (2018) onde foram observados uma proporção exatamente igual à do presente estudo entre isolados de origem clínica, sendo *MAT1-1* entre isolados de *H. capsulatum* e 3:1 entre isolados *H. duboisii* com predomínio do tipo *MAT1-2*.

Dessa maneira fica evidente o potencial patogênico dos dois tipos de compatibilidade sexual e diferentemente do que se acreditava, sugere-se que não haja diferenças quanto ao perfil de virulência de tais isolados. No entanto, um fator limitante para o prosseguimento dos estudos com *mating type*, é o fato da difícil manipulação *in vitro* para este fim, uma vez que rapidamente existe a perda da fertilidade (KWON-CHUNG; WEEKS. LARSH, 1974). Para suprir tal limitação, deve-se adotar estratégias moleculares para determinação dos tipos de compatibilidade sexual, por serem metodologias de fácil manuseio e oferecerem resultados mais rápidos e precisos.

Embora tenhamos observado uma proporção de *MAT1-1* entre os *mating types* dos isolados de origem ambiental, dados da literatura, já demonstraram essa mesma relação (GAUR; LICHTWARDT, 1980), no entanto nossa amostragem é muito pequena para que realmente possamos afirmar concretamente que isolados autóctones são do tipo *MAT1-1*. Com isso, investigações mais aprimoradas, com a finalidade de ampliar o número de isolados de origem ambiental e coletar mais informações quanto à distribuição dos tipos de compatibilidade sexual de *H. capsulatum* em ambiente natural seria de grande valor para uma melhor compreensão desse fenômeno.

O advento das técnicas moleculares aplicadas ao estudo evolucionário dos fungos, tem permitido avanços na classificação filogenética de *H. capsulatum* e suportam a alta diversidade deste fungo dimórfico (VITÉ-GARIN et al, 2014).

A técnica de MLST é uma técnica robusta, desenvolvida em 1998 para a caracterização molecular de isolados de *Neisseria meningitidis* (MAIDEN et al., 1998). Dentre as muitas vantagens dessa técnica, assim como a maioria das ferramentas moleculares, o MLST permite diagnosticar alterações genéticas que não são aparentes a nível fenotípico (BELÉN; PAVÓN; MAIDEN, 2009).

Em *Helicobacter pylori*, após análise de 370 isolados de origem humana de 27 regiões geográficas distintas, a técnica de MLST permitiu demonstrar

que os padrões de migração fora do continente africano poderiam explicar a distribuição de *H. pylori* (FALUSH et al., 2003).

De igual maneira, estudos em *H. capsulatum* já sugeriram que pelo grau de similaridade genética, *H. farciminosum* não seria uma espécie distinta adaptada a equinos e que a infecção causada nesses animais, seria causada por *H. capsulatum* presumivelmente adquirido na América do Sul, transportada para o Velho Mundo em um animal infectado e lá se espalhou de animal para animal por contato com a pele (KASUGA; TAYLOR; WHITE, 1999).

Em *H. capsulatum* essa técnica é aplicada em diversos estudos filogenéticos (KASUGA et al., 2003, MUNIZ et al., 2010, VITÉ-GARIN et al., 2014, TEIXEIRA et al., 2016, DAMASCENO et al., 2019), os quais já permitiram determinar um alto grau diversidade genética entre isolados de diversas partes do mundo, sendo descritos inicialmente oito clados filogenéticos, altamente relacionados com diferentes regiões do globo terrestre (KASUGA et al., 2003). Posteriormente, em estudo realizado por nosso grupo, foi demonstrado que amostras brasileiras se agrupavam em três clados filogenéticos (MUNIZ et al., 2010).

Estudos mais recentes, reanalisando as 234 sequências depositadas no GenBank, utilizando *softwares* mais robustos, demonstrou a presença de ao menos 17 espécies filogenéticas ao redor do mundo (TEIXEIRA et al., 2016), incluindo uma população restrita ao estado do Rio de Janeiro, corroborando dados demonstrados anteriormente de uma população autóctone (MUNIZ et al., 2010). Os autores ainda sugerem que o isolamento genético de *H. capsulatum* pode ser resultado do potencial de dispersão diferencial, exercido por morcegos e outros mamíferos (TEIXEIRA et al., 2016).

Estudos pioneiros, conduzidos pelo nosso grupo, já haviam demonstrado a diversidade genética de *H. capsulatum* isolados no estado do Rio de Janeiro, sendo possível observar que os isolados do Rio de Janeiro, quando comparados com isolados dos Estados Unidos, apresentavam menos de 70% de similaridade, ao passo que isolados tanto de solo quanto de animais, isolados de mesma área geográfica, possuíam 100% de similaridade, sugerindo assim que micro nichos ambientais pudessem servir como fonte de infecção para as populações humana e animal (MUNIZ et al., 2001).

Nossos resultados demonstram mais uma vez a diversidade genética de *H. capsulatum* isolados de fontes ambientais e a formação de um clado (clado III) com a maioria dos isolados de solos, corroborando a natureza autóctone dos isolados de solo do estado do Rio de Janeiro.

Ao confrontar os resultados obtidos das amostras do presente estudo com sequências depositadas no GENBANK, observamos que alguns dos nossos isolados (20231, 36GAL, 23/11, 11354, 07/16, 03/16, 11/12, 02/16, 39942, 09/12, 04/16, 129H, 01/16, 84502, 84564 e 13H), têm suas sequências se agrupando com outros clados filogenéticos, principalmente no clados recém descritos, como Nordeste, LamB1 e Unknown1 (TEIXEIRA et al., 2016).

Com isso, mais uma vez sugerimos a hipótese que morcegos estejam envolvidos na dispersão de *H. capsulatum* pela América Latina, principalmente no caso da espécie *Tadarida brasiliensis*, considerada como morcegos migratórios de longa distância, os quais exercem suas rotas principalmente pela Argentina, Brasil e México (GONZÁLEZ-GONZÁLEZ et al., 2012), fato esse que poderia estar associado à detecção de isolados do clado LAmB1 entre as nossas amostras, uma vez que esse clado é majoritariamente composto por isolados argentinos (TEIXEIRA et al., 2016).

Com relação aos isolados que se agruparam no clado Nordeste, hipóteses semelhantes podem ser levantadas, uma vez que espécies de morcegos como *Molossus molossus* também realizam rotas migratórias entre estados das regiões sudeste e nordeste (BARROS; 2014).

Outro fato importante, é que o Rio de Janeiro, é conhecido como um dos principais destinos de nordestinos em busca de melhores condições de vida, o que acontece historicamente desde a época do êxodo rural, entre 1940 e 1950, em função da economia cafeeira, que ocorreu por volta de 1930 (RUA; 2005).

Tais fatos podem corroborar duas hipóteses possivelmente ocorrendo de maneira bem acentuada no Rio de Janeiro: a primeira é de que possa haver um intenso fluxo gênico, orquestrado por morcegos de diferentes espécies, os quais podem carrear consigo isolados de *H. capsulatum* de populações diferentes da população autóctone do Rio de Janeiro, ocasionando assim, uma possível recombinação em natureza e uma potencial emergência de uma população mais virulenta.

A segunda hipótese, relacionada com a migração de nordestinos para o Rio de Janeiro, pode estar atrelada com a suspeita de que os pacientes dos quais essas amostras de *H. capsulatum* foram isoladas, não tenham se infectado no Rio de Janeiro, sendo possivelmente uma reativação endógena, induzida por algum tipo de imunocomprometimento, como tem sido descrito em histoplasmose (FERNANDES et al., 2018).

Outro fator importante que demonstra a singularidade genética de *H. capsulatum*, população RJ, pode estar diretamente ligado à variabilidade genética encontrada nos nossos isolados. Em 1999, foi descrito que em *H. capsulatum* os íntrons foram mais variáveis que os éxons em todos os quatro genes que compõem o MLST na população estudada (KASUGA; TAYLOR; WHITE, 1999). Nos nossos isolados observamos mutações nos íntrons, entretanto os éxons foram mais variáveis nos genes *ole* e *tub*, sugerindo que o posicionamento dessas mutações, quando comparados com isolados que possuem as mutações nas regiões intrônicas, possam ter distanciado nosso clado dos demais.

Esses dados corroboram o fato de que a maior diversidade haplotípica tenha sido encontrada no Rio de Janeiro, demonstrando mais uma vez uma maior diversidade quando comparado com outros clados filogenéticos. Os isolados oriundos da América Latina, mais precisamente o antigo clado LAm A, já haviam sido descritos como os que apresentavam a maior diversidade genética (KASUGA et al., 2003), sendo esse clado composto por amostras oriundos do Brasil, o que poderia ter influenciado para essa descrição, uma vez que as análises isoladas do presente estudo demonstram quão diversas as mesmas são, e embora no período dessa descrição, as presentes amostras ainda não tivessem sido analisadas, amostras de mesma procedência geográfica já haviam sido.

Embora o MLST tenha sido descrito recentemente como uma “fotografia” do que pode acontecer nas análises genômicas (SEPULVEDA et al., 2017), nossos dados confrontam essa hipótese e demonstram o quanto essa ferramenta ainda pode trazer dados importantes e confiáveis na filogenia global de *H. capsulatum*.

As análises genômicas abordadas no presente trabalho foram realizadas em 18 isolados, com intenção de comparação com o perfil genético do isolado

de origem colombiana, o qual foi descrito recentemente como espécie *H. suramericanum*, além de outras quatro linhagens (SEPULVEDA et al., 2017).

Os nossos dados genômicos mostram que ao menos cinco populações foram encontradas nas análises de 18 genomas sequenciados por nós e, nos outros 30 genomas depositados no GenBank: RJ, Northeast, *H. capsulatum* sensu stricto (Panama), LAm B e NAm, que englobam *H. ohiense* e *H. mississippiense*. Nossos achados por análise filogenômicas foram 94,4% concordantes com os resultados obtidos pelo MLST, demonstrando a robustez do último ensaio.

A recente população descrita como *H. suramericanum* (SEPULVEDA et al., 2017) não deveria ser utilizada como representante de *H. capsulatum* provenientes da América do Sul, já que é alta a diversidade populacional encontrada na América Latina. Em nossos estudos além da população RJ, também evidenciamos uma população proveniente da região nordeste do Brasil, previamente demonstrada por MLST (DAMASCENO et al., 2019) a qual foi nomeada como população Nordeste (Northeast).

Estudos genômicos têm demonstrado uma significativa melhoria na capacidade de determinar os limites das espécies, principalmente as que fazem parte da ordem *Onygenales* (WHISTON; TAYLOR, 2014).

Mais recentemente, um novo estudo sugeriu que a implementação de análises genômicas, apesar de ser usada com cautela em estudos taxonômicos, é necessária, aliada a aumento do investimento em estudos para entender o significado dessas relações evolutivas, para melhorar rapidamente o diagnóstico, ajudar a identificar mecanismos de resistência a antifúngicos e entender a adaptação ao hospedeiro humano e patogênese.

Apesar dos grandes avanços na análise filogenética comparativa, resta muito trabalho a ser feito para melhor entender o significado funcional da evolução, que permitirá entender a infecção em mamíferos e humanos, entender a hibridização e o papel da introgressão entre espécies (VAN DYKE; TEIXEIRA; BARKER, 2019).

Outro estudo demonstra que alterações na capacidade de aquisição de nutrientes ocorreram em *Onygenaceae* e *Ajellomycetaceae* e sustentaram os fungos pertencentes como patógenos, se adaptando de maneira eficaz ao hospedeiro humano (MUÑOZ et al., 2018).

A identificação e delimitação de espécies em fungos impulsionaram a pesquisa para identificar alterações morfológicas, estratégias de virulência e suscetibilidade a medicamentos que não eram inicialmente aparentes, tanto em espécies do gênero *Coccidioides* (FISHER et al., 2002), como em espécies do gênero *Paracoccidioides* (TURISSINI et al., 2017).

Mais especificamente, em *H. capsulatum* foi demonstrado que a especiação fúngica poderia influenciar em implicações no campo da saúde. Foi demonstrado que a espécie *H. mississippiense* é menos virulenta, mas apresenta maior resistência aos fármacos frequentemente utilizados (GOUGHENOUR; BALADA-LLASAT; RAPPLEYE, 2015), além de ser a única a demonstrar atividade proteolítica (ZARNOWSKI et al., 2007).

A análise da ancestralidade nos isolados estudados através de algoritmo *ADMIXTURE*, dividiu os isolados pertencentes a população RJ sendo um genótipo de isolados de origem ambiental e um de amostras clínicas. Esses resultados sugerem que os isolados de origem clínica, por terem que sofrer dimorfismo para a ocorrência do parasitismo, adotaram um mecanismo de sobrevivência, possivelmente com alteração genética, após a passagem em hospedeiro vertebrado, mecanismo esse que não é necessário ao *H. capsulatum* em seu ambiente natural, o solo.

Esta hipótese pode também ser corroborada pelos resultados obtidos nas análises fenotípicas, onde todos os isolados do solo pertencem ao tipo *albino*, possuem menor quantidade de propágulos infectantes, e foram mais difíceis de converter para a fase leveduriforme, necessitando de ao menos três repiques coloniais para que houvesse total conversão.

Embora já tenha sido descrito que os dois tipos morfológicos têm podem apresentar diferente potencial patogênico (DAMASCENO et al., 2019) pode ser que realmente a variabilidade genética esteja ligada a aspectos morfológicos e de virulência. Entretanto, estudos são necessários para confirmação desta hipótese.

Outro importante fator que pode estar associado à detecção de diferentes populações no Brasil, populações Nordeste e RJ, podem ser os biomas dos quais as mesmas foram isoladas. Sabe-se que fatores ambientais e climáticos podem estar ligados a emergência de diversos patógenos, tidos

inclusive como intrinsicamente resistentes a diversos antifúngicos, como a *Candida auris* (CASADEVALL; KONTOYIANNIS; ROBERT, 2019).

A população Nordeste e a população RJ estão inseridas na Caatinga, um bioma semiárido exclusivamente brasileiro, e na Mata Atlântica, com clima predominantemente tropical úmido, respectivamente e esses biomas já foram caracterizados como influenciadores de especiação em diferentes organismos de arquitetura eucariótica, como plantas (GARCIA et al., 2011), aves (BATALHA-FILHO et al., 2019) e mamíferos (GONÇALVES et al., 2016). Com isso, além de todo mecanismo de dispersão já conhecido, é possível que alterações ambientais também tenham influenciado a especiação de *H. capsulatum*, uma vez que em ambos os casos, o território nacional possui uma das maiores diversidades ambientais no mundo.

Em diversos modelos fúngicos tem sido descrito que a sobrevivência após a ingestão por macrófagos, depende da expressão de alguns fatores de virulência, como em *C. neoformans* que depende da expressão da cápsula e de melanina (STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001).

A interação de *H. capsulatum* com macrófagos e a capacidade de sobreviver e replicar dentro dos macrófagos alveolares são decisivas para o desenvolvimento da disseminação no tecido hospedeiro (PITANGUI et al., 2016). Em *H. capsulatum* já foi demonstrado que as leveduras desse patógeno curiosamente possuem capacidade de sobreviver após o contato com macrófagos (PORTA; MARESCA; 2000).

Diversos mecanismos de evasão do sistema imune já foram descritos em *H. capsulatum*, sendo a expressão de α -(1-3)-glucana o que mais pode interferir nesse tipo de interação (MIHU; NOSANCHUK; 2012) e mais recentemente foi descrito que colesterol também participa na diminuição do reconhecimento de *H. capsulatum* por células fagocíticas (GUIMARÃES et al., 2019).

Os nossos achados demonstram diferentes perfis de associação com células fagocíticas, sendo o isolado pertencente a espécie filogenética LAm B1 a que menos apresentou associação. Nossos ensaios não determinaram o tipo de fenômeno que pudesse estar influenciando nesse reconhecimento, no entanto, sugere-se uma possível presença de α -(1-3)-glucana na parede celular deste isolado.

Os componentes da parede celular de diferentes espécies filogenéticas já foram avaliados, entretanto somente três isolados foram estudados (HOLBROOK; RAPPLEYE; 2008). Dessa forma, com a detecção de diversas outras espécies filogenéticas, estudos com a finalidade de atualizar esse tipo de informação se fazem necessários, o que poderia ajudar a elucidar os diferentes perfis de associação com macrófagos observados em nosso estudo.

Observando o perfil de sobrevivência desses isolados após a interação com macrófagos, também foram evidenciadas diferentes contagens de CFU's, o que podemos inferir como diferentes perfis de virulência entre as espécies filogenéticas testadas. A CBP é uma proteína ligante de cálcio que quando expressa, facilita a sobrevivência de *H. capsulatum* dentro de macrófagos (HOLBROOK; RAPPLEYE; 2008).

Nossos isolados apresentaram diferentes perfis de resistência à atividade fungicida dos macrófagos, e além da expressão de CBP ser uma hipótese viável, pode-se também sugerir que esses isolados possuam diferentes níveis de expressão de enzimas que participam de resposta ao estresse oxidativo.

Embora diferentes mecanismos possam estar envolvidos no processo de patogênese fúngica, observamos que os isolados pertencentes à população Nordeste (INI 01/16) e à população RJ (IPEC 28/11), foram os isolados que apresentam maiores e menores taxas, respectivamente, tanto de associação quanto de resistência à fagocitose, sugerindo que a diversidade genética possa fortemente influenciar no comportamento de isolados frente à fagocitose.

A fim de corroborar esses resultados, selecionamos uma etapa subsequente, a de infecção em larvas do modelo invertebrado *G. mellonella*, o qual tem sido amplamente estudado para patógenos fúngicos (THOMAZ et al., 2013). Esse modelo possui imunidade inata, mediada por componentes celulares (hemócitos) e componentes humorais (peptídeos, peptídeos antimicrobianos, enzimas líticas e melanina), os quais agem em conjunto contra diferentes patógenos (CONTADOR; ZARAGOZA; 2018). O processo de melanização é um dos processos mais importantes na defesa do inseto contra patógenos e esse processo visa encapsular o patógeno dentro do pigmento (THOMAZ et al., 2013).

Os resultados dos ensaios realizados com *G. mellonella* divergem dos achados nos experimentos com macrófagos da linhagem RAW 264.7, e sugerem que os isolados INI 01/16 e IPEC 28/11 são mais virulentos, uma vez que foram os dois únicos isolados que causaram morte em 100% das larvas testadas, mesmo tendo apresentado comportamentos contrários nos ensaios de fagocitose e *killing*. Demonstrando assim, que o perfil de virulência *in vivo* pode ser antagônico ao de modelos *in vitro*.

Embora o isolado IPEC 28/11 tenha apresentado a maior intensidade visual de melanização e ter começado a causar morte nas larvas no terceiro dia após a infecção, esse isolado causou morte na última larva do grupo no décimo sétimo dia após a infecção, ao passo que o isolado 01/16 causou morte em todos os isolados entre o sétimo e décimo quarto dias após a infecção, dados esses sustentados por análise com significância estatística.

A intensa melanização apresentada precocemente pelas larvas infectadas com o isolado IPEC 28/11, foi insuficiente para resolver a infecção, além de poder apresentar um efeito reverso, que é de potencializar danos ao hospedeiro, bloqueando processos celulares e aumentando a rigidez do inseto (THOMAZ et al., 2013).

A larva *G. mellonella* possui uma proteína que reconhece patógenos por meio da interação com β -glucana e alguns isolados de *H. capsulatum* têm essa interação bloqueada pela presença de α -glucana. Esses dados demonstram que os isolados do presente estudo podem ter essa interação comprometida pela presença da α -glucana, em especial os isolados da espécie LAmB1 (39942) e o isolado da espécie Nordeste (01/16), os quais possuíram a menor taxa de associação com macrófagos e morte de todas as larvas no intervalo de sete dias.

Dessa forma, novos estudos com intenção de desvendar os fatores de virulência potencialmente expressos nas novas espécies filogenéticas de *H. capsulatum* se fazem necessários, uma vez que nossos isolados demonstraram evidências de fatores de virulência, como na microscopia de fluorescência, no entanto, estudos com pesquisa de outros fatores associados à virulência são importantes.

Diversos estudos na literatura já sugeriram que abordagens com a finalidade de desvendar genótipos virulentos em *H. capsulatum* deveriam ser

conduzidas. Nosso estudo foi o primeiro estudo a comparar e correlacionar características fenotípicas, tipos de compatibilidade sexual, distribuição filogenética, estrutura populacional e virulência de *H. capsulatum* em alguns isolados, e apesar de podermos sugerir que duas espécies pertencentes ao clado NE, população NE e clado RJ, população RJ serem as mais virulentas dentre os cinco isolados testadas, novas abordagens devem ser introduzidas a fim de confirmar essa suposição.

9 CONCLUSÕES

Neste estudo não foi observada correlação entre marcadores de compatibilidade sexual, espécie filogenética, formas clínicas da histoplasmose, o que pode estar mais relacionado ao hospedeiro imunocomprometido, uma vez que os nossos ensaios demonstram variação de virulência. Dessa forma, corrobora-se o fato de que embora um isolado seja menos virulento, tem potencial patogênico em indivíduos com aids. Embora as espécies filogenéticas Northeast e RJ tenham sido as mais virulentas dentre as estudadas, acreditamos que a virulência está atrelada a outros mecanismos além do mecanismo de *mating*. Entretanto não podemos afirmar, baseado nos estudos de virulência relacionados com as populações genéticas se algumas são mais virulentas que outras devido ao número reduzido de isolados provenientes das diferentes populações incluídos no estudo.

Também concluímos que a população RJ deveria ser considerada uma nova espécie, a qual deveria ser nomeada nos preceitos da nomenclatura taxonômica já que é uma população genética única, distinta das demais descritas mundialmente, por técnicas taxonômicas utilizadas até o presente, MLST e WGS.

10 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Investigar a expressão de genes associados à virulência.
- Ampliar o conhecimento a respeito de isolamento ambiental de *H. capsulatum*, observando novas fontes ambientais do microrganismo.
- Ampliar o conhecimento sobre associação entre *mating types* e fontes ambientais
- Comparar o perfil de expressão de fatores de virulência entre isolados de mesmo *mating type* e de diferentes fontes de isolamento.
- Observar o comportamento de isolados ambientais de *H. capsulatum* frente a outros organismos como *Acanthamoeba castellanii*.
- Aumentar o número de sequenciamento genômico dos isolados pertencentes à população RJ.

REFERÊNCIAS

- Adenis, A. A. et al. Burden of HIV-associated histoplasmosis compared with tuberculosis in Latin America: a modelling study. **Lancet**, v. 18, n. 10, p.1150-1159, 2018.
- Ajello, L. et al. Sexual reproduction in *Histoplasma capsulatum*. **Science**, v. 31, p.155, 1967.
- Ajello, L. et al. Isolation of *Histoplasma capsulatum* and *Allescheria boydii* from soil. **Science**, v. 113 n. 2945, p.662-663, 1951.
- Albuquerque, P.C. et al. Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. **Cell Microbiol**, v. 10, p.1695–1710, 2008.
- Allendoerfer, et al. Blockade of endogenous TNF-alpha exacerbates primary and secondary pulmonary histoplasmosis by differential mechanisms. **J Immunol**, v. 160 n. 12. p. 6072-6082, 1998.
- Allocati, N. et al. Bat–man disease transmission: zoonotic pathogens from wildlife reservoirs to human populations. **Cell Death Disc** v. 2, p.16048, 2016.
- Almeida, F. et al. Considerações em torno de duas amostras de *H. capsulatum* isolados de dermatite verrucosa e escarro. **An Fac Med Un São Paulo**, v. 17, p. 561-577, 1941.
- Almeida, F. Cogumelo do gênero *Histoplasma* isolado de lesões de cromomicose. Associações de fungos nas lesões. **Folia Clinica et Biológica**, v. XI, n. 3, 1939.
- Almeida, M. A. et al. Role of western blot assay for the diagnosis of histoplasmosis in AIDS patients from a National Institute of Infectious Diseases in Rio de Janeiro, Brazil. **Mycoses**, v. 18, p. 1-22, 2019.
- Almeida, M. A. et al. The occurrence of histoplasmosis in Brazil: a systematic review. **Int J Infect Dis**. v. 86, p. 147-156, 2019.
- Almeida, M. A. et al. Validation of western blot for *Histoplasma capsulatum* antibody detection assay. **BMC Infect Dis**. v. 16, n. 87, p. 1-8, 2016.
- Almeida-Paes, R. et al. Melanins Protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the Antifungal Effects of Terbinafine. **PLoS ONE**. v. 11, n. 3, p. e0152796, 2016.
- Almeida-Silva, F. et al. Current Aspects of Diagnosis and Therapeutics of Histoplasmosis and Future Trends: Moving onto a New Immune (Diagnosis and Therapeutic) Era?. **Cur Clin Microbiol Rep**. v. 3, p. 98-107, 2019.

Almeida-Silva, F. et al. Multiplex polymerase chain reaction as an improved method for screening *Histoplasma capsulatum* mating types. **Mem Inst Osw Cruz.** v. 113, n. 10, p. e180340, 2018.

Alvarez-Perez, S. et al. Mating type and invasiveness are significantly associated in *Aspergillus fumigatus*. **Med Mycol.** v. 48, n. 2, p. 273-277, 2010.

Alves, L. R. et al. Extracellular Vesicle-Mediated RNA Release in *Histoplasma capsulatum*. **mSphere.** v. 4, p. 1-17, 2019.

Anjos, A. R. et al. 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** v. 40, p. 377–382, 2002.

Arunmozhi Balajee, S. et al. Multilocus sequence typing of *Histoplasma capsulatum* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues from cats living in non-endemic regions reveals a new phylogenetic clade. **Med Mycol.** v. 51, n. 4, p. 345-35, 2013.

Azuma, I. et al. Chemical and immunological properties of galactomannans obtained from *Histoplasma duboisii*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitidis*. **Mycopathol Mycol Appl.** v. 54, p. 111–125, 1974.

Bahr, N. C. et al. Histoplasmosis Infections Worldwide: Thinking Outside of the Ohio River Valley. **Curr Trop Med Reports.** v. 2, p. 70–80, 2015.

Barros, M. A. S. First record of *Molossus molossus* (Pallas, 1766) (Mammalia: Chiroptera) in the state of Rio Grande do Norte, northeastern Brazil. **Check List.** v. 10, n. 6, p. 1520–1524, 2014.

Bartlett, P. C. et al. Bats in the belfry: an outbreak of histoplasmosis. **Am J Public Health.** v. 72, n. 12, p. 1369- 72, 1982.

Batalha-Filho, H. M. et al. Historical climate changes and hybridization shaped the evolution of Atlantic Forest spinetails (*Aves: Furnariidae*). **Heredity.** v. 123, n. 5, p. 675-693, 2019.

Batanghari, J. W. et al. *Histoplasma* acquisition of calcium and expression of CBP1 during intracellular parasitism. **Mol Microbiol.** v. 27, n. 3, p. 531-539, 2002.

Belén, A. et al. Multilocus sequence typing. **Methods Mol Biol.** v. 551, p. 129–140, 2009.

- Bialek, R. et al. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. **J Clin Microbiol.** v. 40, n. 5, p. 1644-47, 2002.
- Bohse, M. L. et al. Expression and interstrain variability of the YPS3 gene of *Histoplasma capsulatum*. **Eukaryot Cell.** v. 6, p. 609–615, 2007a.
- Bohse, M. L. et al. RNA interference-mediated silencing of the YPS3 gene of *Histoplasma capsulatum* reveals virulence defects. **Infect Immun.** v. 75, p. 2811–2817, 2007b.
- Bohse, M. L. et al. Surface localization of the YPS3 protein of *Histoplasma capsulatum*. **Eukaryot Cell.** v. 4, p. 685–693, 2005.
- Brilhante, R. S. et al. Evaluation of the genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* isolates from north-eastern Brazil. **J Med Microbiol.** v. 61, p. 1688-1695, 2012.
- Brown, L. et al. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. **Nat Rev Microbiol.** v. 13, p. 620–630, 2015.
- Brummer, E. et al. Activation of murine polymorphonuclear neutrophils for fungicidal activity with supernatants from antigen-stimulated immune spleen cell cultures. **Infect Immun.** v. 45, p. 447-452, 1984.
- Brummer, E et al. Antifungal mechanisms of activated murine bronchoalveolar or peritoneal macrophages for *Histoplasma capsulatum*. **Clin Exp Immunol.** v. 102, p. 65-70, 1995.
- Bubnick, M. et al. MAT1 locus of *Histoplasma capsulatum* is responsive in a mating type-specific manner. **Eukaryotic Cell.** v. 6, n. 4, p. 616-621, 2007.
- Buitrago, M. J. Detection of imported histoplasmosis in serum of HIV-infected patients using a realtime PCR-based assay. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** v. 25, n. 10, p. 665-668, 2006.
- Buitrago, M. J. et al., Comparison of PCR protocols for detecting *Histoplasma capsulatum* DNA through a multicenter study. **Rev Iberoam Micol.** v. 30, n. 4, p. 256-260, 2013.
- Caceres, D. H. et al. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay that detects *Histoplasma capsulatum* antigenuria in Colombian patients with AIDS for diagnosis and follow-up during therapy. **Clin Vac Immunol.** v. 21, n. 9, p. 1364-1368, 2014.
- Campbell, C. C. et al. Virulence differences in mice of type a and b *Histoplasma capsulatum* yeasts grown in continuous light and total darkness. **Infect Immun.** v. 8, p. 677-678, 1973.

Cano, M. V. The epidemiology of histoplasmosis: a review. **Semin Respir Infect.** v. 16, n. 2, p. 109-118, 2001.

Canteros, C. E. et al. Endemic fungal pathogens in a rural setting of Argentina: seroepidemiological study in dogs. **Rev Iberoam Micol.** v. 27, n. 1, p. 14-19, 2010.

Carter, D. A. et al. Amplified single nucleotide polymorphisms and a (GA) (n) microsatellite marker reveal genetic differentiation between populations of *Histoplasma capsulatum* from the Americas. **Fungal Genet Biol.** v. 34, n. 1, p. 37-48, 2001.

Casadevall, A. et al. Vesicular transport across the fungal cell wall. **Trends Microbiol.** v. 17, p. 158–162, 2009.

Casadevall, A. et al. On the Emergence of *Candida auris*: Climate Change, Azoles, Swamps, and Birds. **mBio.** v. 10, p. e01397-19, 2019.

CDC. Histoplasmosis outbreak associated with the renovation of an old house - Quebec, Canada, 2013. **MMWR.** v. 62, n. 51-52, p. 1041-1044, 2014.

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

Cheema, M. S. et al. Virulence in an insect model differs between mating types in *Aspergillus fumigatus*. **Med Mycol.** v. 49, p. 202–207, 2011.

Chelikani, P. et al. Diversity of structures and properties among catalases. **Cell Mol Life Sci.** v. 61, p. 192-208, 2004.

Chick, E. W. et al. Hitchcock's birds, or the increased rate of exposure to *Histoplasma* from blackbird roost sites. **Chest.** v. 80, n. 4, p. 434-438, 1981.

CHIU, B. E. M. Reproducción asexual en hongos. Conidiogénesis y esporangiosporogénesis. In: TOVAR, L. M.; MARTÍNEZ, R. L.; HERNÁNDEZ, F. H. (Ed.). **Actualidades en Micología Médica.** México: Sefirot. p.12-15, 2012.

Cordero, R. J. et al., Enhanced virulence of *Histoplasma capsulatum* through transfer and surface incorporation of glycans from *Cryptococcus neoformans* during co-infection. **Sci Rep.** v. 24, n. 6, p. 21765, 2016.

Corti, M. E. et al. Disseminated histoplasmosis and AIDS: clinical aspects and diagnostic methods for early detection. **AIDS Patient Care STDS.** v. 14, n. 3, p. 149-154, 2000.

Costa, L. M. et al. Atual estado de proteção dos morcegos ameaçados de extinção no estado do Rio de Janeiro. **Oecologia Australis.** v. 23, n. 2, p. 215–233, 2019.

- Costa Neto, P. L. O. Estatística. São Paulo: **Edgard Blücher**. p. 264, 1977.
- Cox, R. A. Cell wall composition of two strains of *Blastomyces dermatitidis* exhibiting differences in virulence for mice. **Infect Immun**. v. 5, p. 449–453, 1972.
- Cunha, V. S. et al. Mucocutaneous manifestations of disseminated histoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome: particular aspects in a Latin-American population. **Clin Exp Dermatol**. v. 32, n. 3, p. 250-255, 2007.
- Cuomo, C. A. Harnessing Whole Genome Sequencing in Medical Mycology external icon. **Curr Fungal Infect Rep**. v. 11, n. 2, p. 52-59, 2017.
- Cury, G. et al. Surto de histoplasmose em Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 34, n. 5, p. 483-486, 2001.
- Damasceno, L. S. et al. Novel clinical and dual infection by *Histoplasma capsulatum* genotypes in HIV patients from Northeastern, Brazil. **Scient Rep**. v. 9, p. 1-12, 2019.
- Damasceno, L. S. et al. Disseminated histoplasmosis and aids: relapse and late mortality in endemic area in North-Eastern Brazil. **Mycoses**. v. 56, n. 5, p. 520-526, 2013.
- Darling, S. T. A protozoon general infection producing pseudotubercles in the lungs and focal necroses in the liver, spleen and lymphonodes. **JAMA**. v. 46, p. 1283-1285, 1906.
- Davies, S. F. Serodiagnosis of histoplasmosis. **Semin Respir Infect**. v. 1, p. 9–15, 1986.
- Davis, T. E. Jr. Cell wall studies of *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis* using autologous and heterologous enzymes. **Infect Immun**. v. 15, p. 978–987, 1977.
- De Monbreun, W. A. The cultivation and cultural characteristics of Darling's *Histoplasma capsulatum*. **Am J Trop Med**. v. 14, p. 93-125, 1934.
- Deepe, G. S. Immunobiological activity of recombinant H antigen from *Histoplasma capsulatum*. **Infect Immun**. v. 63, p. 3151–3157, 1995.
- Deepe, G. S. Jr. The immune response to *Histoplasma capsulatum*: unearthing its secrets. **J Lab Clin Med**. v. 123, p. 201–205, 1994.
- Deepe, G. S. Jr. Outbreaks of histoplasmosis: The spores set sail. **Plos Pathog**. v. 14, n. 9, p. e1007213, 2018.

Diaz, J. H. Environmental and Wilderness-Related Risk Factors for Histoplasmosis: More Than Bats in Caves. **Wild Environ Med.** v. 29, p. 531-540, 2018.

Dodd, K. A case of histoplasmosis of Darling in an infant. **Am J Trop Med.** v. 14, p. 127-137, 1934.

Domer, J. E. et al. Comparative study of the cell walls of the yeast like and mycelial phases of *Histoplasma capsulatum*. **J Bacteriol.** v. 94, p. 466–74, 1967.

Domer, J. E. Monosaccharide and chitin content of cell walls of *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. **J Bacteriol.** v. 107, p. 870–77, 1971.

Duarte, L. Histoplasmose. **Mem Inst Osw Cruz.** v. 43, p. 457-94, 1945.

Ehrhard, H. B. et al. Factors influencing the production of H and M antigens by *Histoplasma capsulatum*: development and evaluation of a shake culture. **Appl Microbiol.** v. 23, p. 236–49, 1972.

Eisenberg, T. et al. Detection and characterization of *Histoplasma capsulatum* in a German badger (*Meles meles*) by ITS sequencing and multilocus sequencing analysis. **Med Mycol.** v. 51, p. 337-44, 2013.

Eissenberg, L. G. *Histoplasma* variation and adaptive strategies for parasitism: new perspectives on histoplasmosis. **Clin Microbiol Rev.** v. 4, p. 411-21, 1991.

Emmons, C. W. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil. **Public Health Rep.** v. 64, n. 28, p. 892-96, 1949.

Engelthaler, D. M. et al. Next-generation sequencing of *Coccidioides immitis* isolated during cluster investigation. **Emerg Infect Dis.** v. 17, n. 2, p. 227-32, 2011.

Esbérard, C. E. L. et al. Morcegos da Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ, Sudeste do Brasil. **Rev Bra Zoo**, 2006; 8 (2): 147-153.

Espinosa-Aviles, D. et al. Molecular findings of disseminated histoplasmosis in two captive snow leopards (*Uncia uncia*). **J Zoo Wildl Med.** v. 39, n. 3, p. 450-454, 2008.

Estrada-Bárcenas, D. A. et al Genetic diversity of *Histoplasma* and *Sporothrix* complexes based on sequences of their ITS1-5.8S-ITS2 regions from the BOLD System. **Rev Iberoam Micol.** v. 31, n. 1, p. 90-94, 2014.

Faiolla, R. C. L. et al. Histoplasmosis in immunocompetent individuals living in an endemic area in the Brazilian Southeast. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 46, p. 461-465, 2013.

Falush, D. et al. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. **Science**. v. 299, p. 1582-1585, 2003.

Farrer, R. A. et al. Genome evolution and innovation across the four major lineages of *Cryptococcus.gattii*. **mBio**. v. 6, p. e00868-15, 2015.

Fava-Netto, C. et al. Epidemic histoplasmosis. New outbreak in the North of the coast of the State of Sao Paulo. Epidemiological survey with histoplasmin and paracoccidioidina. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. v. 18, n. 2, p. 108-112, 1976.

Fernandes, A. R. et al. Sepsis-like histoplasmosis in a kidney transplant patient. **J Bras Nefrol** v. 40, n. 1, p. 95-97, 2018.

Ferreira, C. S. et al. Histoplasmoze disseminada fatal. Relato de tres casos em lactentes no primeiro trimestre de vida, sendo um em neonato de três dias (histoplasmoze congênita). **J de Ped** v. 64, p. 34-40, 1988.

Ferreira, M. S. et al. Histoplasmosis. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 42, p. 2, p. 192-198, 2009.

Figueiredo, F. et al. Tumour necrosis factor production in vivo and in vitro in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions thereof. **Clin Exp Immun** v. 93, p. 189–194, 1993.

Fisher, K. L. *Histoplasma capsulatum* Strain Variation in Both H Antigen Production and β -Glucosidase Activity and Overexpression of *HAG1* from a Telomeric Linear Plasmid. **Infect Immun**. v. 67, n. 7, p. 3312–3316, 1999.

Fisher, M. C. et al. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. **Mycologia**. v. 94, p. 73–84, 2002.

Flor, A. et al., Acute pulmonary histoplasmosis in a Spanish traveller to Nicaragua: an imported disease case. **Rev Iberoam Micol**. v. 20, n. 1, p. 24-28, 2003.

Fressati, R. et al. A médium for inducing conversion of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* into its yeast-like form. **Mem Inst Osw Cruz**. v. 87, p. 53-58, 1992.

Furcolow ML. Histoplasmosis. **GP**. v. 18: p. 105-114, 1958.

Gambale, W. Morfologia, Reprodução e Taxonomia dos Fungos. In: ZAITZ, C.; CAMPBELL I.; MARQUES SA. et al (Ed.). *Compêndio de Micologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p.89-98.

Garcia, M. G. et al., Molecular evidence of cryptic speciation, historical range expansion, and recent intraspecific hybridization in the Neotropical seasonal

forest tree *Cedrela fissilis* (Meliaceae). **Mol Phylogenet Evol.** v. 61, p. 639-649, 2011.

Garcia-Vasquez, E. et al. *Histoplasma capsulatum* infeccion in a group of travelers to Guatemala. **Enferm Infecc Microbiol Clin.** v. 23, p. 274-276, 2005.

Garfoot, A. L. et al. *Histoplasma capsulatum* surmounts obstacles to intracellular pathogenesis. **FEBS J.** v. 283, n. 4, p. 619-633, 2016.

Gargano, S. et al. A temperature-sensitive strain of *Histoplasma capsulatum* has an altered delta 9-fatty acid desaturase gene. **Lipids.** v. 30, n.10, p. 899-906, 1995.

Gaur, P. K. et al. Comparative study of a new *Chrysosporium* species with *Histoplasma capsulatum*. **Sabouraudia.** v. 18, n. 2, p. 105-114, 1980.

Gomez, B. L. et al. Development of a novel antigen detection test for histoplasmosis. **J Clin Microbiol.** v. 35, p. 2618–22, 1997.

Gomez, F. J. An 80-kilodalton antigen from *Histoplasma capsulatum* that has homology to heat shock protein 70 induces cell-mediated immune responses and protection in mice. **Infect Immun.** v. 60, p. 2565–71, 1992.

Gonçalves, D. S. et al. Extracellular vesicles and vesicle-free secretome of the protozoa *Acanthamoeba castellanii* under homeostasis and nutritional stress and their damaging potential to host cells. **Virulence.** v. 31, n. 9, p. 818-836, 2018.

González-González, A. E. et al. An Hcp100 gene fragment reveals *Histoplasma capsulatum* presence in lungs of *Tadarida brasiliensis* migratory bats. **Epidemiol Infect.** v. 140, n. 11, p. 1955-1963, 2012.

Goodwin, R. A. Jr. et al. Pathogenesis and clinical spectrum of histoplasmosis. **South Med J.** v. 66, n. 1, p. 13-25, 1973.

Goodwin, R. A. et al. Histoplasmosis in normal hosts. **Medicine (Baltimore).** v. 60, n. 4, p. 231- 266, 1973.

Goughenour, K. D. et al. Quantitative Microplate-Based Growth Assay for Determination of Antifungal Susceptibility of *Histoplasma capsulatum* Yeasts. **J Clin Microbiol.** v. 53, n. 10, p. 3286-3295, 2015.

Guimarães, A. J. et al. Host membrane glycosphingolipids and lipid microdomains facilitate *Histoplasma capsulatum* internalisation by macrophages. **Cell Microbiol.** v. 21, p. e12976, 2019.

Guimarães, A. J. et al. Monoclonal antibodies to heat shock protein 60 alter the pathogenesis of *Histoplasma capsulatum*. **Infect Immun.** v. 77, p.1357–1367, 2009.

- Guimarães, A. J. et al. Biological function and molecular mapping of M antigen in yeast phase of *Histoplasma capsulatum*. **PLoS One.** ; (10): e3449.
- Guimaraes, A. J. et al. ELISA for early diagnosis of histoplasmosis. **J Med Microbiol.** v. 53, n. 6, p. 509-514, 2004.
- Guimarães, A. J et al. Surface architecture of *Histoplasma capsulatum*. **Front Microbiol.** v. 2, n. 225, p. 3383–401, 2011.
- Guimaraes, A. J.. Diagnosis of Histoplasmosis. **Braz J Microbiol.** v. 37, p. 1–13, 2006.
- Habich, C. et al. Heat shock protein 60: identification of specific epitopes for binding to primary macrophages. **FEBS Lett.** v. 580, n. 1, p. 115-120, 2006;.
- Hage, C. A. et al., A multicenter evaluation of tests for diagnosis of histoplasmosis. **Clin Infect Dis.** v. 53, n. 5, p 448-454, 2011.
- Hajjeh, R. A. Disseminated histoplasmosis in persons infected with human immunodeficiency virus. **Clin Infect Dis.** v. 21, n. 1, p. 108-110, 1995.
- Hamilton, A. J. et al. Evidence that the M antigen of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* is a catalase which exhibits cross-reactivity with other dimorphic fungi. **J Med Vet Mycol.** v. 28, p. 479–485, 1990.
- Hamilton, A. J. Serodiagnosis of histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and penicilliosis marneffeii: current status and future trends. **Med Mycol.** v. 36, n. 6, p. 351–364, 1998.
- Harris, G. S. et al. Characterization of alpha and beta tubulin genes in the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. **J Gen Microbiol.** v. 135, v. 7, p. 1817-32, 1989.
- Hearn, V. M. Structure and function of the fungal cell wall. In: Jacobs PH, Nall L, editors. Fungal Diseases: Biology, Immunology ADN diagnosis. New Your: **Marcel Dekker.** p. 27-60, 1997.
- Hensel, M. et al. Phylogenetic analysis of *Histoplasma capsulatum* var *duboisii* in baboons from archived formalin-fixed, paraffin embedded tissues. **Med Mycol.** v. 57, n. 2, p. 256-259, 2018.
- Hibbett, D. S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycol Res.** v. 111, n. 5, p. 509-547, 2007.
- Hilty, J. et al. *Histoplasma capsulatum* utilizes siderophores for intracellular iron acquisition in macrophages. **Med Mycol.** v. 49, n. 6, p. 633-42, 2011.
- Hoff, G. L. et al. The role of bats in the propagation and spread of histoplasmosis: a review. **J Wildl Dis.** v. 17, n. 2, p. 191-96, 1981.

- Hogan, L. H. et al. Altered expression of surface alpha-1,3-glucan in genetically related strains of *Blastomyces dermatitidis* that differ in virulence. **Infect Immun.** v. 62, n. 8, p. 3543–46, 1994.
- Holbrook, E. D. et al. *Histoplasma capsulatum* pathogenesis: making a lifestyle switch. **Curr Opin Microbiol**, v. 11, n. 4, p. 318-24, 2008.
- Hoog, G. S. et al. Atlas of Clinical Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn and Delft/Universitat Rovira i Virgili, Reus. **Index Fungorum.** 2007.
- Howard, B. A. Studies on the catalase of *Histoplasma capsulatum*. **Infect Immun.** v. 39, n. 3, p. 1161-66, 1983.
- Huhn, G. D. et al. Two outbreaks of occupationally acquired histoplasmosis: more than workers at risk. **Environ Health Perspect.** v. 113, n. 5, 585-9, 2005.
- Hwang, L. H. et al. *Histoplasma* requires *SID1*, a member of an iron regulated siderophore gene cluster, for host colonization. **PLoS Pathog.** v. 4, n. 4, p. e1000044, 2008.
- Ignatov, A. et al. Molecular cell biology and molecular genetics of *Histoplasma capsulatum*. **Int J Med Microbiol.** v. 292, n. 5-6, p. 349-361, 2002.
- James, T. Y. et al., Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. **Nature.** v. 443, n. 7113, p. 818-822, 2006.
- Jawale, P. M. Histoplasmosis presenting as laryngeal ulcer in a post-renal transplant male: An unusual case from India. **J Mycol Med.** v. 27, n. 4, p. 573-576, 2017.
- Jiang, B. et al. Typing of *Histoplasma capsulatum* isolates based on nucleotide sequence variation in the internal transcribed spacer regions of rRNA genes. **J Clin Microbiol.** v. 38, n. 1, p. 241-245, 2000.
- Johnson, C. H. et al. Redundancy, phylogeny and differential expression of *Histoplasma capsulatum* catalases. **Microbiol.** v. 148, n. 4, p. 1129-42, 2002.
- Gonçalves, J. et al. A survey of small mammals in the atlantic forest of the northwestern region of Rio de Janeiro state. **Oecologia Australis.** v. 20, n. 4, p. 492-500, 2016.
- Julg, B. et al. Bat-associated histoplasmosis can be transmitted at entrances of bat caves and not only inside the caves. **J Travel Med.** v. 15, n. 2, p.133-6, 2008.
- Kamei, K. et al. Induction of stress protein synthesis in *Histoplasma capsulatum* by heat low pH and hydrogen peroxide. **J Med Vet Mycol.** v. 30, n. 5, p. 385–393, 1992.

Kanetsuna, F. et al. Azuma I. Chemical and ultra structural studies on the cell walls of the yeast like and mycelial forms of *Histoplasma capsulatum*. **Mycopathol Mycol Appl.** v. 54, n. 1–13, 1974.

Karimi, K. et al., Differences in histoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome in the United States and Brazil. **J Infect Dis.** v. 186, n. 11, p. 1655-60, 2002.

Kasuga, T. et al., Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. **Mol Ecol.** v. 12, p. 3383-401, 2003.

Kasuga, T. et al. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. **J Clin Microbiol.** v. 37, n. 3, p. 653- 63, 1999.

Kauffman, C. A. Histoplasmosis. **Clin Chest Med.** v. 30, n. 2, p. 217-25, 2009.

Kauffman, C. A. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. **Clin Microbiol Rev.** v. 20, n. 1, p. 115-32, 2007.

Kaufman, L. Laboratory methods for the diagnosis and confirmation of systemic mycoses. **Clin Infect Dis.** v. 14, n. 1, p. 23-29, 1992.

Keath, E. J. et al. Typing of *Histoplasma capsulatum* by restriction fragment length polymorphisms in a nuclear gene. **J Clin Microbiol.** v. 30, n. 8, p. 2104-07, 1992;.

Klein, B. S. et al. Dimorphism and virulence in fungi. **Curr Opin Microbiol.** v. 10, p. 314-19, 2007.

Klimpel, K. R. Cell walls from avirulent variants of *Histoplasma capsulatum* lack alpha-(1,3)-glucan. **Infect Immun.** v. 56: 2997–3000, 1988.

Klite, P. D. The interpretation of agar-gel precipitin reactions in histoplasmosis. **J Lab Clin Med.** v. 66, 770–87, 1965.

Kugler, S. et al. Phenotypic variation and intracellular parasitism by *Histoplasma capsulatum*. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 97, p. 8794–98, 2000.

Kurowski, R. et al. Overview of histoplasmosis. **Am Fam Physician.** v. 15;66, n. 12, p. 2247-52, 2002.

Kwon-Chung, K. J. et al. Studies on *Emmonsella capsulata* (*Histoplasma capsulatum*). II. Distribution of the two mating types in 13 endemic states of the United States. **Am J Epidemiol.** v. 99, n. 1, p. 44-49, 1974.

Kwon-Chung, K. J. *Emmonsella capsulata*: perfect state of *Histoplasma capsulatum*. **Science**; v. 28, n. 177(4046), p. 368-69, 1972a.

Kwon-Chung, K. J. *Emmonsia capsulata*: sexual stage of *Histoplasma capsulatum*. **Science**. v. 175(4019), p. 326, 1972b.

Kwon-Chung, K. J. Studies on *Emmonsia capsulata*. I. Heterothallism and development of the ascocarp. *Mycology*. v. 65, p. 109-21, 1973.

Kwon-Chung, K. J. Virulence of the two mating types of *Emmonsia capsulata* and the mating experiments with *Emmonsia capsulata* var. *duboisii*. P. 48-56, 1981. In de Vroey C, Vanbreuseghem R (ed), *Sexuality and pathogenicity of fungi*. **Masson**, Paris, France.

Kwon-chung, K. J. et al. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 60, p. 602-605, 1992.

Kwon-Chung, K. J. Distribution of the two mating types among *Histoplasma capsulatum* isolates obtained from an urban histoplasmosis outbreak. **Sabour** v. 22, n. 2, p. 155-157, 1984.

Lacaz, C. S. et al. HP clássica. In: Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. *Tratado de Micologia Médica Lacaz*. São Paulo: **Sarvier**, p. 594-614, 2002.

Lacaz, C. S. *Tratado de Micologia Médica Lacaz*. 9.ed. Sao Paulo: **Sarvier**. p. 594-617, 2009.

Landaburu, F. et al. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains isolated from Argentina based on nucleotide sequence variations in the internal transcribed spacer regions of rDNA. **Mycoses**. v. 57, n. 5, p. 299-306, 2014.

Larsh, H. W. The epidemiology of histoplasmosis. In: Al-Doory Y, editor. *The Epidemiology of Human: Micotic Diseases*. Illinois: **Springfield**. p. 52-73, 1975.

Levitz, S. M et al. Mechanisms of resistance of *Aspergillus fumigatus* conidia to killing by neutrophils *in vitro*. **J Infect Dis**. v. 152, p. 33-42, 1985.

Lindquist, S. The heat-shock response. **Annu Rev Biochem**. v. 55, p. 1151–1191, 1986.

Lipke, P. N. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. **J Bacteriol**. v. 180, p. 3735–40, 1998.

Lodge, J. K. et al. Comparison of myristoyl CoA: protein N-myristoyltransferases from three pathogenic fungi: *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, and *Candida albicans*. **J Biol Chem**. v. 28, n. 269, p. 2996-3009, 1994.

Londero, A. T. Histoplasmosis capsulata. **JBM**. v. 55, p. 96-109, 1988.

- Long, K. H. et al. Identification of heat shock protein 60 as the ligand on *Histoplasma capsulatum* that mediates binding to CD18 receptors on human macrophages. **J Immunol.** v. 1, n. 170 (1), p. 487–94, 2003.
- Lopes, L. C. et al. A *Histoplasma capsulatum*-specific IgG1 isotype monoclonal antibody, H1C, to a 70-kilodalton cell surface protein is not protective in murine histoplasmosis. **Clin Vaccine Immunol** v. 17, n. 7, p. 1155–58, 2010.
- Macedo, P. M. et al. Clinical features and genetic background of the sympatric species *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides americana*. **Plos Negl Trop Dis.** v. 13, n. 4, p. e0007309, 2019.
- Macwilliam, I. C. The structure, synthesis and functions of the yeast cell wall – a review. **J Inst Brew.** v. 76, p. 524–35, 1970.
- Maiden, M. C. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 95, p. 3140–45, 1998.
- Maiga, A. W. et al. Mapping *Histoplasma capsulatum* Exposure, United States. **Emerg Infect Dis.** v. 24, n. 10, p. 1835-39, 2018.
- Maresca, B. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. **Contrib Microbiol.** v. 53, n. 2, p. 201-16, 2000.
- Marion, C. L. et al. An alpha-(1,4)-amylase is essential for alpha-(1,3)-glucan production and virulence in *Histoplasma capsulatum*. **Mol Microbiol.** v. 62, n. 4, p. 970-83, 2006.
- Martins, E. M. et al. Histoplasmosose pulmonar aguda: relato de uma microepidemia. **Radiol Bras.** v. 36, n. 3, p. 147-51, 2003.
- Matsuo, A. L. et al. Modulation of the exocellular serine-thiol proteinase activity of *Paracoccidioides brasiliensis* by neutral polysaccharides. **Microbes Infect.** v. 8, p. 84–91, 2006.
- Maubon, D. et al. Histoplasmosis diagnosis using a polymerase chain reaction method. Application on human samples in French Guiana, South America. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v. 58, n. 4, p. 441-44, 2007.
- McEwen, J. G. et al. Toxic effect of products of oxidative metabolism of the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Med Microbiol.** v. 18, n. 3, p. 423-28, 1984.
- McGinnis, M. R. et al. *Ajellomyces* and its synonym *Emmonsia*. **Mycotaxon.** v. 8, n. 1, p. 157-64, 1979.

Medeiros, A. I. et al. Leukotrienes are involved in leukocyte recruitment induced by live *Histoplasma capsulatum* or by the beta-glucan present in their cell wall. **Br J Pharmacol.** v. 128, p. 1529–37, 1999.

Medoff, G. et al., Irreversible block of the mycelial-to-yeast phase transition of *Histoplasma capsulatum*. **Science.** v. 31, p. 476-79, 1986.

Meloi-Bruneri, L. H. et al. Neutrophil oxidative metabolism and killing of *Paracoccidioides brasiliensis* after air pouch of susceptible and resistant mice. **J Leukoc Biol.** v. 59, p. 526-33, 1996.

Menozzi, B. D. et al. Rabies virus and *Histoplasma suramericanum* coinfection in a bat from Southeastern Brazil. **Zoo and Pub Health.** v. 67, n. 2, p.138-47, 2020.

Meyer, W. *Cryptococcus gattii* in the age of whole-genome sequencing. **mBio.** v. 6, n. 6, p. e01761-15, 2015.

Mihu, M. R. et al. *Histoplasma* virulence and host responses. **Int J Microbiol.** n. 268123, 2012.

Mittal, J. et al. *Histoplasma Capsulatum*: Mechanisms for Pathogenesis. **Curr Top Microbiol Immunol.** v. 422, p. 157-191, 2019.

Morgan, J. et al. A large outbreak of histoplasmosis among American travelers associated with a hotel in Acapulco, Mexico. **Am J Trop Med Hyg.** v. 69, n. 6, p. 663-69, 2003.

Morrison, C. J. et al. Enhanced oxidative mechanisms in immunologically activated versus elicited polymorphonuclear neutrophils: correlations with fungicidal activity. **J Med Microbiol.** v. 25, n. 2. p. 115-21, 1988.

Muniz, M. M. et al. Comparison of different DNA-based methods for molecular typing of *Histoplasma capsulatum*. **Appl Environ Microbiol.** v. 76, p. 4438–47, 2010.

Muniz, M. M. et al. 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.** v. 39, p. 4487-94, 2001.

Muniz, M. M. et al. Sexual variability in *Histoplasma capsulatum* and its possible distribution: what is going on? **Rev Iberoam Micol.** v. 31, n. 1, p. 7-10, 2014.

Muñoz, J. F. et al. Genome analysis reveals evolutionary mechanisms of adaptation in systemic dimorphic fungi. **Sci Rep.** v. 14, n. 8, p. 4473, 2018.

Murata, Y. et al. Molecular epidemiology of canine histoplasmosis in Japan. **Med Mycol.** v. 45, p. 233-47, 2007.

Nacher, M. et al. Disseminated Histoplasmosis in HIV-Infected Patients in South America: A Neglected Killer Continues on Its Rampage. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 7, n. 11, p. e2319, 2013.

Naiff, R. D. et al. Paracoccidioidomicose enzootica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no Estado do Pará. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. v. 28. P. 19-27, 1986.

Negróni, R. et al. Histoplasmosis diseminada en pacientes con SIDA, su evolución y tratamiento. **Rev Arg Micol**. v. 14, n. 5-12, 1991.

Negróni R. Histoplasmosis. In: Focaccia, R. (Ed.). Tratado de Infectología Veronesi. 3. ed. São Paulo: **Atheneu**, 2005. p. 1415-1426.

Nemecek, J. C. Global control of dimorphism and virulence in fungi. **Science** v. 312, p. 583-588, 2006.

Nguyen, V. Q. Temperature-induced switch to the pathogenic yeast form of *Histoplasma capsulatum* requires *Ryp1*, a conserved transcriptional regulator. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 105, n. 4880-4885, 2008.

Nielsen, K. et al. *Cryptococcus neoformans* a strains preferentially disseminate to the central nervous system during coinfection. **Infect Immun**, v. 73, p. 4922-4933, 2005.

Nielsen, K. et al. Sexual cycle of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and virulence of congenic α and α isolates. **Infect Immun**. v. 71, n. 9, p. 4831-4841, 2003.

Nosanchuk, J. D. et al. A role for vesicular transport of macromolecules across cell walls in fungal pathogenesis. **Commun Integr Biol**. v. 1, p. 37-39, 2008.

Nosanchuk, J. D. et al. Antibodies to a cell surface histone-like protein protect against *Histoplasma capsulatum*. **J Clin Invest**. v. 112, n. 8, p. 1164-1175, 2003.

Nosanchuk, J. D. et al. *Histoplasma capsulatum* synthesizes melanin-like pigments in vitro and during mammalian infection. **Infect Immun**. v. 70, p. 5124–5131, 2002.

Nosanchuk, J. D. et al. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 50, p. 3519–3528, 2006.

Nosanchuk, J. D. et al. *Histoplasma capsulatum* at the host-pathogen interface. **Microbes Infect**. v. 10, n. 9, p. 973-977, 2008.

Oikawa, F. et al. Histoplasmosis in the nasal septum without pulmonary involvement in a patient with acquired immunodeficiency syndrome: case report and literature review. **Sao Paulo Med J.** v. 128, n. 4, p. 236-238, 2010.

Oliveira, D. L. et al. Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. **Infect Immun.** v. 78, p. 1601–1609, 2010.

Ouchterlony, O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. **Prog Allergy.** v. 6, p. 30-154, 1962.

Pan, B. et al. Histoplasmosis: a new endemic fungal infection in China? Review and analysis of cases. **Mycoses,** v. 56, p. 212–221, 2013.

Paula, A. et al. Histoplasmoze pulmonar. Tratamento pela anfotericina B. **Brasil-Med.** v. 73, p. 13-18, 1959a.

Paula, A. Microepidemia de histoplasmoze. **Rev Serv Nac Tuberc.** v. 3, p. 11-20, 1959b.

Peching, G. et al. Histoplasmosis diseminada aguda: enfoque de manifestaciones cutaneas. **Folia Dermatol.** v. 15, n. 3, p. 172-175, 2004.

Perrotta, D. et al. Molecular characterization of autochthonous clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* using RAPD-PCR. **Rev Argent Microbiol.** v. 33, p. 3, p. 160-166, 2001.

Pietrella, D. et al. A *Candida albicans* mannoprotein deprived of its mannan moiety is efficiently taken up and processed by human dendritic cells and induces T-cell activation without stimulating proinflammatory cytokine production. *Infect Immun* 2008; 76: 4359–4367.

Pietrella, D. et al. *Candida albicans* mannoprotein influences the biological function of dendritic cells. **Cell Microbiol,** v. 8, p. 602–612, 2006.

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

Pitangui, N. S. et al. An Intracellular Arrangement of *Histoplasma capsulatum* Yeast-Aggregates Generates Nuclear Damage to the Cultured Murine Alveolar Macrophages. **Front Microbiol.** v. 11, p. 1526, 2016.

Pizzini, C. V. et al. Evaluation of a Western blot test in an outbreak of acute pulmonary histoplasmosis. **Clin Diagn Lab Immunol.** v. 6, n. 1, p. 20-23, 1999.

Pontes, L. B. et al. Clinical and evolutionary characteristics of 134 patients with disseminated histoplasmosis associated with AIDS in the State of Ceara. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 43, n. 1, p. 27-31, 2010.

Poonwan, N. 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.** v. 36, p. 3073-3076, 1998.

Porta, M. Host response and *Histoplasma capsulatum*/macrophage molecular interactions. **Med Mycol.** v. 38, n. 6, p. 399-406, 2000.

Quist, E. M. et al., Disseminated histoplasmosis with concurrent oral candidiasis in an *Eclectus parrot* (*Eclectus roratus*). **Avian Pathol.** v. 40, n. 2, p. 207-211, 2011.

Rappleye, C. A. et al. *Histoplasma capsulatum* alpha-(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the beta-glucan receptor. **Proc Natl Acad Sci USA,** v. 104, p. 1366–1370, 2007.

Rappleye, C. A. RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for alpha-(1,3)-glucan in virulence. **Mol Microbiol.** v. 53, n. 1, p. 153-165, 2004.

Reiss, E. et al. Cellular immune activity of a galactomannan-protein complex from mycelia of *Histoplasma capsulatum*. **Infect Immun.** v. 10, p. 802-809, 1974.

Reyes, M. et al. Cutaneous histoplasmosis and AIDS. **Gac Med Mex.** v. 139, p. 270–275, 2003.

Reyes-Montes, M. R. 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.** v. 37, n. 5, p. 1404-1408, 1999.

Reyes-Montes, M. R. et al. Identification of the source of histoplasmosis infection in two captive maras (*Dolichotis patagonum*) from the same colony by using molecular and immunologic assays. **Rev Argent Microbiol.** v. 41, n. 2, p. 102-104, 2009.

Ribi, E. Antigens from the yeast phase of *Histoplasma capsulatum*. I. Morphology of the cell as revealed by the electron microscope. **Exp Cell Res.** v.10, n. 2, p. 394-404, 1956.

Rickerts, V. et al. Rapid PCR-based diagnosis of disseminated histoplasmosis in an AIDS patient. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** v. 21, n. 11, p. 821-823, 2002.

Rippon, J. W. Medical Mycology: The pathogenic Fungi and the pathogenic Actinomycetes. 3th. **WB Saunders.** p. 381-423, 1988.

Rocha-Lima, H. Beitrag zur kenntnis der Blastomykoses. Lymphangitis epizootica und Histoplasmosia. **Zentralbl Bakteriolog.** v. 67, p. 233-249, 1912.

Rodrigues, M. L. et al. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. **Eukaryot Cell.** v. 7, n. 1, p. 58-67, 2008.

Rodriguez-Arellanes, G. et al., Frequency and genetic diversity of the *MAT1* Locus of *Histoplasma capsulatum* isolates in Mexico and Brazil. **Eukaryotic Cell.** v. 12, p. 1033-1038, 2013.

Ross, G. D. Role of the lectin domain of Mac-1/CR3 (CD11b/CD18) in regulating inter cellular adhesion. **Immunol Res.** v. 25, p. 219–227, 2002.

Rossini, T. F. et al. Histoplasmosse clássica: revisão. **Rev Bras Anal Clin.** v. 38, n. 4, p. 275-279, 2006.

Roth, M. T. et al. Immunization Strategies for the Control of Histoplasmosis. **Curr Trop Med Rep.** v. 2, p. 35-41, 2019.

Rua, J. A ressignificação do rural e as relações cidade-campo: uma contribuição geográfica. **Rev Angepe.** v. 2, n. 45-66, 2005.

Ruiz-Herrera, J. et al. Isolation and chemical analysis of the cell wall of *Morchella* sp. **Antonie van Leeuwenhoek.** v. 40, p. 57–64, 1974.

Saheki, M. N. et al. Primary cutaneous histoplasmosis: case report on an immunocompetent patient and review of the literature. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 41, n. 6, p. 680-682, 2008.

Saibil, H. R. Chaperone machines in action. **Curr Opin Struct Biol.** v. 18, p. 35–42, 2008.

San-Blas, G. Biochemical studies on the mycelial cell wall of *Histoplasma duboisii*. **Acta Cient Venez.** v. 28, p. 333-337, 1977.

Sanger, F. et al. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

Santoro, M. G. Heat shock factors and the control of the stress response. **Biochem Pharmacol.** v. 59, p. 55–63, 2000.

Sebghati, T. S. et al. Intracellular parasitism by *Histoplasma capsulatum*: fungal virulence and calcium dependence. **Science.** v. 290, p. 1368-1372, 2000.

Sepulveda, V. E. et al. Genome Sequences Reveal Cryptic Speciation in the Human Pathogen *Histoplasma capsulatum*. **mBio.** v. 8, n. 6, p. e01339-17, 2017.

Severo, L. C. et al. Histoplasmosis in Rio Grande do Sul, Brazil: a 21-year experience. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. v. 43, n. 4, p. 183-187, 2001.

Shearer, G. et al. Heat-shock proteins induced during the mycelial-to- yeast transitions of strains of *Histoplasma capsulatum*. **J Gen Microbiol**. v. 133, p. 3375–3382, 1987.

Shen, Q. et al. Differentiation of the fungus *Histoplasma capsulatum* into a pathogen of phagocytes. **Curr Opin Microbiol**. v. 40, p. 1-7, 2017.

Shikanai-Yasuda, M. A. et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 50, n. 5, p. 715-740, 2017.

Souza, R. F. et al. Bats (Mammalia, Chiroptera) in a remnant of Atlantic Forest, Rio de Janeiro, southeastern Brazil. **Neotrop Biol Conserv**. v. 10, n. 1, p. 9-14, 2015.

Spitzer, E. D. et al. Use of mitochondrial and ribosomal DNA polymorphism to classify clinical and soil isolates of *Histoplasma capsulatum*. **Infect Immun**. v. 57, p. 1409-1412, 1989.

Steenbergen, J. N. et al. *Cryptococcus neoformans* interactions with *amoebae* suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proc of Nat Acad of Sci USA**. v. 18, p. 15245-15250, 2001.

Sully, M. C. et al. Epidemiology of Histoplasmosis. **Cur Fung Infect Rep**. v. 12, n. 3, p. 1-8, 2018.

Suzaki, A. et al. An outbreak of acute pulmonary histoplasmosis among travelers to a bat-inhabited cave in Brazil. **Kansenshogaku Zasshi**. v. 69, n. 4, p. 444-449, 1995.

Taborda, C. P. et al. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a mini review. **Mycopathol**. v. 165, p. 331-339, 2008.

Tamura, M. et al. Phylogenetic characterization of *Histoplasma capsulatum* strains based on ITS region sequences, including two new strains from Thai and Chinese patients in Japan. **Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi**. v. 43, n. 1, p. 11-19, 2002.

Taylor, M. et al. Identification of the infections source of an unusual outbreak of histoplasmosis, in hotel in Acapulco, state of Guerrero, Mexico. **FEMS Immunol Med Microbiol**. v. 45, p. 435-441, 2005b.

Taylor, M. L. et al. Ecology and molecular epidemiology findings of *Histoplasma capsulatum* in Mexico. In: Research Advance in Microbiology, (ed. Mojan RM, Benedik M). Kerala: **Global Research Network**. p. 29-35, 2000b.

Taylor, M. L. et al. Environmental conditions favoring bat infections with *Histoplasma capsulatum* in Mexican shelters. **Am J Trop Med Hyg**. v. 61, p. 914–919, 1999.

Taylor, M. L. et al. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats randomly captured in Mexico, Brazil, and Argentina, using the polymorphism of (GA)_n microsatellite and its flanking regions. **Fungal Biol**. v. 116, p. 308-317, 2012.

Taylor, M. L. et al. Geographical distribution of genetic polymorphism of the pathogen *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in a central zone of Mexico. **FEMS Immunol Med Microbiol**. v. 45, p. 451–458, 2005a.

Taylor, M. L. et al. Identification of the infection source of an unusual outbreak of histoplasmosis, in a hotel in Acapulco, state of Guerrero, Mexico. **FEMS Immunol Med Microbiol**. v. 45. p. 435–441, 2005b.

Taylor, M. L. et al. Molecular typing of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in Mexico. **Fungal Genet Biol**. v. 30, p. 207–212, 2000a.

Taylor, M. L. Biological and sociocultural approaches of histoplasmosis in the State of Guerrero, Mexico. **Mycoses**. v. 39, n. 9-10, p. 375-379, 1996.

Teixeira, M. M. et al. *Paracoccidioides* species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. **PLOS Pathog**. v. 30, p. 10(10), p. e1004397, 2014.

Teixeira, M. M. et al. Worldwide Phylogenetic Distributions and Population Dynamics of the Genus *Histoplasma*. **PLOS Negl Trop Dis**. v. 10, n. 6, p. e0004732, 2016.

Tewari, R. P. et al. Comparative pathogenicity of albino and brown types of *Histoplasma capsulatum* for mice. **J Infect Dis**. v. 125, n. 5, p. 504-508, 1972.

Theel, E. S. et al. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of *Histoplasma capsulatum* antigen from urine specimens. **J Clin Microbiol**. v. 51, n. 11, p. 3555-3559, 2013.

Theel, E. S. et al. Clinical significance of low-positive *Histoplasma* urine antigen results. **J Clin Microbiol**. v. 52, n. 9, p. 3444-3446, 2014.

- Thomaz, L. et al. *Galleria mellonella* as a model host to study *Paracoccidioides lutzii* and *Histoplasma capsulatum*. **Virulence**. v. 15, n. 4 (2), 139–146, 2013.
- Trevijano-Contador, N. et al. Immune Response of *Galleria mellonella* against Human Fungal Pathogens. **J Fungi (Basel)**. v. 5, n. 1, p. 3, 2018.
- Turissini, D. A. et al. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. **Fungal Genet Biol**. v. 106, p. 9-25, 2017.
- Ulloa, M. et al. Contribution to the study of the mycobiota present in the natural habitats of *Histoplasma capsulatum*: an integrative study in Guerrero, Mexico. **Rev Mex Biodiver**. v. 77, p. 153-168, 2006.
- Unis, G. et al. Disseminated histoplasmosis in Rio Grande do Sul. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 37, n. 6, p. 463-468, 2004.
- Valero, C. et al. African histoplasmosis: new clinical and microbiological insights. **Med Mycol**. v. 56, n. 1, p. 51-59, 2018.
- Van Dyke, M. C. C. Fantastic yeasts and where to find them: the hidden diversity of dimorphic fungal pathogens. v. 52, p. 55-63, 2019.
- VanDuin, D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 46, n. 3394–3400, 2002.
- Vicentini-Moreira, A. P. et al. Microepidemia de histoplasmose no Município de Arapeí, São Paulo. **BEPA**. v. 5, n. 58, p. 8-11, 2008.
- Vilela, E. et al. Histoplasmose em criança no estado de Minas Gerais. **Rev Bras Biol**. v. 1, p. 449-456, 1941.
- Vincent, R. D. et al. Classification of *Histoplasma capsulatum* isolates by restriction fragment polymorphisms. **J Bacteriol**. v. 165, n. 3, p. 813-818, 1986.
- Vité-Garin, T. et al. The importance of molecular analyses for understanding the genetic diversity of *Histoplasma capsulatum*: An overview. **Rev Iberoam Micol**. v. 31, p. 11-15, 2014.
- Wanke, B. Histoplasmose: Estudo Epidemiológico, Clínico e Experimental. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 1985.
- Washburn, A. M. et al. Cave sickness, a new disease entity? **Am J Public Health Nations Health**. v. 38, v. 11, p. 1521-1526, 1948.
- Wheat, L. J. et al. Diagnosis of histoplasmosis by antigen detection based upon experience at the histoplasmosis reference laboratory. **Diagn Microbiol Infect Dis**. v. 43, n. 1, p. 29-37, 2002.

Wheat, L. J. et al. Evaluation of cross-reactions in *Histoplasma capsulatum* serologic tests. **J Clin Microbiol.** v. 23, n. 3, p. 493-499, 1986.

Wheat, L. J. et al. Histoplasmosis. **Infect Dis Clin North Am.** v. 30, p. 207–227, 2016.

Wheat, L. J. et al. Practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis. Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis.** v. 30, n. 4, p. 688-695, 2000.

Wheat, L. J. et al. Pulmonary histoplasmosis syndromes: recognition, diagnosis, and management. **Semin Respir Crit Care Med.** v. 25, n. 2, p. 129-144, 2004.

Wheat, L. J. et al. Histoplasmosis. **Infect Dis Clin North Am.** v. 17, n. 1, p. 1-19, 2003.

Wheat, L. J. et al. Diagnosis of disseminated histoplasmosis by detection of *Histoplasma capsulatum* antigen in serum and urine specimens. **N Engl J Med.** v. 314, n. 2, p. 83-88, 1986.

Wheat, L. J. Current diagnosis of histoplasmosis. **Trends Microbiol.** v. 11, p. 488-494, 2003.

Wheat, L. J. Histoplasmosis. Experience during outbreaks in Indianapolis and review of the literature. **Medicine (Baltimore).** v. 76, n. 5, p. 339-354, 1997.

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

Woods, J. P. et al. Fast DNA isolation from *Histoplasma capsulatum*: methodology for arbitrary primer polymerase chain reaction-based epidemiological and clinical studies. **J Clin Microbiol.** v. 31, n. 2, p. 463-464, 1993.

Wu, C. Heat shock transcription factors: structure and regulation. **Annu Rev Cell Dev Biol.** v. 11, p. 441–469, 1995.

Zámocky, M. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. **Prog in Bioph and Mol Biol.** v. 72, n. 1, p. 19-66, 1999.

Zancope-Oliveira, R. M. et al. Effects of histoplasmin M antigen chemical and enzymatic deglycosylation on cross-reactivity in the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot method. **Clin Diagn Lab Immunol.** v. 1, n. 4, p. 390-393, 1994.

Zancope-Oliveira, R. M. et al. *Histoplasma*. In: Liu B, editor. Molecular detection of human fungal pathogens. Boca Raton: **CRC Press.** 2011.

Zancopé-Oliveira, R. M. et al. Molecular cloning, characterization, and expression of the M antigen of *Histoplasma capsulatum*. **Infect Immun.** v. 67, p. 1947–1953, 1999.

Zancope-Oliveira, R. M. et al. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains in Brazil. **FEMS Immunol Med Microbiol.** v. 45, n. 3, p. 443-449, 2005.

Zancope-Oliveira, R. M. et al. In: Coura JR, editor. Dinamica das doencas infecciosas e parasitarias. 2 ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan.** p. 1238-1249, 2013.

Zancope-Oliveira, R. M. et al. Isolamento do *Histoplasma capsulatum* de animais silvestres no Municipio do Rio de Janeiro. **Cad Saúde Pública.** v. 2, n. 1, p. 42-52, 1986.

Zarnowski, R. et al. *Candida albicans* biofilm–induced vesicles confer drug resistance through matrix biogenesis. **PLOS Biol.** v. 16, n. 10, p. e2006872, 2018.

Zarnowski, R. et al. Typing of *Histoplasma capsulatum* strains by fatty acid profile analysis. **J Med Microbiol.** v. 56, p. 788-797, 2007.

Zhang, D. et al. Virulence, Molecular Diversity, and Mating Type of *Curvularia lunata* in China. **Plant Disease.** v. 103, n. 1728-1737, 2019.

Produções Bibliográfica ao longo do Doutorado