



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

GABRIELA COSTA MAIA PINTO

**CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE ISOLADOS DE *Histoplasma capsulatum*  
CIRCULANTES NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

Rio de Janeiro

2015

**CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE ISOLADOS DE *Histoplasma capsulatum*  
CIRCULANTES NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

GABRIELA COSTA MAIA PINTO

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Pesquisa Clínica de Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dra. Rosely Maria Zancopé-Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Paes

Rio de Janeiro

2015

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Dra Rosely Maria Zancopé Oliveira e meu co-orientador Rodrigo de Almeida Paes por todas as orientações e ensinamentos ao longo destes dois anos de trabalho. Jamais teria chegado até aqui sem o precioso auxílio que tive de ambos. Deixo registrado aqui minha gratidão por tudo. Muito obrigada.

À equipe do laboratório de Imunodiagnóstico, Mauro, Cláudia, Marcos, Manoel, Luã, Fernando, Vitor, Lisandra, Leonardo, Jéssica, Gabriela e Vanessa, o meu sincero agradecimento pela companhia e auxílio nas atividades experimentais executadas no laboratório e no esclarecimento de dúvidas que surgiram, e que foram muitas. Em especial ao Marcos, que foi em muitas vezes meu braço direito e esquerdo na execução das técnicas imunológicas.

Aos amigos do laboratório de Diagnóstico Micológico, Fábio, Helena, Rowena, Amile, Gabriela, Marcela e Mônica por todas as horas agradáveis de relaxamento entre os experimentos e por todo o incentivo nos momentos de desânimo quando tudo parecia dar errado. Vocês foram responsáveis por tornar estes dias mais leves.

À minha família que foi em muitos momentos o meu alicerce que compreendeu muitas das minhas ausências em eventos e almoços. À minha mãe Maria do Socorro que foi meus ouvidos nos momentos de desabafo, meu irmão Igor e minha cunhada Lilia pelos momentos de distração e ao meu sobrinho Marcos Vinícius pelas risadas proporcionadas. Amo todos vocês.

À todos os amigos que participaram destes dois anos contribuindo da forma que puderam e que não caberiam nestas páginas, através de conversas, incentivos, presentes como chocolate, abraços e carinhos. Muito obrigado a todos. Feliz daquele que tem um amigo, e os que eu tenho são os melhores que alguém poderia ter. Obrigado a todos.

Pinto, G C M. **Características fenotípicas de isolados de *Histoplasma capsulatum* circulantes no Estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, 2015. 70f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

## RESUMO

*Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, agente da histoplasmose clássica, é encontrado com grande frequência no continente americano, sendo o Estado do Rio de Janeiro no Brasil, uma área endêmica da doença. Entretanto, a incidência real da histoplasmose no Brasil é desconhecida, uma vez que esta micose não está incluída na lista de doenças de notificação compulsória. Casos de histoplasmose são subestimados, provavelmente pelo diagnóstico laboratorial inconclusivo desta micose, o que nos leva a especular a possibilidade de associação desses fenótipos a diferentes formas clínicas. Além disso, alguns estudos demonstraram diferenças fenotípicas e genotípicas em isolados de *H. capsulatum* de diferentes regiões geográficas do país. Sendo assim, através do presente estudo buscamos caracterizar os perfis fenotípicos de isolados de *H. capsulatum* circulantes no Estado do Rio de Janeiro. Para esta avaliação foram utilizados 30 isolados de *H. capsulatum* de origem clínica, incluindo isolados de seres humanos e animais, e ambientais. A metodologia utilizada para a caracterização dos isolados incluiu a descrição de características macro e micromorfológicas *in vitro*, a capacidade de crescimento em pH ácido e básico, produção de melanina e urease, capacidade de conversão da fase miceliana à leveduriforme, produção de exoantígenos e a classificação em fenótipo albino ou *brown*. A capacidade de conversão foi variável nos isolados, sendo o meio ML-GEMA o mais indicado para esta técnica, e características morfológicas clássicas, como presença de macroconídios e microconídios foram identificadas nos isolados. Todos os isolados apresentaram produção de pelo menos um tipo de melanina e urease e a capacidade de crescer em diferentes valores de pH, tais como 4,0, 5,5, 7,0 e 10,0. A presença de antígenos específicos de *H. capsulatum* foi verificada em 28 isolados, sendo 22 para o antígeno M e seis para ambos os antígenos H e M na técnica de western-blot e em apenas um isolado por imunodifusão dupla, apresentando reatividade para o antígeno M. A maioria dos isolados (n=28) apresentou fenótipo *brown* quando semeados em meio Sabouraud modificado acrescido de roxo de bromocresol. Podemos concluir que a caracterização morfológica, associada à pesquisa de antígenos pela técnica de western-blot são ferramentas úteis para a caracterização de isolados de *H. capsulatum* e que a produção de melanina e urease podem ser avaliadas em estudos futuros como fatores de virulência.

Palavras-chave: **1. *Histoplasma capsulatum*. 2. Fenotipagem. 3. Melanina. 4. Urease. 5. Fenótipos.**

Pinto, G C M. **Phenotypic characteristics of isolates of *Histoplasma capsulatum* circulating in the State of Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, 2015. 70f. Master [Science Dissertation in Clinic research in Infectious Diseases] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

## ABSTRACT

*Histoplasma capsulatum*, agent of classical histoplasmosis, is found frequently in the Americas, and the State of Rio de Janeiro in Brazil is considered endemic area of this disease. However, the actual incidence of histoplasmosis in Brazil is unknown, as this mycosis is not included in the list of reportable diseases. Cases of histoplasmosis are underestimated, probably due to inconclusive laboratory diagnosis of this mycoses. In addition, some studies have shown phenotypic differences in isolates of *H. capsulatum* from different geographic regions of the country, which leads us to speculate the possibility of association of these phenotypes to different clinical forms of the disease. Thus, in the present study we sought to characterize the phenotypic profiles of isolates of *H. capsulatum* circulating in the State of Rio de Janeiro. For this evaluation 30 *H. capsulatum* isolates of clinical, animal and environmental origin were included in this study. The methodology used for the characterization of the isolates included the description of macro and micromorphological characteristics in vitro, the growth capacity in acid and basic pH, melanin and urease production, ability to convert from mycelial to yeast phase, exoantigens production and classification in albino or *brown* phenotype. The conversion capacity was variable, isolate-dependent, and the medium ML-GEMA was the most indicated for this technique. Classical morphological characteristics such as the presence of macroconidia and microconidia were identified in the isolates. All isolates showed production of urease, and at least one type of melanin, and the ability to grow at different pH values such as 4.0, 5.5, 7.0 and 10.0. The presence of *H. capsulatum*'s antigens was verified in 28 isolates, 22 isolates presented M antigen, and six H and M antigens on a Western blot technique and in one isolated M antigen was demonstrated by double immunodiffusion. Most isolates showed *brown* phenotype (n = 28) when plated on modified Sabouraud broth with bromocresol purple. We conclude that the morphological characterization associated with the antigens search by western blot technique are useful tools for the characterization of isolates of *H. capsulatum* and melanin and urease production can be tested in future studies as virulence factors.

**Key-words:** 1. *Histoplasma capsulatum*. 2. Phenotyping. 3. Melanin. 4. Urease. 5. Phenotypes

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

<b>Figura 1</b> - Imagem representativa da parede celular de <i>H. capsulatum</i>	16
<b>Figura 2</b> - Imagem representativa dos aspectos macromorfológicos da fase filamentosa	43
<b>Figura 3</b> - Imagem representativa dos aspectos macromorfológicos da fase leveduriforme	43
<b>Figura 4</b> - Micromorfologia da fase filamentosa dos isolados de <i>H. capsulatum</i> do Rio de Janeiro	44
<b>Figura 5</b> - Micromorfologia da fase leveduriforme dos isolados de <i>H. capsulatum</i> do Rio de Janeiro	44
<b>Figura 6</b> - Avaliação da conversão micélio-levedura nos isolados de <i>H. capsulatum</i>	45
<b>Figura 7</b> - Imagem representativa da análise qualitativa da produção de uréase	47
<b>Figura 8</b> - Imagem representativa da avaliação de fenótipos albino e <i>brown</i>	48
<b>Figura 9</b> - Produção de eumelanina em isolados de <i>H. capsulatum</i> do Rio de Janeiro	51
<b>Figura 10</b> - Produção de piomelanina em isolados de <i>H. capsulatum</i> do Rio de Janeiro	52
<b>Figura 11</b> - Fluxograma comparativo entre imunodifusão dupla e western-blot	53
<b>Figura 12</b> - Imagem representativa de western-blot para amostras de <i>H. capsulatum</i>	54
<b>Figura 13</b> - Imunodifusão em gel de agarose	54

**LISTA DE TABELAS E QUADROS**

<b>Tabela 1</b> - Crescimento dos isolados de <i>H. capsulatum</i> em diferentes níveis de pH	49
<b>Quadro 1</b> - Relação dos isolados de <i>H. capsulatum</i> do Rio de Janeiro	37

**LISTA DE GRÁFICOS**

- Gráfico 1** - Porcentagem de conversão micélio-levedura nos isolados de *H. capsulatum* do Rio de Janeiro 46
- Gráfico 2** - Quantificação da produção de urease através da distribuição das leituras de D.O. dos isolados de *H. capsulatum* do Rio de Janeiro 48
- Gráfico 3** – Produção de piomelanina em isolados de *H. capsulatum* do Rio de Janeiro 52

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	12
1.1 HISTÓRICO	12
1.2 O FUNGO <i>HISTOPLASMA CAPSULATUM</i>	13
1.2.1 HABITAT	14
1.2.2 MORFOLOGIA	14
1.2.3 PAREDE CELULAR	15
1.2.4 FATORES DE VIRULÊNCIA	16
1.2.4.1 DIMORFISMO	16
1.2.4.2 PROTEÍNA LIGANTE DE CÁLCIO (CBP)	17
1.2.4.3 ALFA -1,3-GLUCANA	17
1.2.4.4 MOLÉCULAS EXTRACELULARES	19
1.2.4.5 MELANINAS	19
1.2.4.5.1 MELANINA DHN	19
1.2.4.5.2 EUMELANINA	20
1.2.4.5.3 PIOMELANINA	21
1.2.4.6 UREASE	21
1.3 A HISTOPLASMOSE	22
1.3.1 EPIDEMIOLOGIA	22
1.3.2 PATOGENIA	23
1.3.3 FORMAS CLÍNICAS	25
1.3.3.1 INFECÇÃO SUBCLÍNICA (ASSINTOMÁTICA)	26
1.3.3.2 HISTOPLASMOSE AGUDA	26
1.3.3.3 HISTOPLASMOSE DISSEMINADA	26
1.3.3.3.1 HISTOPLASMOSE DISSEMINADA AGUDA (TIPO INFANTIL)	27
1.3.3.3.2 HISTOPLASMOSE DISSEMINADA SUBAGUDA (TIPO JUVENIL)	27
1.3.3.3.3 HISTOPLASMOSE DISSEMINADA CRÔNICA (TIPO ADULTO)	27
1.3.3.4 HISTOPLASMOSE OPORTUNÍSTICA	27
1.3.3.5 HISTOPLASMOSE PULMONAR CRÔNICA	28
1.3.3.6 HISTOPLASMOSE GRANULOMATOSE E FIBROSE MEDIASTÍNICA	28
1.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	28
1.4.1 EXAME DIRETO	28
1.4.2 EXAME HISTOPATOLÓGICO	29

1.4.3 CULTURA	29
1.4.4 IMUNODIAGNÓSTICO	30
1.4.5 DIAGNÓSTICO MOLECULAR	31
1.5 TRATAMENTO	31
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	<b>33</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
3.1 OBJETIVO GERAL	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>36</b>
4.1 DESENHO DO ESTUDO	36
4.2 AMOSTRAGEM	36
4.3 FENOTIPAGEM	38
4.3.1 CARACTERIZAÇÃO MACRO E MICROMORFOLÓGICA DOS ISOLADOS	38
4.3.2 CONVERSÃO MICÉLIO-LEVEDURA	38
4.3.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE UREASE	38
4.3.4 DIFERENCIAÇÃO EM FENÓTIPO ALBINO E <i>BROWN</i>	39
4.3.5 CRESCIMENTO EM PH ÁCIDO E BÁSICO	39
4.3.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MELANINA	39
4.3.7 PESQUISA DE EXOANTÍGENOS	40
4.3.7.1 PRODUÇÃO DE EXOANTÍGENOS	40
4.3.7.2 ANÁLISE DE EXOANTÍGENOS POR IMUNODIFUSÃO DUPLA	40
4.3.7.3 ANÁLISE DE EXOANTÍGENOS POR <i>WESTERN-BLOT</i>	41
4.3.8 PLANO DE ANÁLISE	41
4.3.9 ANÁLISE DE FENÓTIPOS IDÊNTICOS	41
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>42</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO MACRO E MICROMORFOLÓGICA DOS ISOLADOS	42
5.2 CONVERSÃO MICÉLIO-LEVEDURA	45
5.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE UREASE	46
5.4 DIFERENCIAÇÃO EM FENÓTIPO ALBINO E BROWN	48
5.5 CRESCIMENTO EM PH ÁCIDO E BÁSICO	49
5.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MELANINA	49
5.6.1 MELANINA DHN	50
5.6.2 EUMELANINA	50
5.6.3 PIOMELANINA	51

5.7 PESQUISA DE EXOANTÍGENOS	53
5.8 ANÁLISE DE FENÓTIPOS IDÊNTICOS	54
<b>6 DISCUSSÃO</b>	55
<b>7 CONCLUSÕES</b>	60
<b>8 REFERÊNCIAS</b>	61
<b>ANEXO A</b> – Resultados obtidos nas análises fenotípicas de isolados de <i>H. capsulatum</i> incluídos no estudo, com exceção do crescimento em pH ácido e básico	70

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 HISTÓRICO

A descoberta do fungo *Histoplasma capsulatum* foi realizada em 1905, por um patologista americano, Samuel Taylor Darling, quando trabalhava no Ancon Hospital, durante a construção do Canal do Panamá (DARLING, 1906, 1909). Darling, ao realizar necropsia de um homem negro, adulto, nativo da Martinica, que havia falecido de uma doença febril, originalmente atribuída à tuberculose miliar, verificou a presença de numerosos corpúsculos intracelulares com cápsulas, no interior dos alvéolos pulmonares e de macrófagos e histiócitos de baço, fígado, linfonodos e medula óssea, semelhantes a espécies de *Leishmania*, descritas por Leishman e Donovan, porém sem cinetoplasto. Em razão desse fato, pensava tratar-se de um novo protozoário intracelular encapsulado, o qual denominou de *Histoplasma capsulatum* (DARLING, 1906, 1909). Posteriormente, Darling examinou mais dois pacientes, e verificou que todos apresentavam emagrecimento extremo, esplenomegalia, febre, leucopenia e anemia. Os achados patológicos evidenciaram invasão de células endoteliais e vasos sanguíneos por *H. capsulatum*, causando necrose hepática com cirrose, pseudogranuloma em pulmões e intestinos, e necrose de linfonodos.

Em 1912, Rocha Lima realizando estudo comparativo utilizando amostra de Darling e de um caso suspeito de calazar, concluiu que *H. capsulatum* deveria ser considerado fungo e não um protozoário (ROCHA-LIMA, 1912).

DeMonbreun, em 1934, diagnosticou o primeiro caso ainda em vida. Isolou o microrganismo em meio de cultura, observou o crescimento em temperatura ambiente e a 37°C, nas fases miceliana e leveduriforme, comprovando assim, sua natureza fúngica e seu caráter dimórfico (DEMONBREUM, 1934).

Em 1948, Emmons isolou o fungo, pela primeira vez, em amostras de terra obtidas de solo de um galinheiro na entrada de uma toca de camundongos (EMMONS, 1949). Em 1960, o mesmo pesquisador, voltou a isolar o fungo em solo de um parque urbano no centro de Washington/EUA (EMMONS, 1961).

No Brasil, o primeiro caso isolado de *H. capsulatum* foi obtido por Almeida e Lacaz (1939) com o cultivo de um fragmento de biópsia de uma lesão suspeita de cromomicose. Os mesmos autores descreveram o segundo isolamento, em 1941, em escarro de um paciente com tuberculose (ALMEIDA; LACAZ, 1941).

## 1.2 O FUNGO *Histoplasma capsulatum*

A espécie *H. capsulatum* possui três variedades: *H. capsulatum* var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii* e *H. capsulatum* var. *farciminosum*, as duas primeiras patogênicas ao homem e a última está associada a uma infecção endêmica em equinos na África e Ásia (SELIM, 1985; LACAZ, 1998).

*Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, agente etiológico da histoplasmose clássica, é um fungo dimórfico, termo-tolerante. Atualmente, com base na análise das subunidades 18S, 28S e 5.8S do RNA ribossomal (Rrna), EF1 $\alpha$  (fator de alongação-1 $\alpha$ ), RPB1 e RPB2 (subunidades da RNA polimerase II), tem sido proposto que a espécie *H. capsulatum* seja classificada no Filo Ascomycota, dentro da classe Eurotiomycetes, ordem Onygenales, famílias Onygenaceae e/ou Ajellomycetaceae (HIBETT et al., 2007).

*H. capsulatum* var. *duboisii* foi descrito pela primeira vez em 1952 por Dubois, ao isolar o fungo de lesões cutâneas, na região do antigo Congo Belga, atual República Democrática do Congo, no continente africano. Porém esta espécie é restrita à África, não sendo observados casos de infecção pela mesma em outras regiões geográficas (LACAZ, 1998).

A espécie *H. capsulatum* (forma assexuada anamorfa) é um organismo eucarioto heterotático que apresenta micélio com hifas haplóides, associadas a uma determinada compatibilidade sexual, os *mating types* (+) “major” ou (-) “minor”. *H. capsulatum*, com suas três variedades, apresenta um estado sexual ou perfeito (forma teleomorfa) que resulta no cruzamento de seus *mating types* e constitui a espécie *Ajellomyces capsulatus*. *Histoplasma* e *Ajellomyces* constituem um fungo holomorfo (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). Tem-se descrito na literatura especializada que há predominância do *mating* (-) em *H. capsulatum* provenientes de casos clínicos, principalmente nos Estados Unidos, embora na natureza exista igual proporção de ambos os tipos de compatibilidade sexual: *mating* (-) e *mating* (+). *In vitro*, a conversão da fase micelial à leveduriforme foi mais eficiente em isolados de *mating* (-) (KWON-CHUNG et al., 1974; KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). No Brasil, estudo recente indica predominância de isolados de *H. capsulatum* *mating* (+), enquanto no México de isolados de *mating* (-), demonstrando haver relação da distribuição destes isolados com questões epidemiológicas (MUNIZ et al., 2014).

Estudo das relações filogenéticas de isolados de *H. capsulatum* e suas variantes de diferentes regiões geográficas revelou oito grupos filogenéticos de *H. capsulatum*: Nam 1 (classe 1 do clado da América do Norte), Nam 2 (classe 2 do clado da América do Norte), Lam A (clado A do grupo latino-americano), Lam B (clado B do grupo latino-americano),

África (clado africano), Eurásia (clado euro-asiático), Netherlands (clado holandês) e Austrália (clado australiano) todos baseados em análises moleculares de quatro genes codificadores de proteínas: *olé*, *arf*, *tub1* e *H-anti* (KASUGA et al., 1999) Dos sete grupos avaliados, sete representavam grupos geneticamente isolados, podendo ser considerados espécies filogenéticas, com exceção do clado Eurásia, que parece ter sua origem no clado Lam A. *H. capsulatum* var. *duboisii* foi encontrado apenas em amostras obtidas do clado Africano, *H. capsulatum* var. *farciminosum* em apenas três cladogramas (África, Eurásia e Nam2), ao passo que *H. capsulatum* var. *capsulatum* foi encontrado em todos os cladogramas do estudo (KASUGA et al., 2003).

### 1.2.1 HABITAT

*H. capsulatum* tem o solo como seu habitat. Alguns fatores determinam a distribuição focal de *H. capsulatum* em natureza, havendo, geralmente, associação de seu isolamento com microambientes abrigados como cavernas, construções abandonadas, galinheiros, árvores ou quaisquer outros locais onde o solo possa estar enriquecido com fezes de morcegos, galinhas e outras aves gregárias. Esta relação é devida ao alto teor de ácido úrico encontrado nestes excrementos, sendo este componente utilizado como fonte de nitrogênio pelo fungo, imprescindível ao seu crescimento e proliferação. Além disto, tais micronichos geralmente apresentam condições de temperatura, umidade, e acidez do solo que propiciam um ambiente favorável para o desenvolvimento da fase miceliana de *H. capsulatum*, que constitui sua forma infectiva (EISSENBERG; GOLDMAN, 1991; KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2013). Com raras exceções, este fungo infecta seus hospedeiros por via respiratória através da inalação de conídios e fragmentos de hifas que o fungo produz em seu habitat natural.

### 1.2.2 MORFOLOGIA

Em seu ambiente natural, o solo, ou quando cultivado abaixo de 35°C, *H. capsulatum* apresenta-se inicialmente como colônias filamentosas brancas, com aspecto algodoado, representados microscopicamente como uma trama de hifas hialinas, septadas e ramificadas, além de apresentarem estruturas de propagação assexuada, os conídios, que estão presentes tanto lateralmente como nas extremidades terminais das hifas. Parte destes propágulos, conhecidos como macroconídios, apresentam-se como estruturas globosas, que possuem de 8

a 16  $\mu\text{m}$  de diâmetro, de parede lisa que, com o envelhecimento da colônia, desenvolvem numerosas projeções semelhantes a tubérculos, em toda a sua superfície, sendo denominados como macroconídios tuberculados (PINE, 1960). Os microconídios são estruturas ovaladas medindo de 2 a 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, com paredes lisas, nascidos na extremidade de curtos conidióforos em ângulo reto com a hifa vegetativa. Estas estruturas de propagação apresentam grande resistência aos fatores adversos do meio ambiente, são facilmente carregados por correntes aéreas, com isso dispersando-se a grandes distâncias (CHICK et al., 1981). Os microconídios são os elementos infectantes mais eficientes, pois possuem tamanho reduzido e penetram mais facilmente nos alvéolos pulmonares, assim como também por se destacarem das hifas com mais facilidade.

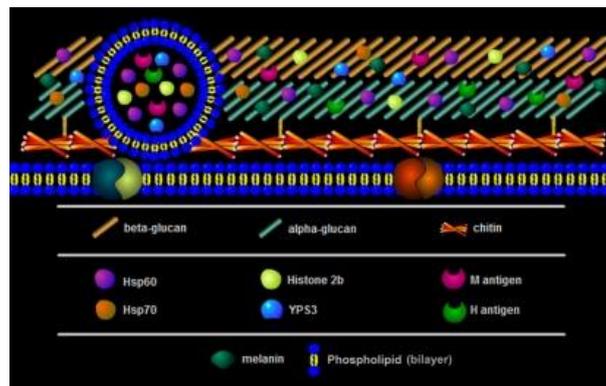
Quanto à morfologia, *H. capsulatum* na sua fase miceliana pode ser dividido em 2 tipos: tipo A ("albino") cujas colônias apresentam micélio aéreo de aspecto cotonoso, de coloração branca a bege-clara, com pouca produção de estruturas de propagação e o tipo B ("brown") pouco filamentososo, de coloração acastanhada e com grande número de propágulos; à microscopia são observadas hifas hialinas septadas e presença de macro e microconídios em diferentes estágios evolutivos (BERLINER, 1973b). Já em sua fase leveduriforme, o aspecto das colônias é úmido, de coloração branco-amarelada, rugosas (colônia selvagem) e/ou lisas (variante espontânea) que à microscopia se apresentam como elementos ovais unibrotantes de 2 a 4  $\mu\text{m}$  (PINE, 1960; EDWARDS, 1960; BERLINER, 1973b; EISSENBERG; GOLDMAN, 1991).

### 1.2.3 PAREDE CELULAR

A composição estrutural da parede celular de *H. capsulatum* é bem complexa, e de grande importância, uma vez que esta representa a estrutura fúngica que interage com o ambiente e com o hospedeiro. É composta por carboidratos como quitina,  $\alpha$ -1,3-glucana,  $\beta$ -1,3-glucana, galactomanana, manoproteínas e lectina; lipídeos como ceramida monohexosida e vesículas extracelulares, proteínas como HSP 60, HSP 70, antígenos M e H, YPS3, histona H2B e melanina (GUIMARÃES et al., 2011). Estes componentes podem atuar como suporte, conferindo rigidez ou flexibilidade à parede celular e protegendo o fungo contra fatores ambientais e do hospedeiro, ou podem ainda representar fatores de virulência. Na fase filamentosa de *H. capsulatum*, o principal componente observado na parede celular é a  $\beta$ -1,3-glucana, responsável pelo recrutamento de células inflamatórias e produção de citocinas como TNF- $\alpha$ , e também reconhecida por seu receptor dectina-1 ou DC-SIGN. Entretanto, na fase

leveduriforme observa-se principalmente a presença de  $\alpha$ -1,3-glucana, que dentre várias funções, regula a proliferação de leveduras no interior dos fagócitos protegendo-as dentro de fagolisossomos, induz a formação de granulomas e promove o escape de mecanismos de reconhecimento imune do hospedeiro, contribuindo para sobrevivência das leveduras (GUIMARÃES et al., 2011).

A parede celular da levedura é uma estrutura laminar que tem aproximadamente 100 nm em espessura, mas a parede da hifa é de aproximadamente 30 nm de espessura. Com base em estudos de microscopia eletrônica, tem-se proposto um modelo estrutural de parede celular da forma leveduriforme do *H. capsulatum* onde galactomananas formam uma camada externa,  $\alpha$ -1,3 glucanas se apresentam como fibrilas curtas embebidas em proteínas, formando a camada intermediária, e a camada interna é composta por rede fibrilar de quitina (REISS, 1986; GUIMARÃES et al., 2011). A figura 1 apresenta um modelo representativo da parede celular de *Histoplasma capsulatum*.



**Figura 1:** Imagem representativa da estrutura da parede celular de *H. capsulatum* (Guimarães et al., 2011)

A classificação de *H. capsulatum* em quimiotipos e sorotipos também foi baseada na composição da parede celular deste fungo. O quimiotipo 1 apresenta elevado conteúdo de quitina, níveis raramente detectáveis de  $\alpha$ -1,3 glucana e alta concentração de proteínas quando comparados ao quimiotipo 2 que apresenta reduzida taxa de quitina e alta concentração de glicose como polímero  $\alpha$ -1,3 glucana (DOMER, 1971). Quatro fatores antigênicos (1, 2, 3 e 4) e cinco sorotipos (1,2; 1,4; 1,2,3; 1,2,4; 1,2,3,4) foram demonstrados através de reações de imunofluorescência e adsorção. Os fatores antigênicos 1 e 4 são também compartilhados com *Blastomyces dermatitidis* e provavelmente estão associados à galactomanana (KAUFMAN; BLUMER, 1966).

### 1.2.3. FATORES DE VIRULÊNCIA

Diversos fatores de virulência responsáveis pela sobrevivência de fungos em parasitismo têm sido sugeridos na literatura especializada tais como a termotolerância, glucanas ( $\alpha$  e  $\beta$ ) da parede celular e estruturas complementares responsáveis pela adesão aos tecidos dos hospedeiros, a produção de melanina, fosfolipases, proteases e elastases capazes de causar dano tecidual e quebrar as defesas do hospedeiro; a produção de catalases, enzimas que decompõem o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água ( $H_2O$ ) e oxigênio ( $O_2$ ) atuando contra os mecanismos oxidativos das células hospedeiras (HOOGAN et al., 1996). Além disso, a capacidade de fazer “switch” a várias vias metabólicas é um pré-requisito para a disseminação hematogênica e para o desenvolvimento do fungo.

No entanto, até o presente, somente alguns fatores de virulência de *H. capsulatum* foram comprovados.

#### 1.2.4.1 DIMORFISMO

O dimorfismo é um aspecto importante na patogênese, pois a forma filamentosa é infectante, mas é a forma leveduriforme que sobrevive intracelularmente e causa doença (NEMECEK et al., 2006). A mudança de temperatura de 25°C para 37°C é estímulo suficiente para o dimorfismo, mas outras condições ambientais como presença de cisteína e cAMP (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico) podem influenciar na morfogênese de *H. capsulatum*. Este dimorfismo é essencial para a virulência, como evidenciado em culturas mantidas a 25°C tratadas quimicamente, incapazes de fazerem a conversão para a fase leveduriforme que se tornam avirulentas (MEDOFF et al., 1986). O dimorfismo é um dos sistemas mais bem estudados na regulação gênica de *H. capsulatum* e na sua patogênese, com reflexão na mudança em sua morfologia e no seu estilo de vida. O dimorfismo que regula a cinase *DRK1* e o *RYP1* homólogo de *WOR1* “White–Opaque Regulator 1” de *Histoplasma* modula a transição induzida pela temperatura. Os genes expressos como parte deste *regulon* influenciam a interação parasito-hospedeiro favorecendo a virulência de *Histoplasma* (NEMECEK et al., 2006). Outro fator importante relacionado ao dimorfismo, além da temperatura, é a capacidade da forma leveduriforme resistir a condições hostis no interior dos macrófagos. E assim como ocorre em *B. dermatitidis*, a alteração na concentração de  $\alpha$ -1-3-glucana na parede celular também é fundamental na transição micélio-levedura, e leva a diferenças na virulência de isolados, cepas selvagens ricas em  $\alpha$ -1-3-glucana são mais

virulentas que cepas mutantes com baixa concentração deste lipídeo na parede celular (SAN-BLAS & JAN-BLAS, 1984; KLEIN & TEBBETS, 2007; MARESCA & KOBAYASHI, 2000).

#### 1.2.4.2 PROTEÍNA LIGANTE DE CÁLCIO (CBP)

A proteína ligante de cálcio e seu gene codificante CBP1 (BATANGHARI et al., 1998) favorece a sobrevivência do fungo no interior de células fagocíticas. Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram seu papel como fator de virulência, pois células que tiveram seu gene CBP1 deletado foram eliminadas facilmente dos pulmões de camundongos infectados (SEBGHATI et al., 2000). Uma das hipóteses para sua virulência seria a de que a CBP teria efeito modulador sobre a ligação do cálcio ao fagolisossomo gerando condições ótimas de crescimento ao *H. capsulatum* (HOLBROOK; RAPPLEYE, 2008).

#### 1.2.4.3 ALFA 1,3-GLUCANA

A  $\alpha$ -1,3-glucana é um polissacáride de parede celular designado especificamente para sobrevivência e replicação do fungo no pulmão porque a perda de  $\alpha$ -1,3-glucana não prejudica o crescimento de *H. capsulatum in vitro*. A-1,3-glucana também bloqueia o reconhecimento da PAMP  $\beta$ -1,3-glucana (Pathogen-Associated Molecular Pattern) presente na parede celular do RAPPLEYE fungo pelo receptor PRR dectina-1 (Pattern Recognition Receptors) de fagócitos do hospedeiro (RAPPLEYE et al. 2004; 2007).

Estudos utilizando leveduras mutantes sem  $\alpha$ -1,3-glucana na parede celular demonstraram que as mesmas eram menos virulentas quando comparadas às leveduras com  $\alpha$ -1,3-glucana em modelo experimental murino e em cultura de células com macrófagos (RAPPLEYE, 2004). A presença de  $\alpha$ -1,3-glucana está associada à virulência em *H. capsulatum*, pois estudos realizados com depleção nos níveis de  $\alpha$ -1,3-glucana em modelo murino e *in vitro* demonstraram que a diminuição deste componente restringe a proliferação de leveduras no interior de macrófagos. Além disso, impede a detecção das  $\beta$ -glucanas por células fagocíticas suprimindo a produção de TNF- $\alpha$  pelos fagócitos através de sua presença na parede celular de leveduras ou por interferência de RNA baseada na depleção do receptor dectina-1 de  $\beta$ -glucana do hospedeiro (RAPPLEYE et al., 2004; 2007).

#### 1.2.4.4 MOLÉCULAS EXTRACELULARES

Moléculas tais como a proteína de choque térmico (HSP60) e a “Yeast Specific Phage” (YPS3) podem atuar como suporte para adesão da levedura ao macrófago hospedeiro e promover disseminação da levedura no sítio de infecção pulmonar (EDWARDS; RAPPLEYE, 2011); *SID1*, um membro de um grupo de gene sideróforo regulado por ferro é necessário para colonização de *H. capsulatum* no hospedeiro (HWANG et al., 2008).

#### 1.2.4.5 MELANINAS

Outros possíveis fatores de virulência de *H. capsulatum*, mas ainda não comprovados, seriam as melaninas, polímeros hidrofóbicos que conferem proteção aos fungos contra condições adversas à sua sobrevivência tais como fagócitos e radiações ionizantes e que ainda podem proteger o patógeno contra a ação de agentes antifúngicos (NOSANCHUK et al., 2002; ALMEIDA-PAES et al., 2012 a e b).

Estudos sobre melanização em isolados de *H. capsulatum* e *Cryptococcus neoformans* demonstraram que células melanizadas são menos susceptíveis à anfotericina B e à caspofungina (VAN DUIN et al., 2002).

##### 1.2.4.5.1 MELANINA DHN

A melanina 1,8-dihidroxi-naftaleno (DHN) é o principal tipo de melanina, encontrado na grande maioria dos fungos. É produzida a partir do precursor Acetil Co-A ou malonil Co-A (LANGFELDER et al., 2003), moléculas geradas no metabolismo primário das células fúngicas, não havendo necessidade, portanto, de precursores exógenos para sua produção.

A produção de melanina DHN pode ser inibida *in vitro*, para tal pode ser utilizado o triciclazol, que inibe a biossíntese de melanina pela redução do 1,3,8-trihidroxi-naftaleno em vermelone (WHEELER & STIPANOVIC, 1985).

A produção de melanina DHN já foi evidenciada em diversos fungos como *Penicillium marneffeii* e *Wangiella dermatitidis*, entre outros (EISENMAN & CASADEVALL, 2012; WOO et al, 2010). Já foi demonstrado que *Aspergillus tubigenensis* e *Aspergillus terreus* são capazes de produzir melanina DHN *in vitro* (PAL, 2014). Estudo avaliando ainda a presença deste tipo de melanina como fator de proteção em isolados de *Aspergillus fumigatus* demonstrou a importância da presença deste pigmento na superfície celular de conídios na sinalização celular e alterações à resposta imune do hospedeiro

(BAYRY, 2014). O efeito protetor deste tipo de melanina foi demonstrado em isolados de *Madurella mycetomatis*, os quais apresentaram maior resistência à ação de antifúngicos como cetoconazol e itraconazol (VAN DE SANDE et al., 2007).

#### 1.2.4.5.2 EUMELANINA

Para a síntese deste tipo de melanina é necessária a presença de um precursor durante o crescimento fúngico. A dihidroxifenilalanina (DOPA) pode ser adicionada ao meio de cultura para estimular a produção *in vitro* de eumelanina pelos fungos (LANGFELDER et al, 2003).

Alguns fungos como *C. neoformans* podem ainda produzir eumelanina a partir da assimilação de compostos fenólicos do hospedeiro (CASADEVALL, 2000).

A inibição da via de síntese de eumelanina pode ser feita através da adição de glifosato ao meio de cultura (NOSANCHUK et al., 2002). Outros inibidores, como ácido kójico e tropolona também podem ser utilizados. Estudo realizado por Pal e colaboradores em 2014 demonstrou que isolados de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus tamarii* são capazes de produzir pigmento do tipo eumelanina a partir da via de L-DOPA (PAL et al., 2014).

Almeida-Paes e colaboradores (2009) em estudo avaliando a produção de eumelanina em isolados de *Sporothrix schenckii* do Brasil demonstraram a variação na produção de eumelanina nestes isolados e observaram que esta variação está associada a condições como pH, temperatura, e nutrientes disponíveis no meio de cultura. Neste estudo os isolados não apresentaram melanização em pHs básicos e diminuição na produção do pigmento quando semeados em Sabouraud quando comparado ao Meio Mínimo quimicamente definido ou quando incubados a 37°C. Além disso, houve estímulo na produção de eumelanina quando foi adicionada a L-DOPA ao meio de cultura.

Isolados de diferentes espécies de *Trichosporon* também foram capazes de produzir *in vitro* pigmento do tipo eumelanina através da adição de L-DOPA. Os autores sugerem possível relação com virulência, entretanto, a mesma não foi ainda avaliada nestes isolados (FIGUEIREDO-CARVALHO et al., 2014).

Em isolados de *P. marneffei* produtores de eumelanina já foi possível associar a produção deste pigmento com a resistência dos isolados melanizados à fagocitose por macrófagos, bem como aumento da sobrevivência do fungo no interior da célula (LIU et al, 2014).

### 1.2.4.5.3 PIOMELANINA

Alguns fungos têm ainda a capacidade de produzir um pigmento solúvel em meio líquido quando em presença do precursor L-tirosina, chamado de piomelanina. Este tipo de melanina é produzido através do acúmulo de ácido homogêntísico no meio extracelular (CARREIRA et al., 2001), e pode ter a sua via de produção interrompida pela adição de sulcotrione ao meio de cultura (SECOR, 1994).

A produção de piomelanina já foi descrita em espécies fúngicas como *Yarrowia lipolytica*, *A. fumigatus* e *S. schenckii* (CARREIRA et al., 2000; SCHMALER-RIPCKE et al., 2009; ALMEIDA-PAES et al., 2012 a,b). Mais recentemente, foi descrita também a produção de piomelanina em isolados de *Penicillium crysogenum* a partir da adição de L-tirosina ao meio de cultura (VASANTHAKUMAR et al., 2015).

Almeida-Paes e colaboradores (2012b) avaliaram a ação protetora da piomelanina em isolados de *S. schenckii*, *S. brasiliensis* e *S. globosa* e constataram que células produtoras de pigmento foram mais resistentes à ação de oxidantes derivados de nitrogênio e menos susceptíveis à ação da luz ultravioleta quando comparados a isolados não melanizados.

### 1.2.4.6 UREASE

A produção de urease por fungos já foi descrita em diversas espécies e tem sido considerado um potencial fator de virulência. *Cryptococcus neoformans* é um modelo fúngico bem estudado no que diz respeito ao metabolismo da uréia, sendo a sua produção associada à patogênese da criptococose em modelo experimental (COX et al., 2000). Outra espécie fúngica que tem a produção de urease bem caracterizada como um fator de virulência é *Coccidioides posadasii*. Estudo utilizando modelo experimental murino demonstrou que cepas de *C. posadasii* com interrupção do gene da urease foram menos virulentas, levando a uma sobrevida maior nos camundongos infectados com estas cepas (MIRBOD-DONOVAN et al., 2006).

Segundo dados da literatura especializada, *H. capsulatum* seria capaz de produzir urease, com exceção de sua variante *duboisii* (DE HOOG, 2000). Entretanto, estudo realizado por Sharmin e colaboradores em 2003 demonstrou que todas as variantes de *H. capsulatum* são capazes de produzir urease *in vitro*. Ainda nesta avaliação, os pesquisadores não observaram associação entre a produção de urease e patogenicidade, utilizando modelo experimental (SHARMIN et al., 2003). No entanto, foram utilizadas para tal pesquisa apenas

sete isolados. Neste caso, poucos são os estudos realizados para avaliar a produção de urease em *H. capsulatum*, bem como seu efeito como um fator de virulência para histoplasmose.

### 1.3 A HISTOPLASMOSE

#### 1.3.1 EPIDEMIOLOGIA

Por ser uma micose de distribuição cosmopolita, podemos encontrar casos de histoplasmose em todo o mundo. Entretanto, o maior número de casos da doença é observado nas Américas, África subsariana, Oceania e leste da Ásia (FARINA et al., 2005). Regiões de alta endemicidade de histoplasmose na América do Norte estão situadas nos vales do Rio Mississippi, Ohio e Missouri. Enquanto na América do Sul, a Bacia do Rio Prata e a Serra do Mar são algumas das regiões com grande número de casos da doença (NEGRONI, 2005). Alguns surtos de histoplasmose no mundo já foram registrados, entretanto, um dos casos de maior notoriedade foi o que ocorreu na cidade de Indianápolis, nos Estados Unidos, onde 120.000 pessoas foram infectadas e destas, 60 apresentaram episódios fatais ou casos graves de histoplasmose, após dispersão aérea de *H. capsulatum* em um bosque que havia sido desmatado (WHEAT et al., 1982).

No Brasil, a histoplasmose é uma das micoses sistêmicas mais frequentes, apresentando alta morbidade e mortalidade principalmente em pacientes com aids (PRADO et al., 2009). Trabalhos de revisão relataram muitos casos de histoplasmose em diferentes regiões do nosso país, verificando-se um aumento significativo em sua frequência (ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2013). Este fato se deve, provavelmente, ao maior conhecimento dos médicos em relação aos aspectos clínicos e epidemiológicos desta micose, bem como aos avanços obtidos no diagnóstico laboratorial das doenças fúngicas nos últimos anos. Particularmente, em estudos realizados em dois estados brasileiros, Rio de Janeiro (LEIMANN et al., 2005) e Rio Grande do Sul (UNIS et al., 2004), demonstrou-se uma alta associação entre histoplasmose e pacientes com aids. Além disso, foram documentadas 31 microepidemias de histoplasmose no Brasil, dentre as quais 23 ocorreram na Região Sudeste (ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2013). Aidé, em 2009, apontou o Rio de Janeiro como responsável por 18 microepidemias da doença, sendo o estado responsável pelo maior número de casos de histoplasmose no Brasil (AIDÉ, 2009).

A distribuição de *H. capsulatum* e as características do seu nicho ecológico no Brasil têm sido muito pouco estudadas, onde trabalhos referentes ao isolamento deste fungo do solo

podem ser enumerados (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2013). Entretanto, diversos inquéritos com o teste cutâneo com histoplasmina revelaram uma prevalência bastante significativa da infecção no nosso país demonstrando expressivos índices de positividade da infecção nas diferentes regiões brasileiras: Sul (6,3-16%), Nordeste (2,6-29,8%), Sudeste (3,0-93,2%), Centro-Oeste (4,4-63,1%) e Norte (12,8-43,4%) (RODRIGUES, 2004). O Estado do Rio de Janeiro apresenta áreas com altos índices de infecção, sendo consideradas como endêmicas ou hiperendêmicas.

Diversas são as fontes de isolamento deste fungo descritas na literatura, dentre elas o solo, poeira, galinheiros, cavernas, animais silvestres como ratos e morcegos e domésticos como cães e gatos, além do homem (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2013).

A variabilidade em isolados de *H. capsulatum* tem sido verificada a partir de técnicas convencionais e moleculares (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2011). As convencionais baseiam-se na análise fenotípica a partir da caracterização morfológica (conidiogênese e macromorfologia da colônia), no crescimento fúngico e também na análise bioquímica (produção de substâncias e auxotrofias). No entanto, tais técnicas, apesar de muito utilizadas, são limitadas e não permitem estudos epidemiológicos, além de serem prejudicadas por ser, *H. capsulatum*, um fungo de difícil cultivo *in vitro*. As técnicas moleculares, por sua vez, fornecem ferramentas suficientes para evidenciar e entender aspectos relacionados diretamente com o ácido desoxirribonucleico (DNA). Desta forma, a genética molecular tem sido de grande importância para a identificação e análise do comportamento e patogenicidade de *H. capsulatum*, assim como na diferenciação de indivíduos e no estudo filogenético desses organismos (WOODS, 2002), além de fornecer informações sobre aspectos epidemiológicos, gerando dados importantes para determinar recidivas ou novas infecções (MUNIZ et al., 2001).

### 1.3.2 PATOGENIA

A infecção por *H. capsulatum* depende de interações dinâmicas da imunidade inata com a imunidade adquirida do hospedeiro e fatores de virulência fúngica. O controle da infecção é amplamente baseado na ativação da imunidade celular em conjunto com a resposta inata, sendo que a doença progressiva com disseminação ocorre predominantemente na ausência de imunidade celular intacta (LÁZÁR-MOLNÁR et al., 2008; MIHU; NOSANCHUK, 2012).

Após a inalação, os microconídios atingem os alvéolos pulmonares e se convertem em leveduras gemulantes. Nessa fase, as leveduras se reproduzem inicialmente no parênquima pulmonar. Posteriormente, invadem os linfonodos hilomediastinais e disseminam-se para a corrente sanguínea. Ocorre uma fungemia, permitindo assim a invasão do sistema monocítico-fagocitário (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2013).

Em geral, infecções causadas por *H. capsulatum* são assintomáticas ou subclínicas. Menos de 1% das pessoas apresentam manifestações clínicas após a exposição primária ao fungo (KAUFFMAN, 2014), principalmente quando há inalação de grande quantidade de propágulos. A infecção pode ficar restrita aos pulmões, ou expandir-se para órgãos adjacentes (linfonodos mediastinais) e para todo o sistema fagocítico-mononuclear, acometendo vários órgãos e sistemas. Formas progressivas e disseminadas da histoplasmose, assim como a gravidade das manifestações clínicas, geralmente decorrem da reativação fúngica quando há quedas ou falhas da imunidade celular (FERREIRA; BORGES, 2009). Em estudo retrospectivo realizado com base nos registros do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/FIOCRUZ, no Brasil, no período de 1987-2003, 74 casos de histoplasmose foram identificados, sendo mais encontradas as formas: disseminada (46/74), pulmonar crônica (9/74), pulmonar aguda (10/74), mediastinite (5/74), cutânea (2/74) e duas formas não definidas. Co-infecção com AIDS foi identificada em 38 pacientes, com ocorrência da forma disseminada em todos eles. Não foram descritas outras condições associadas com os outros casos de histoplasmose disseminada (LEIMANN et al., 2005).

Outro fator importante na determinação da forma clínica e sintomas da histoplasmose é o tipo de exposição. Quando a exposição é leve e o indivíduo inala uma baixa carga de propágulos infectantes, pode ocorrer infecção primária ou re-infecção, porém sem sintomas e com regressão espontânea. Entretanto, se a exposição for moderada ou intensa, como em locais fechados e com altas concentrações de propágulos, a probabilidade de ocorrência da forma sintomática é maior e o indivíduo pode apresentar doença pulmonar, febre, tosse, cefaléia, dor torácica e fadiga, podendo, ainda assim, ocorrer melhora sem intervenção terapêutica (PAULA; AIDÉ, 1985).

O controle da infecção ocorre após a segunda ou terceira semana. Células T CD4+ passam a secretar linfocinas do tipo Th1. Isso leva à formação de reação granulomatosa e tendência à calcificação (EDWARDS; RAPPLEYE, 2011; MIHU; NOSANCHUK, 2012). Fungos viáveis, contudo, podem permanecer nas áreas cicatrizadas por vários anos. Nas formas disseminadas, há uma resposta imune do tipo Th2. Citocinas do tipo IL4, IL5 e IL10

são produzidas e inibem a resposta protetora Th1. O curso da doença é agudo e grave, e os granulomas são mal formados ou não se formam (MIHU; NOSANCHUK, 2012).

O principal mecanismo de resistência do hospedeiro contra o fungo é representado pela ação de linfócitos T, macrófagos e células dendríticas. Células T CD4<sup>+</sup> induzem a produção de citocinas do tipo Th1, particularmente IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , as quais ativam macrófagos que representam a primeira linha de defesa do hospedeiro contra o fungo através da fagocitose. As células dendríticas possuem papel importante na resistência do hospedeiro, pois além de fagocitar e degradar células fúngicas, também são eficientes no processamento e apresentação de antígenos às células T CD8<sup>+</sup> (LÁZÁR-MOLNÁR et al., 2008; MIHU; NOSANCHUK, 2012). Podem, contudo, proporcionar um ambiente protetor para *H. capsulatum*, já que o fungo sobrevive e se replica nos fagolisossomas dessas células (EDWARDS; RAPPLEYE, 2011; MIHU; NOSANCHUK, 2012).

O parasitismo de *H. capsulatum* no fagolisossomo é uma estratégia de sobrevivência intracelular. No organismo do hospedeiro, conídios ou leveduras são imediatamente envolvidos pelo fagossoma. Embora muitos patógenos intracelulares possam manipular as células hospedeiras, o mecanismo que influencia o resultado da infecção por *Histoplasma* não inibe a fusão do fagossoma com o lisossoma, isto é, a formação do fagolisossoma (RAPPLEYE, 2014; MIHU; NOSANCHUK, 2012). Assim, o fungo é exposto a uma grande quantidade de produtos oxidantes e enzimas degradativas provenientes do macrófago que constituem as defesas do hospedeiro. O fungo pode adotar estratégias de sobrevivência para se defender contra a acidificação intracelular, limitação de elementos essenciais incluindo cálcio e ferro. A superóxido desmutase extracelular também pode proteger leveduras de *H. capsulatum* do stress oxidativo derivado do hospedeiro (RAPPLEYE, 2014; HOOLBROCK, 2013; MIHU; NOSANCHUK, 2012).

### 1.3.3 FORMAS CLÍNICAS

A histoplasmose apresenta uma grande variedade de manifestações e formas clínicas. Para Zancopé-Oliveira e colaboradores (2013) estas estão classificadas em nove: infecção subclínica e/ou assintomática, histoplasmose aguda, disseminada, disseminada aguda, disseminada subaguda, disseminada crônica, oportunistica, pulmonar crônica, granulomatosa e fibrose mediastínica.

### **1.3.3.1 INFECÇÃO SUBCLÍNICA (ASSINTOMÁTICA)**

Representa a principal forma clínica observada em pacientes imunocompetentes. Em geral não há presença de sinais e sintomas clínicos, sendo esta diagnosticada por meio de teste cutâneo com histoplasmina, evidências radiológicas como nódulos pulmonares, infiltrados ou linfadenomegalias e através de reações sorológicas (LA HOZ et al., 2013).

### **1.3.3.2 HISTOPLASMOSE AGUDA**

As manifestações clínicas da forma aguda da doença podem variar de acordo com a faixa etária do paciente, seu estado imunológico e a quantidade de partículas infectantes inaladas. Em geral, acomete principalmente crianças de baixa idade e adultos acima de 55 anos de idade. Apresenta período de incubação de 10 a 18 dias em primoinfecção e de 3 a 7 dias em casos de reinfecção. Os principais sintomas são febre alta, cefaléia, tosse seca, mialgia e astenia, dor retroesternal e insuficiência respiratória. Os achados radiológicos são discretos, apresentando o paciente pequenas áreas de pneumonite em meio a infiltrado intersticial difuso. Após duas ou três semanas os sintomas regredem e o foco pulmonar primário evolui para cura espontânea com formação de pequeno nódulo encapsulado contendo formas parasitárias residuais (SINGH et al., 2012).

Até 1985, já haviam sido registrados 11 surtos de histoplasmose no Estado do Rio de Janeiro, a maioria destes surtos estava associada à visitação de cavernas ou grutas, e a casas cujos forros apresentavam contaminação por fezes de morcegos ou aves (PAULA; AIDÉ, 1985). Em 2009, este número já havia subido para 18 microepidemias, apenas no Rio de Janeiro (AIDÉ, 2009).

### **1.3.3.3 HISTOPLASMOSE DISSEMINADA**

A forma disseminada desta micose está ligada à presença de foco extrapulmonar e extraganglionar progressivo. Em hospedeiros imunocompetentes, a mesma pode apresentar evolução aguda, sub-aguda ou crônica, em geral associados à idade, ou assumir caráter oportunista em hospedeiros imunocomprometidos (GREGORY; LINDA, 2012).

#### **1.3.3.3.1 HISTOPLASMOSE DISSEMINADA AGUDA (TIPO INFANTIL)**

Atinge de forma mais frequente crianças menores de dois anos de idade. Manifesta-se por febre, irritabilidade, fadiga progressiva, perda de peso, tosse, diarreia, vômitos, anemia, equimose, hepatoesplenomegalia, icterícia e linfadenomegalia, dentre outros. Os achados radiológicos apresentam lesões sugestivas de infecção primária ou quadro de pneumonia intersticial. Costuma ser bem agressiva e, se não tratada rapidamente, o paciente pode evoluir para o óbito entre duas e cinco semanas (SIERRA, TORRES, 2013).

#### **1.3.3.3.2 HISTOPLASMOSE DISSEMINADA SUBAGUDA (TIPO JUVENIL)**

É observada principalmente em crianças e adolescentes. O paciente apresenta febre moderada e intermitente, mal-estar, astenia, adinamia e emagrecimento progressivo. São observadas lesões focais destrutivas como lesões cutâneas, osteolíticas, doença ulcerativa intestinal e meningoencefalite, dentre outras manifestações. É comum se observar hepato e esplenomegalia e sinais de infecção primária em exames radiológicos. Pode evoluir para óbito em meses ou anos se o paciente não for tratado (SHAHANI, 2012).

#### **1.3.3.3.3 HISTOPLASMOSE DISSEMINADA CRÔNICA (TIPO ADULTO)**

Principal forma encontrada em adultos acima de 40 anos de idade. Manifesta-se pela presença de lesões nas vias respiratórias e digestivas superiores. Possui evolução lenta, acompanhada de febre baixa e intermitente, astenia e emagrecimento que pode regredir espontaneamente. Em geral, não há comprometimento pulmonar (ALAM et al., 2012).

#### **1.3.3.3.4 HISTOPLASMOSE OPORTUNÍSTICA**

Está associada a pacientes com quadros de imunocomprometimento, sendo o mais comum a aids. A infecção neste caso pode ser resultado de reativação de foco latente ou exógena. Os principais sintomas são febre, tosse, dispnéia, hepatomegalia, esplenomegalia e anemia, com infiltrado intersticial difuso em exames radiológicos. Em casos avançados, podem ser observadas lesões extrapulmonares em múltiplos órgãos como fígado, baço, intestinos, pele, linfonodos e outros. A maior dificuldade no tratamento está associada aos efeitos colaterais produzidos pelas drogas imunossupressoras utilizadas pelo paciente que por

vezes se confundem aos sintomas da doença. Se não tratada rapidamente, ocorre evolução ao óbito (ESCHER et al., 2012).

### **1.3.3.5 HISTOPLASMOSE PULMONAR CRÔNICA**

Mais comum em pacientes do sexo masculino, acima dos 30 anos de idade e com enfisema ou defeito anatômico estrutural que favoreça a instalação de um foco inicial da doença. Ocorre produção de material líquido nestes espaços que disseminam por via broncogênica causando pneumonite, fibrose pulmonar progressiva e agravamento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) pré-existente. É facilmente confundida com tuberculose pulmonar crônica. Não apresenta evolução ao óbito rápida (MORRIS; GARDENER, 2012).

### **1.3.3.6 GRANULOMATOSE E FIBROSE MEDIASTÍNICA**

São decorrentes de reação inflamatória e/ou fibroblástica anormal do paciente. Pode ocorrer necrose caseosa a partir de reação inflamatória intensa de linfonodos dos hilos pulmonares, ou deposição de colágeno formando massas mediastinais, também chamada mediastinite fibrosante. Ambos podem causar compressão da veia cava superior, artérias pulmonares e brônquios. O diagnóstico e a terapêutica nesta forma clínica são dificultados e a evolução incerta, porém pode evoluir para cura com fibrose e calcificação (MCNEELEY et al., 2012).

## **1.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL**

O diagnóstico clínico da histoplasmose baseia-se em aspectos clínicos, laboratoriais, radiológicos e epidemiológicos. O diagnóstico laboratorial consiste de: exame direto e histopatológico, cultura, técnicas imunológicas e de biologia molecular (GUIMARÃES et al., 2006).

### **1.4.1 EXAME DIRETO**

O exame direto representa uma técnica rápida, simples e de baixo custo para visualização de estruturas parasitárias dos fungos. É realizada a pesquisa direta do fungo no material biológico a fresco, a partir da deposição do espécime clínico em lâmina com uma gota da solução clarificadora de hidróxido de potássio (KOH) a 10%. Ao microscópio óptico

são observadas leveduras ovais, unibrotantes. Entretanto, esta técnica apresenta baixa sensibilidade quando aplicada ao diagnóstico da histoplasmose, revelando um alto índice de resultados falso-negativos e sendo necessário prosseguir o exame micológico com o cultivo do espécime clínico em meios de cultura específicos para se obter a confirmação diagnóstica. Entretanto, técnicas de coloração como Giemsa, Wright e Grocott utilizando esfregos sanguíneos podem aumentar a sensibilidade na identificação do fungo pelo exame direto (BAVA & TRONCOSO, 2013).

#### 1.4.2 EXAME HISTOPATOLÓGICO

A análise histopatológica é mais uma ferramenta auxiliar no diagnóstico da histoplasmose. Através dela é possível visualizar o fungo em parasitismo no tecido do hospedeiro, bem como a reação inflamatória tecidual. Os cortes histológicos para pesquisa de *H. capsulatum* são corados pela hematoxilina-eosina (HE), ácido periódico de Schiff (PAS) e pelo método de impregnação pela prata Gomori-Grocott. À microscopia são visualizadas células leveduriformes com corpúsculo levemente basofílico, esféricas ou ovaladas, delimitadas por um halo, nas preparações coradas por HE. Nas colorações de PAS e Gomori-Grocott, a parede celular das leveduras é fortemente corada, facilitando a visualização dos elementos fúngicos. Entretanto, estas técnicas podem gerar resultados falso-positivos na presença de outras espécies fúngicas como *Pneumocystis jirovecii*, *Candida glabrata* e *Penicillium marneffeii* (WHEAT, 2003).

#### 1.4.3 CULTURA

A cultura é considerada padrão-ouro na confirmação do diagnóstico da histoplasmose, e se dá pelo isolamento e identificação de *H. capsulatum* em meios especiais como Agar Sabouraud e Mycosel, entre outros, incubados a 25°C durante 6 a 12 semanas. A evidência de hifas hialinas septadas com macroconídios tuberculados e microconídios em diferentes estágios evolutivos sugerem a identidade do fungo como *H. capsulatum*. Entretanto a conversão desta fase para a forma leveduriforme é necessária, visto que fungos saprófitas do gênero *Chrysosporium* podem apresentar estruturas de propagação semelhantes às produzidas pelo agente da histoplasmose (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2013). Para obtenção desta fase devem-se fazer repiques da fase filamentosa da colônia suspeita em meios enriquecidos, tais como Agar sangue, Agar infusão cérebro-coração (BHI), ambos acrescidos de cisteína, e ML-

GEMA (Muller Hinton, dextrose, L-cistina, Agar e gema de ovo) com incubação a 35-37°C. Quando convertidos, observam-se colônias glabras, lisas, branco-amareladas, apresentando à microscopia, leveduras ovais, unibrotantes, de morfologia uniforme (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2011).

#### 1.4.4 IMUNODIAGNÓSTICO

Na ausência ou ineficácia dos métodos micológicos, testes imunológicos apresentam-se como instrumentos vitais para o diagnóstico auxiliar da histoplasmose, pois avaliam direta e indiretamente a existência do patógeno no hospedeiro, através da detecção de antígenos e anticorpos, respectivamente. Imunodifusão dupla de Ouchterlony (ID) e a reação de fixação de complemento (RFC) têm sido os métodos de escolha na rotina de laboratórios de análises clínicas (LINDSLEY, 2013). Entretanto, a ID, técnica altamente específica, apresenta baixa sensibilidade onde os anticorpos podem não ser detectáveis até 4 a 6 semanas após o aparecimento dos sintomas, fornecendo resultados falso-negativos (PIZZINI et al., 1999). A RFC, embora mais sensível que a ID, pode apresentar reatividade cruzada com soro de pacientes infectados com *B. dermatitidis*, *Coccidioides immitis* e *Paracoccidioides brasiliensis* (GUIMARÃES et al., 2006).

Em pacientes com baixos títulos de anticorpos ou mesmo ausência destes, podem ser empregados testes imunológicos para a detecção de antígenos, principalmente em pacientes imunodeprimidos apresentando forma disseminada da doença. Os antígenos glicoprotéicos H e M são considerados marcadores específicos para a doença em atividade (DEEP, 1994). Algumas técnicas vêm sendo desenvolvidas e aprimoradas para a detecção de antígenos de *H. capsulatum*, entre elas, ID, *Western-blot* (WB), radioimunoensaio (RIA), ensaio imunoenzimático (ELISA) *sandwich*, ELISA de inibição e de captura (GOMEZ et al., 1997; HAGE et al., 2011; SCHEEL et al., 2009; WHEAT et al., 2002; WHEAT et al., 2007).

Têm-se demonstrado que ensaios imunoenzimáticos, tais como *Western blot* (PIZZINI et al., 1999) e ELISA (SCHEEL, 2009; GUIMARÃES et al., 2004) apresentam maior sensibilidade do que a imunodifusão e a reação de fixação de complemento na detecção de anticorpos na histoplasmose.

Alguns estudos ainda em fase de avaliação têm sugerido a pesquisa de uma glicoproteína, a proteína 4 de cultura filtrada (Cfp4), como potencial exoantígeno de *H. capsulatum* para pesquisa em diagnóstico laboratorial da histoplasmose. Testes realizados

com soro humano de pacientes com histoplasmose foram capazes de detectar a presença desta glicoproteína (HOLBROOK et al., 2014).

#### 1.4.5 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Mais recentemente, a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido utilizada para amplificar sequências do gene do ácido ribonucleico ribossômico (RNAr) de *H. capsulatum* e tem sido introduzida como uma ferramenta auxiliar para o diagnóstico da infecção deste e de outros fungos, principalmente se existem dificuldades para a realização de culturas, quando o fungo não pôde ser satisfatoriamente isolado. Foi desenvolvido uma PCR capaz de identificar a proteína de 100-kDa específica de *H. capsulatum*, HC100 PCR, o teste apresentou 100% de sensibilidade e especificidade variou de 92,4 a 95,2% (BIALEK et al., 2002; MUNÓZ et al., 2010; MUNÓZ-CADAVID et al., 2010). Foi avaliado também o desempenho de um PCR aninhado para diagnóstico laboratorial, a partir da amplificação do gene HC100, utilizando DNA extraído de amostras de sangue. O mesmo apresentou uma sensibilidade de 89% com especificidade de 96% para detecção de *H. capsulatum* (TORANZO, 2009).

Um PCR aninhado método desenvolvido para a extração de DNA fúngico a partir de amostras de sangue, com subsequente utilização em um PCR aninhado.

Várias PCRs foram elaboradas para o diagnóstico de histoplasmose bem como a PCR em tempo real a partir da análise do antígeno H, bem como de amostras de tecidos em parafina, ambas com boa sensibilidade e especificidade (BRACCA et al., 2003; KOEPESELL et al., 2012).

Um estudo multicêntrico comparativo entre diferentes protocolos de PCR demonstrou que a PCR em tempo real para a região ITS apresentou maior sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade quando comparado a uma PCR convencional ou aninhada (BUITRAGO et al., 2013).

Scheel e colaboradores (2014) desenvolveram um PCR para detecção de *H. capsulatum* em amostras clínicas de urina, através da técnica de amplificação isotérmica de DNA mediada por loop (LAMP) e obtiveram 67% de sensibilidade, enquanto para isolados extraídos de cultura esta mesma técnica apresentou 100% de sensibilidade e especificidade.

### 1.5 TRATAMENTO

O tratamento da histoplasmose deve ser avaliado de acordo com a forma clínica da doença e o estado imunológico do paciente. A grande maioria dos pacientes que apresenta a

fase aguda da doença não necessita de tratamento, pois em geral, a mesma apresenta regressão espontânea dos sinais e sintomas (LA HOZ et al., 2013).

Dentre as opções de fármacos disponíveis para o tratamento dos pacientes, são utilizados basicamente dois: o itraconazol e a anfotericina B. Embora a anfotericina B seja uma droga mais eficiente por ser fungicida, o uso da mesma acarreta maior número de efeitos colaterais ao paciente, sendo ainda necessário que o doente seja hospitalizado para sua administração. Em contrapartida, o itraconazol pode ser administrado ao paciente de forma ambulatorial e com menos efeitos colaterais. Para casos de histoplasmose leve sugere-se o uso de itraconazol como droga de escolha, ao passo que para casos de doença moderada a severa recomenda-se internação do paciente e administração de anfotericina B, além do monitoramento da função renal e contagem de células vermelhas regularmente (WHEAT, 2007).

Uma das dificuldades em se tratar pacientes com doenças fúngicas reside no baixo número de antifúngicos disponíveis na indústria farmacêutica, bem como na dificuldade de se padronizar testes de sensibilidade aos antifúngicos para fungos filamentosos. Em estudo recente realizado para avaliar a sensibilidade de isolados de *H. capsulatum* a antifúngicos, foi observada a possibilidade de se utilizar a fase filamentosa do fungo, tendo em vista a demora em se obter a conversão à fase leveduriforme. Os resultados revelaram uma concordância entre os resultados para fase filamentosa em comparação à leveduriforme de 87 a 100% para azólicos, 100% para anfotericina B e 96% para caspofungina (KATHURIA et al., 2014).

## 2 JUSTIFICATIVA

A endemicidade de histoplasmose no Estado do Rio de Janeiro, principalmente sob a forma disseminada em pacientes imunodeprimidos e as altas taxas de morbidade nessa região do Brasil, vem acarretando, como conseqüências importantes, custos elevados com a assistência médica (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2013).

Como a histoplasmose não é uma doença de notificação compulsória e o diagnóstico laboratorial por vezes é inconclusivo, provavelmente, os casos da doença são subestimados e as áreas endêmicas mais extensas.

Nosso grupo tem se voltado para a caracterização fenotípica e genotípica de *H. capsulatum* isolados no Brasil e temos observado diferenças entre *H. capsulatum* isolados de diferentes regiões geográficas do país (ZANCOPÉ-OLIVEIRA, 2005b; MUNIZ et al., 2010). Isto nos permite especular que fenótipos e genótipos distintos estão associados com as formas clínicas da enfermidade nas áreas endêmicas. Também já foi demonstrado que alguns fungos apresentam diferenças na sua composição antigênica, sendo estas provavelmente devido a peculiaridades filogenéticas destes microrganismos e deveriam ser consideradas no diagnóstico laboratorial da histoplasmose. Caracterizar perfis autóctones de *H. capsulatum* nos permitirá conhecer o fluxo de isolados no Estado do Rio de Janeiro e avaliar a possibilidade de introdução de perfis exógenos oriundos de outras regiões.

Micronichos de *H. capsulatum* foram demonstrados em diversas regiões do mundo e possivelmente estão atuando como fonte de infecção para seres humanos e animais suscetíveis (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2013). Alguns estudos sobre diferenças fenotípicas e genotípicas de isolados de *H. capsulatum* de diferentes regiões geográficas contribuíram para melhores esclarecimentos sobre as diferenças nas manifestações clínicas da doença, como por exemplo, o encontro de lesões de pele associadas à forma disseminada principalmente em pacientes com aids, provenientes do Brasil (KARIMI et al., 2002). Estes achados sugerem assim, que as diferentes manifestações clínicas poderiam estar associadas à características particulares do fungo, porém, mais estudos são necessários para avaliar se fatores relacionados ao hospedeiro também estariam envolvidos.

É possível que a variabilidade na caracterização fenotípica, principalmente na diferenciação entre fenótipos albino (A) e *brown* (B) de *H. capsulatum* possa ser importante estratégia para explicar o comportamento endêmico da histoplasmose no Brasil. Além disso, podemos especular a possibilidade das técnicas de caracterização fenotípica serem capazes de

auxiliar a obtenção de um diagnóstico mais rápido, e mais direcionado aos pacientes de nosso estado.

Portanto, considerando, a magnitude que a histoplasmose vem atingindo no estado do Rio de Janeiro e no Brasil, faz-se necessário maior conhecimento sobre os perfis desse fungo baseado em características fenotípicas com a finalidade de se identificar grupos polimórficos de *H. capsulatum*, além de caracterizar cepas autóctones que possam ser consideradas cepas-tipo do Estado, bem como identificar perfis exógenos de outras regiões, possivelmente introduzidas em nossa região.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar fenotipicamente isolados de *H. capsulatum* oriundos do Estado do Rio de Janeiro.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Descrever características morfológicas e fisiológicas de *H. capsulatum* em isolados clínicos e ambientais provenientes do Estado do Rio de Janeiro.
- ✓ Descrever a produção de melanina nos isolados.
- ✓ Descrever a produção de urease nos isolados.
- ✓ Correlacionar os diferentes achados fenotípicos dos isolados.
- ✓ Propor cepas-tipo de *Histoplasma capsulatum* para o Estado do Rio de Janeiro.

## **4 MATERIAS E MÉTODOS**

### **4.1 DESENHO DO ESTUDO**

Estudo observacional, de natureza descritiva e quantitativa, de isolados clínicos e ambientais de *H. capsulatum*.

### **4.2 AMOSTRAGEM**

Trinta isolados de *H. capsulatum* provenientes do Estado do Rio de Janeiro previamente isoladas e armazenadas na Coleção do Setor de Diagnóstico Micológico do Laboratório de Micologia (INI-Fiocruz) foram utilizados no estudo. As características dos isolados estão listadas no quadro 1.

**Quadro 1:** Relação dos isolados de *H. capsulatum* do Rio de Janeiro incluídas neste estudo.

<b>Cepa</b>	<b>Origem</b>	<b>Material</b>	<b>Sexo</b>	<b>Ano</b>
Ipec 22/11	Clínica	Aspirado de medula óssea	M	2011
Ipec 24/11	Clínica	Sangue	M	2011
Ipec 25/11	Clínica	Sangue	M	2011
Ipec 27/11	Clínica	Aspirado de medula óssea	F	2011
Ipec 01/12	Clínica	Aspirado de medula óssea	M	2012
Ipec 04/12	Clínica	Aspirado de medula óssea	F	2012
Ipec 05/12	Animal (gato)	Exsudato de lesão	D	2012
Ipec 06/12	Clínica	Aspirado de medula óssea	F	2012
Ipec 07/12	Animal (cão)	Biópsia de linfonodo	D	2012
Ipec 09/12	Clínica	Lavado broncoalveolar	M	2012
Ipec 11/12	Clínica	Biópsia de pele	M	2012
20231	Clínica	Raspado de lesão oral	M	2001
38874	Clínica	Aspirado de medula óssea	M	2012
39130	Clínica	Aspirado de medula óssea	F	2010
39439	Clínica	Aspirado de medula óssea	M	2011
42247	Clínica	Sangue	M	2011
44938	Clínica	Aspirado de medula óssea	F	2012
46028	Clínica	Aspirado de medula óssea	F	2013
46176	Clínica	Biópsia de pele	M	2013
46693	Clínica	Biópsia de pele	M	2013
36 gal	Clínica	Sangue	M	2013
RS 36	Animal (rato)	Fígado e baço	D	1981
RPS 35	Ambiental	Solo	-	1983
RPS 86	Ambiental	Solo	-	1984
EP 02	Ambiental	Solo	-	1981
CO 04	Ambiental	Solo	-	1981
IT 01	Ambiental	Solo	-	1981
TI 01	Ambiental	Solo	-	1984
TI 05	Ambiental	Solo	-	1984
IGS 4/5	Ambiental	Solo	-	1981

D: desconhecido

## **4.3 FENOTIPAGEM**

### **4.3.1 CARACTERIZAÇÃO MACRO E MICROMORFOLÓGICA DAS COLÔNIAS FÚNGICAS**

Os isolados de *H. capsulatum* estavam sendo conservados em óleo mineral e *in natura* a 25 e 4°C e foram semeadas em duplicata em meio de PDA (Potato dextrose Agar, Difco Laboratories), e incubadas a 25°C, para análise das características morfológicas das colônias. Características fenotípicas como tipo de colônia (filamentosa ou leveduriforme), textura, cor e produção de pigmento foram primeiramente observadas. Posteriormente, foram realizadas culturas em lâmina utilizando meio PDA, incubadas a 25°C por 15 dias e coradas com lactofenol azul-de-algodão (Sigma-Aldrich) para observação das características micromorfológicas do fungo.

### **4.3.2 CAPACIDADE DE CONVERSÃO MICÉLIO-LEVEDURA**

Para verificação de dimorfismo foram realizados repiques das culturas em meio de cultura para conversão como ML-GEMA (2,1% de Muller-Hinton Broth, 1% de Agar, 2% de dextrose, 0,2% de cisteína, 15 ml de gema de ovo) agar sangue de carneiro (10% de extrato de carne, 10% de peptona caseína, 5% de cloreto de sódio, 15% de agar), BHI com cisteína (17,5% de infusão de cérebro-coração, 10% de peptona, 2,0% de glicose, 5,0% de cloreto de sódio, 2,5% de fosfato dissódio, 15% de agar e 1% de cisteína) PYG com cisteína (0,5 % peptona, 0,5 % extrato de levedura, 2 % glicose, 1,5% Agar) e incubados a 37°C. A avaliação da conversão pelos isolados foi realizada de forma semiquantitativa, sendo atribuídas as seguintes taxas de porcentagem: 0% se não houvesse conversão de micélio para leveduras, 25% se houvesse presença de muitas hifas e poucas leveduras, 50% se o número de ambas as estruturas fosse equivalente, 75% para grande número de leveduras e presença de poucas hifas e 100% para presença de leveduras, apenas.

### **4.3.3 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE UREASE**

Para verificar a produção de urease pelos diferentes isolados, as amostras do estudo foram semeadas em caldo uréia de Christensen (CHRISTENSEN, 1946; KANE; FISCHER, 1971). Para a inoculação foram utilizadas suspensões equivalentes à escala 2,0 de McFarland de células leveduriformes de cada um dos isolados. Um volume de 500 µL das suspensões foi

inoculado em 4,5 mL de caldo uréia e os tubos foram incubados a 37°C. Ao final de sete dias de incubação os tubos foram centrifugados e um volume de 100 µL do sobrenadante transferido para uma placa de 96 poços com fundo chato. A absorbância das amostras foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 559 nm, o qual corresponde ao pico de absorção de amostras positivas. Como controles, negativo e positivo, foram utilizados os isolados *Candida albicans* ATCC 18804 e *Cryptococcus neoformans* ATCC 32045 respectivamente, segundo protocolo modificado desenvolvido por Christensen (1945).

#### **4.3.4 DIFERENCIAÇÃO EM FENÓTIPO ALBINO E *BROWN***

Isolados de *H. capsulatum* na sua fase leveduriforme foram cultivadas em placas de Sabouraud Modificado (MSAB) contendo 0,004% de roxo de bromocresol (BCP), utilizado como indicador de pH em cultivo. As placas foram incubadas no escuro, entre 24 e 48 horas a 37°C. Os resultados obtidos foram avaliados através de observação visual na mudança da cor da colônia. Colônias que permaneceram brancas foram classificadas como albinas e as colônias que apresentaram coloração azulada com brilho metálico, como *brown* (BERLINER, 1973b).

#### **4.3.5 CRESCIMENTO EM PH ÁCIDO E BÁSICO**

Foram preparadas placas de MSAB em quatro diferentes pHs: 4,0; 5,5; 7,0 e 10,0. Um inóculo pontual de cada isolado em sua fase miceliana foi realizado para todos os pHs e as placas incubadas durante 7 dias à temperatura de 25 °C. Após este período foi medido o tamanho da colônia em centímetros com o uso de uma régua milimetrada (BERLINER, 1973a).

#### **4.3.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MELANINA**

Para observar a melanização de *H. capsulatum*, um fragmento de cada isolado na fase filamentosa após crescimento em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) foi cultivado por inóculo pontual em placas contendo Meio Mínimo quimicamente definido (MM: 15,0 mM glicose, 10,0 mM MgSO<sub>4</sub>, 29,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 13,0 mM glicina, 3,0 mM tiamina, pH 5,5) e acrescido de 2% de ágar a 25°C durante 30 dias. Após este período os isolados foram clasificados de acordo com a cor da colônia e a produção de pigmento no reverso (NOSANCHUK et al, 2002). Para avaliar a capacidade de utilização de substratos exógenos no processo de

produção de eumelanina, os isolados também foram cultivados em MM com adição de 1 mM de L-DOPA (Sigma-Aldrich). As culturas foram mantidas no escuro para evitar a fotopolimerização. Após 15 e 30 dias de incubação foi verificada a quantidade relativa de melanina produzida pelas colônias nesses diferentes meios de cultivo de acordo com a cor da colônia e produção de pigmento no reverso, além da avaliação por intensidade ou grau de melanização, conforme metodologia descrita por Almeida-Paes, na qual a avaliação na forma visual: (-) para as colônias fúngicas que permaneceram brancas, (+) para as colônias fúngicas em tom marrom claro, (++) se a coloração das colônias fosse marrom escura ou (+++) se as colônias assumissem coloração negra após 15 ou 30 dias de incubação (ALMEIDA-PAES, 2012a). Para avaliar a produção de piomelanina, os isolados foram semeados na fase leveduriforme em frascos contendo meio Ham-F12 (Gibco) e incubados em estufa com agitação de 150rpm a 37°C durante 14 dias, e também inoculados frascos com Ham-F12 acrescidos de 10 mM de L-tirosina (Sigma-Aldrich). A avaliação da produção de pigmento foi realizada por leitura em espectrofotômetro com filtro de 340nm, após centrifugação das culturas a 1050 x g por 10 minutos, com retirada de 100 µl do sobrenadante e adição a placa de ELISA de 96 poços (ALMEIDA-PAES, 2012b).

#### **4.3.7 PESQUISA DE EXOANTÍGENOS**

##### **4.3.7.1 PRODUÇÃO DE EXOANTÍGENOS**

Um fragmento miceliano de aproximadamente 3 mm<sup>3</sup> dos isolados de *H. capsulatum* foi transferido para um frasco contendo 15 ml de BHI (Brain Heart Infusion - DIFCO) líquido, e incubado com agitação a 150 rpm por 7 dias a 25°C em estufa, sendo adicionado 100 µl de timerosal no 6º dia de incubação. Após este período, as culturas foram centrifugadas 1050 x g por 10 minutos, e o sobrenadante concentrado 50 x utilizando o concentrador Amicon Minicon Macrosolute B 15 (Amicon Co.). O produto final foi armazenado sob refrigeração e posteriormente analisado pelas técnicas ID e WB.

##### **4.3.7.2 ANÁLISE DE EXOANTÍGENOS POR IMUNODIFUSÃO DUPLA**

Os productos concentrados 50X obtidos na fase anterior foram adicionados a lâminas cobertas com gel de agarose. Para cada reação foi utilizado soro-padrão e antígeno-padrão

específicos para os antígenos H e M. As lâminas foram incubadas em câmara úmida e posteriormente coradas com Azul de Comassie (Sigma-Aldrich) para avaliar a presença de linha de precipitação nas lâminas (STANDARD; KAUFMAN, 1976).

#### **4.3.7.3 ANÁLISE DE EXOANTÍGENOS POR WESTERN-BLOT**

Pela técnica de *Western-blot*, estes concentrados foram submetidos a uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% utilizando um peso molecular (Invitrogen LC5925) e como antígeno padrão histoplasmina purificada e tratada e antissoros homólogos de coelho. Após a eletroforese foi realizada a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose, bloqueio de ligações inespecíficas, incubação com antissoro de coelho e revelação com peroxidase (REISS et al., 2000).

#### **4.3.8 PLANO DE ANÁLISE**

Foi utilizada para análise dos resultados, estatística descritiva básica (médias, mediana, moda, valores máximos e mínimos), e gráficos foram construídos utilizando o software Prism 5.0. Cálculos foram realizados utilizando o software SPSS 16.0.

#### **4.3.9 ANÁLISE DE FENÓTIPOS IDÊNTICOS**

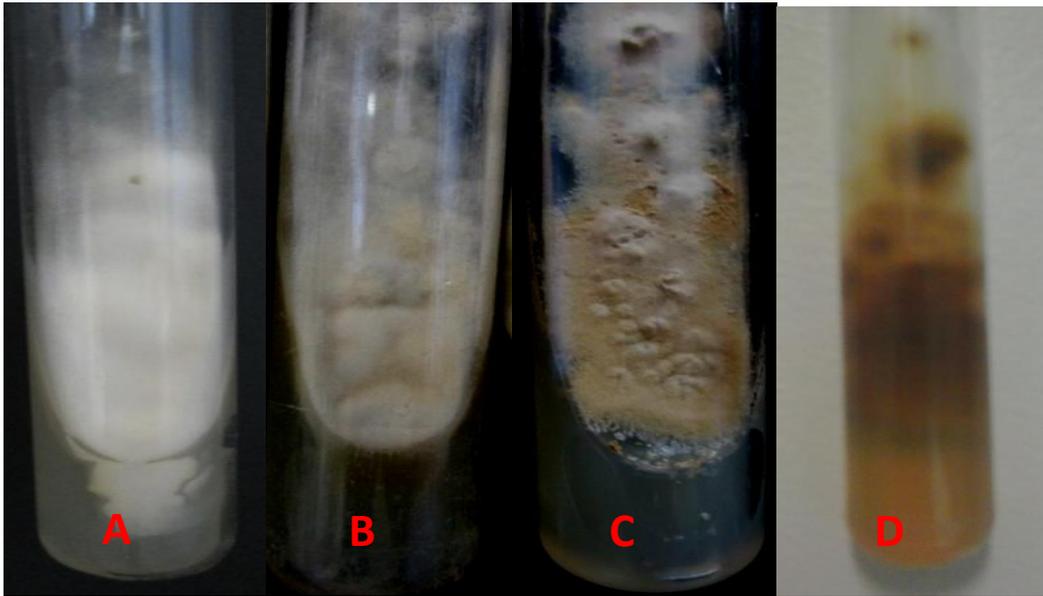
A partir da correlação entre todos os resultados fenotípicos, os isolados serão avaliados a fim de se obter dentre eles, aqueles que apresentem o mesmo perfil fenotípico, e que possam ser considerados cepas-tipo do estado.

## 5 RESULTADOS

A análise de todas as metodologias empregadas para a fenotipagem dos isolados demonstrou que, na análise morfológica das colônias, houve predominância de isolados de cor branca e aspecto cotonoso. A presença de micro e macronídios foi observada em 25 dos 30 isolados. Na classificação em fenótipo albino ou *brown*, apenas dois isolados, 38874 e TI01 foram classificados como albinos. Com exceção de um isolado que apresentou baixa capacidade de conversão, todos foram capazes de converter ao menos 50% das células à fase leveduriforme e apresentaram alta produção de urease. Quanto a produção de melanina, os isolados foram capazes de produzir melanina DHN e piomelanina, em fase filamentosa e leveduriforme, respectivamente. A análise de exoantígenos apresentou maior sensibilidade pela técnica de *Western-blot* quando comparada com a imunodifusão dupla, apenas dois isolados (20231 e Ipec 09/12) foram negativos no *Western-blot*, enquanto apenas um isolado (46176) foi positivo pela imunodifusão. Os isolados apresentaram melhor crescimento em pH neutro (7,0) e alcalino (10,0), ao passo que tiveram crescimento reduzido ou inibido em pHs mais baixos. Os resultados de todas as técnicas, para todos os isolados, estão listados no anexo A, com exceção dos resultados obtidos no crescimento em pH ácido e básico.

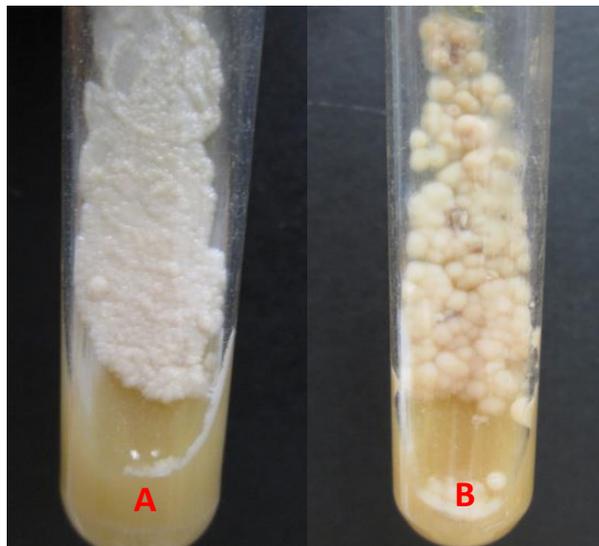
### 5.1 CARACTERIZAÇÃO MACRO E MICROMORFOLÓGICA

Na avaliação dos aspectos macromorfológicos dos isolados, foi possível observar variações de cor entre as colônias micelianas, que variaram de brancas a marrom com aspecto algodinoso ou glabro. A análise destes aspectos permitiu classificar os isolados em 14 colônias de cor branca (46%). Entre estes 12 apresentavam aspecto cotonoso. Todas as colônias restantes (n=18) apresentavam aspecto glabro com variação de cor. Doze colônias (Ipec 22/11, Ipec 24/11, Ipec 25/11, Ipec 27/11, Ipec 01/12, Ipec 05/12, Ipec 06/12, Ipec 07/12, Ipec 09/12, 20231, 42247, 44938) foram bege e 4 colônias (46028, 46176, 46693 e 36 gal) de cor marrom. Figura 1 é representativa de todas estas características (Figura 2A, 2B e 2C). Todos os isolados apresentaram reverso com pigmentação marrom após 21 dias de cultivo em PDA a 25°C (Figura 2D).



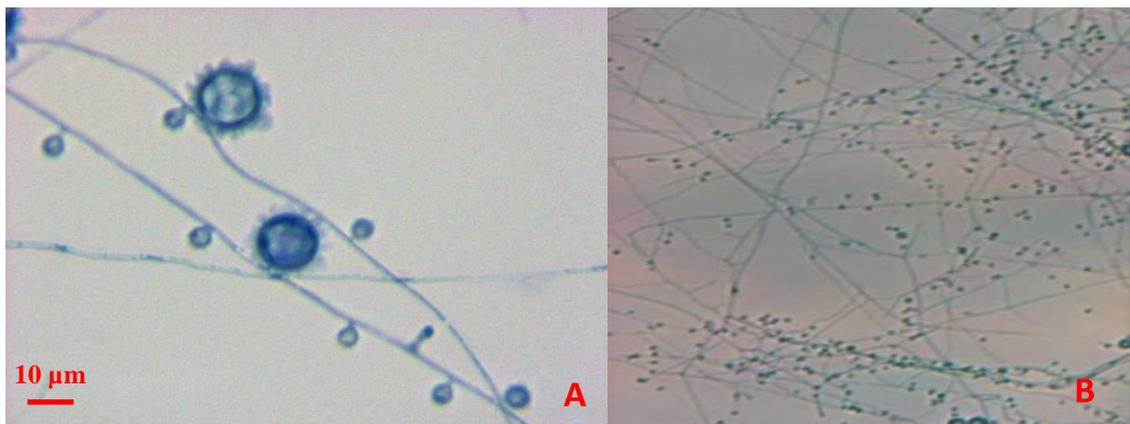
**Figura 2:** Imagem representativa dos aspectos macromorfológicos da fase filamentosa. A: Colônia de cor branca e aspecto algodonofo; B: colônia bege e glabra; C: colônia marrom e glabra; D: pigmentação no reverso do tubo).

Para a fase leveduriforme não foi observada a variação de tons nos isolados. As colônias apresentaram coloração bege e aspecto úmido após 14 dias de incubação em meio ML-GEMA a 37°C (Figura 3A), com exceção de um isolado que apresentou aspecto filamentoso após este período (Figura 3B).



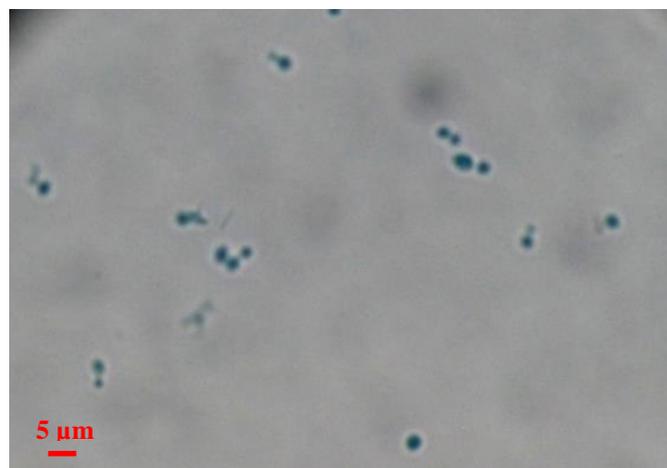
**Figura 3:** Imagem representativa dos aspectos macromorfológicos da fase leveduriforme: A - Colônia representativa dos isolados na cor creme e de aspecto úmido. B - Colônia de coloração creme e aspecto filamentoso.

A micromorfologia dos isolados foi avaliada após a realização da técnica de microcultivo em lâmina e coloração com azul de algodão para a fase filamentosa. Dentre os 30 isolados, 25 apresentaram hifas hialinas, septadas com presença de macro e microconídios (Figura 4A) à microscopia óptica enquanto que 5 isolados (38874, 39130, RS36, RPS86 e TI05) exibiram hifas hialinas, presença de microconídios e ausência de macroconídios (Figura 4B).



**Figura 4:** Micromorfologia da fase filamentosa dos isolados de *H. capsulatum* do Estado do Rio de Janeiro. A: colônia com hifas hialinas septadas, macro e microconídios. B: colônia apresentando hifas hialinas septadas com microconídios presentes e ausência de macroconídios. Aumento de 100x e 40x, respectivamente.

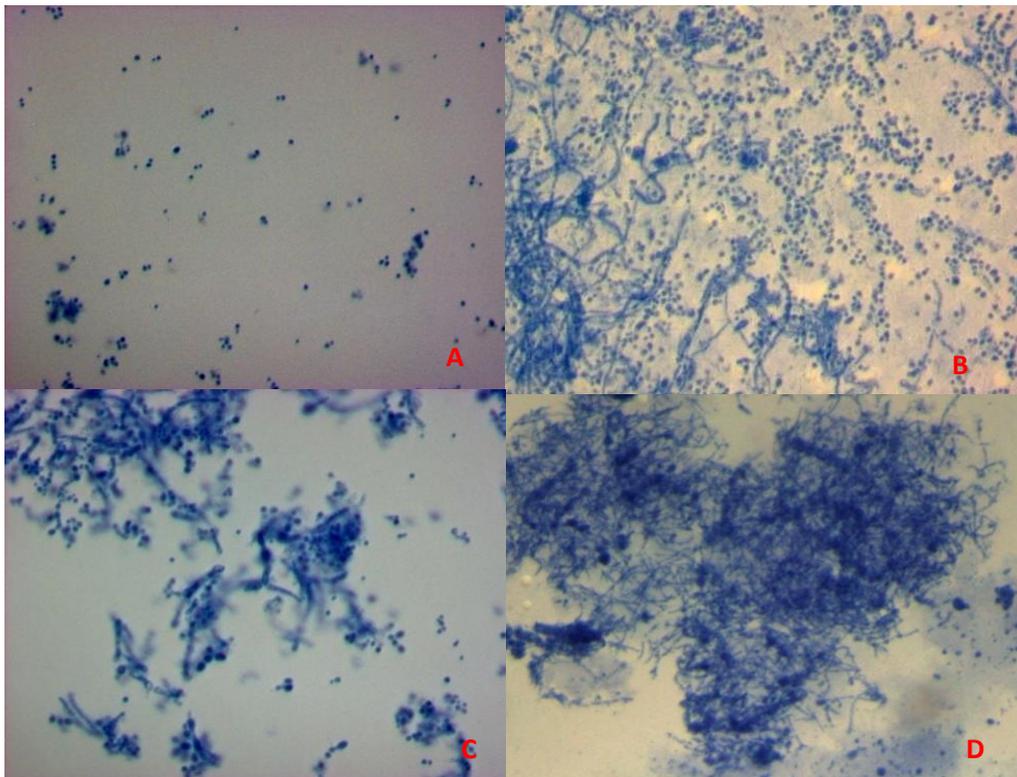
A micromorfologia da fase leveduriforme foi verificada através da confecção de lâminas coradas com lactofenol azul-de-algodão após o crescimento das colônias em meio ML-GEMA por 14 dias a 37°C. Dos 30 isolados, 29 apresentaram leveduras unibrotantes, e um isolado apresentou estruturas micelianas com presença de raras leveduras.



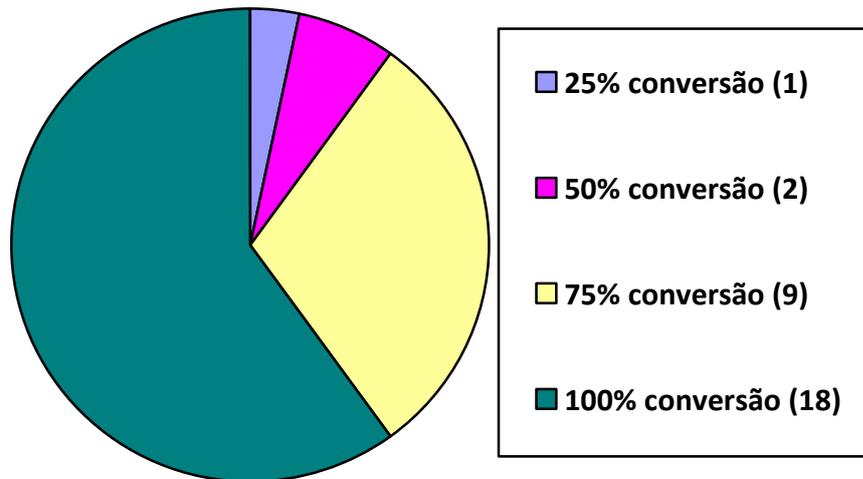
**Figura 5:** Micromorfologia da fase leveduriforme dos isolados de *H. capsulatum* do Estado do Rio de Janeiro: leveduras unibrotantes.

## 5.2 CONVERSÃO MICÉLIO-LEVEDURA

Para avaliar a capacidade dimórfica dos isolados, fragmentos de micélio previamente crescidos em PDA à temperatura de 25°C foram inoculados em meio ML-GEMA e a temperatura de incubação alterada para 36°C a 37°C, condição necessária para realização do dimorfismo pelo fungo. Após 15 dias foram confeccionadas lâminas, que foram coradas com lactofenol azul-de-algodão. Foi realizada uma primeira avaliação semiquantitativa, baseada na presença de leveduras e hifas, com resultado expresso em porcentagem. Para colônias que apresentaram apenas leveduras (n=18) foi considerada uma taxa de 100% de conversão (Figura 6A); colônias com grande número de leveduras e poucas hifas (n=9), 75% de conversão (Figura 6B); se a distribuição de leveduras e hifas fosse semelhante (n=2), 50% de conversão (Figura 6C); para colônias com muitas hifas e poucas leveduras (n=1), 25% (Figura 6D). Os resultados obtidos nesta avaliação são apresentados na figura 6 e no gráfico 1.



**Figura 6:** Avaliação de conversão micélio-levedura nos isolados de *H. capsulatum*. A: isolado com 100% de conversão, B: isolado com 75% de conversão, C: isolado com 50% de conversão e D: isolado com 25% de conversão.

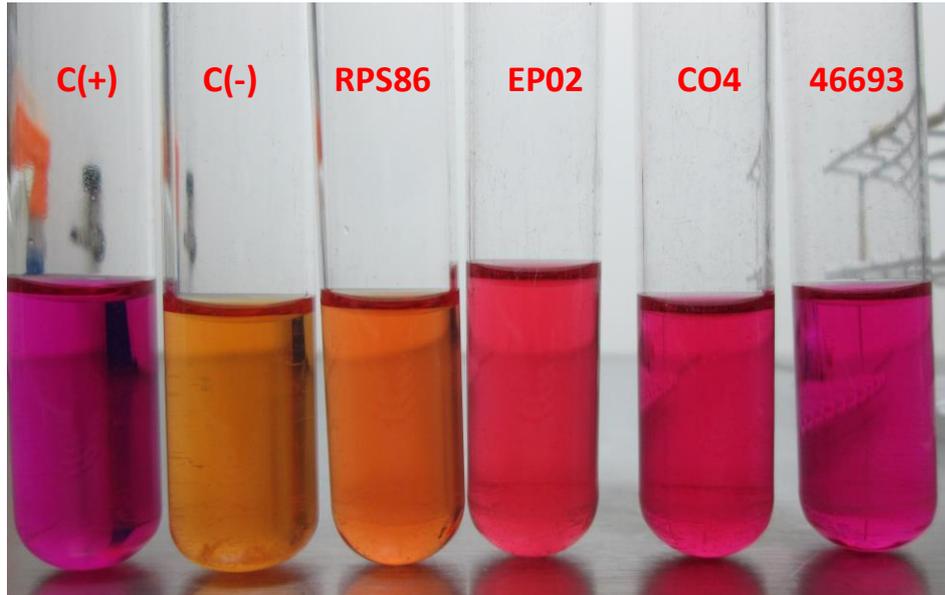


**Gráfico 1:** Porcentagem de conversão micélio-levedura nos isolados de *H. capsulatum* incluídos no estudo.

### 5.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE UREASE

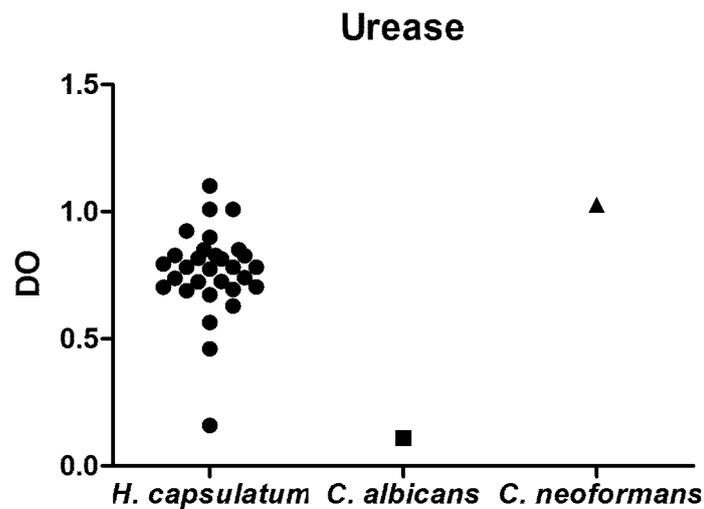
Após o cultivo de uma suspensão de 500 µl de leveduras em caldo uréia de Christensen durante 7 dias a 37°C foi realizada a centrifugação das amostras e alíquotas de 100 µl adicionadas em placas de 96 poços de fundo chato. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com filtro de 559 nm. Em cada incubação e leitura foi utilizado um controle positivo (*C. neoformans* ATCC 32045) e negativo (*C. albicans* ATCC 18804).

Inicialmente os isolados foram classificados de forma qualitativa como produtores de urease através da verificação de alteração de pH nos meios de cultivo, capazes de alterar a cor do meio de amarelo para rosa. Com base neste aspecto, todos os isolados foram classificados como positivos, pois foram capazes de modificar a cor do meio, de amarelo para rosa. A análise visual apresentou variações de intensidade de cor de acordo com a produção de urease pelo isolado, sendo os tons mais claros correspondentes a isolados com baixa produção e os tons mais escuros associados a isolados fortes produtores. A figura 7 ilustra os resultados encontrados nesta análise.



**Figura 7:** Imagem representativa da análise qualitativa da produção de urease. Controle positivo - C(+): *C. neoformans* e controle negativo - C(-): *C. albicans*.

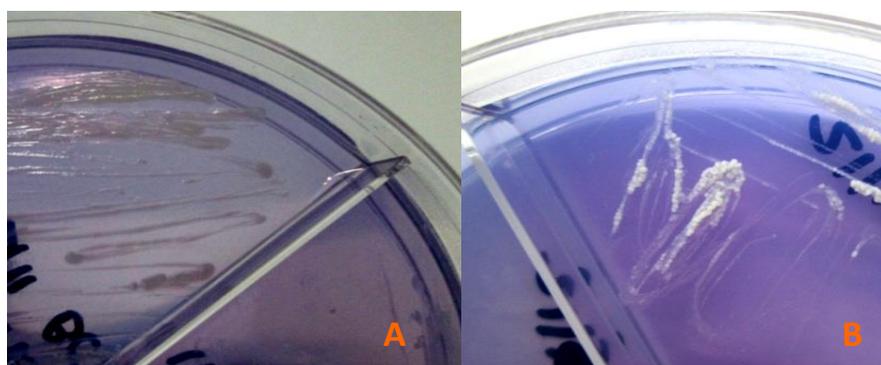
Através da análise quantitativa, foi possível determinar a média dos controles e das amostras, a saber: o controle positivo apresentou média de densidade óptica (D.O) de 1,027 e a leitura de D.O do controle negativo foi de 0,111. A variação de D.O nos 30 isolados foi de 0,16 a 1,054, com uma mediana de 0,697. Os isolados foram classificados quanto a produção de urease da seguinte maneira: fraco produtor (D.O. = 0,160-0,474), médio produtor (D.O. = 0,475-0,788) e forte produtor (D.O. = 0,789-1,102). O gráfico 2 apresenta os resultados deste experimento para todos os isolados. Apenas um isolado (RPS 86) apresentou baixa leitura de D.O. sendo esta de 0,160 e foi classificado como baixo produtor de urease.



**Gráfico 2:** Quantificação da produção de urease através da distribuição das leituras de D.O dos isolados de *H. capsulatum* do Rio de Janeiro. *C.a:* *Candida albicans* (controle negativo) e *C.n:* *Cryptococcus neoformans* (controle positivo)

#### 5.4 DIFERENCIAÇÃO EM FENÓTIPO ALBINO E *BROWN*

A classificação dos 30 isolados em albino e *brown* foi realizada na fase leveduriforme de acordo com metodologia proposta por Berliner em 1973. Foi observada a mudança de cor da colônia para azul metálica após o período de incubação de 48 horas em meio MSAB contendo o corante roxo de bromocresol em 28 destes isolados, sendo assim classificadas como fenótipo *brown*. Em dois isolados (38874 e TI01) a cor da colônia permaneceu branca e foram identificadas como fenótipo albino. A figura 8 apresenta os dois fenótipos observados.



**Figura 8:** Imagem representativa da avaliação de fenótipos albino e *brown*. A: colônia leveduriforme de coloração azulada e com brilho metálico (*brown*), n= 28. B: colônia leveduriforme de coloração branca (albino), n= 2.

## 5.5 CRESCIMENTO EM PH ÁCIDO E BÁSICO

Os isolados de *H. capsulatum* foram inoculados em placas de Sabouraud com quatro diferentes pHs: dois pHs ácidos (4,0 e 5,5), um pH neutro (7,0) e um pH básico (10,0). Após o período de incubação de sete dias foi possível observar crescimento dos isolados em todos os valores de pH avaliados, com crescimento ótimo nos valores 7,0 e 10,0, ao passo que todos os isolados tiveram o crescimento reduzido quando inoculados em pH 5,5 e 12 isolados foram inibidos em pH 4,0 (Ipec 22/11, Ipec 27/11, Ipec 04/12, Ipec 07/12, Ipec 09/12, 44938, 46693, RPS 86, CO4, Igs 4/5, TI 01, TI 05). A análise do crescimento das colônias apresentou números que variaram desde isolados sem crescimento a isolados que cresceram 4,0 cm de diâmetro em placa. A tabela 1 apresenta os dados estatísticos do crescimento dos isolados em centímetros, o pH 4,0 foi o único que apresentou isolados com ausência de crescimento e em pH 7,0 foi observado o maior crescimento em centímetros (4,0). As maiores médias e medianas observadas (1,5) foram nos pH's 7,0 e 10,0.

**Tabela 1:** Crescimento de isolados de *H. capsulatum* em diferentes níveis de pH.

PARÂMETROS ESTATÍSTICOS	CRESCIMENTO DAS COLÔNIAS (CM) NOS VALORES DE PH			
	pH 4,0	pH 5,5	pH 7,0	pH 10,0
MEDIANA	0,5	1,0	1,5	1,5
MODA	0,5	1,0	1,5	1,5
VALOR MÍNIMO	0,0	0,5	1,0	1,0
VALOR MÁXIMO	1,5	1,0	4,0	2,0

## 5.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MELANINA

Na avaliação da produção de melanina pelos isolados, foram analisados os seguintes tipos de melanina: melanina DHN, eumelanina e piomelanina.

### 5.6.1 MELANINA DHN

Após o crescimento dos isolados em meio MM durante 30 dias, foi observado que 14 colônias apresentaram coloração branca sem pigmento no reverso, 10 colônias foram brancas com pigmento marrom no reverso, e 6 colônias apresentam cor bege e reverso marrom.

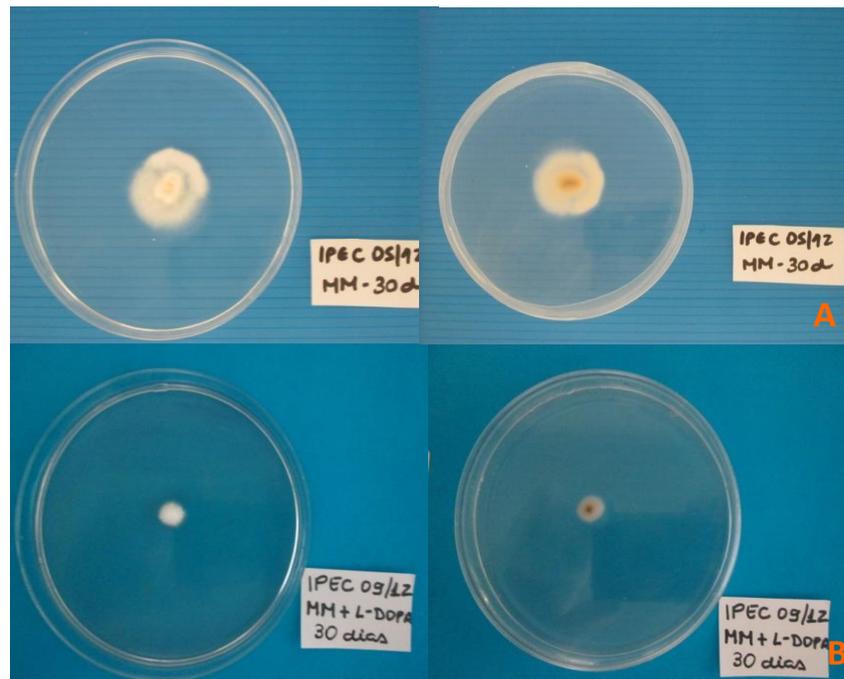
- 1 Meio Mínimo: 14 colônias brancas com reverso sem pigmento
  - 10 colônias brancas com reverso marrom
  - 6 colônias bege com reverso marrom

### 5.6.2 EUMELANINA

Para determinar se os isolados de *H. capsulatum* seriam capazes de produzir eumelanina, estes foram inoculados em placas de MM acrescidas de L-DOPA e incubadas no escuro por 30 dias a 25°C. Após 15 e 30 dias foi realizada a leitura das placas, e os resultados demonstraram que houve estímulo na produção de melanina com a adição de L-DOPA, apenas nos isolados (Ipec 22/11, 20231, 46028, 46176, 46693 e 36Gal) que já haviam produzido melanina sem a adição deste precursor. Visualmente, foi observado que a pigmentação no reverso de 16 colônias passou de marrom a negro. Utilizando a classificação prevista anteriormente, apenas 6 colônias apresentaram coloração bege em MM + L-DOPA e foram positivas para a produção de eumelanina, 10 colônias apresentavam coloração marrom no reverso, mesmo em colônias de cor branca. A classificação dos isolados segue abaixo:

- MM + L-DOPA: 14 colônias brancas com reverso sem pigmento
  - 10 colônias brancas com reverso negro
  - 6 colônias bege com reverso negro

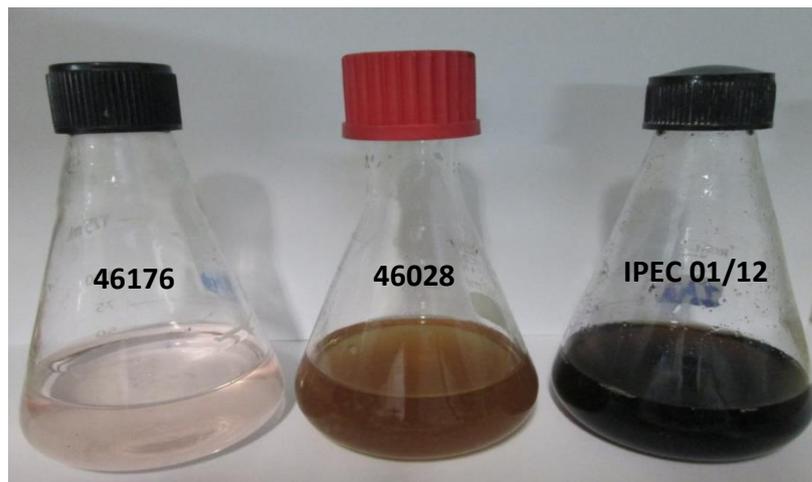
Alguns dos aspectos visuais das colônias inoculadas em ambos os meios estão representados na Figura 9.



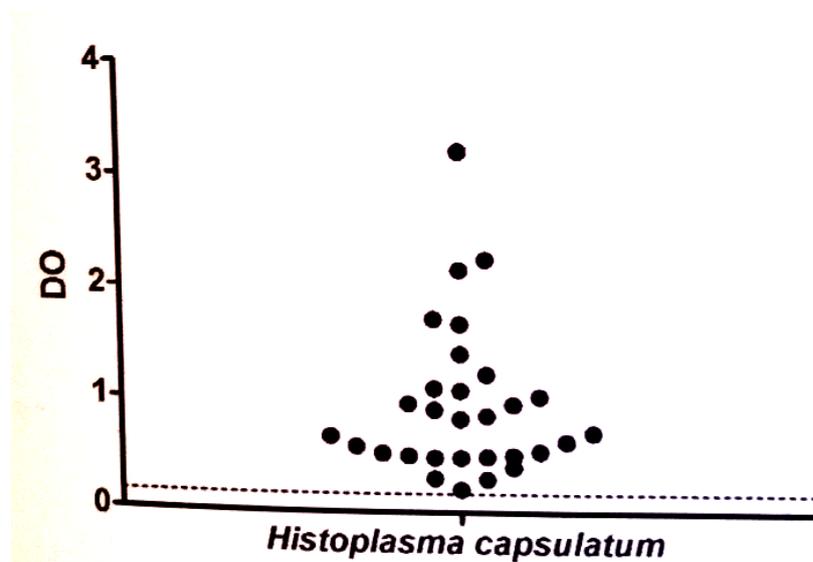
**Figura 9:** Produção de melanina DHN e eumelanina em isolados de *H. capsulatum*. A: uma colônia em MM após 30 dias, frente e reverso. B: colônia em MM + L-DOPA apresentando características semelhantes.

### 5.6.3 PIOMELANINA

Para esta análise, um inóculo realizado com alça calibrada de 10  $\mu$ l de leveduras de cada isolado foi adicionado a frascos contendo meio Ham's F-12 e L-tirosina. Os frascos foram incubados à temperatura de 37°C em estufa com agitação de 150 rpm durante 14 dias. Após este período, a análise visual revelou colônias que não apresentaram pigmentação no meio de cultura líquido e colônias com pigmentação variando de tons de marrom a negro, conforme apresentado na figura 10.



**Figura 10:** Produção de piomelanina em isolados de *H. capsulatum*. A variação de pigmentação revelou desde isolados com baixa produção de pigmento (46176, D.O = 0,500), isolados capazes de produzir pigmento de cor marrom (46028, D.O = 1,089) e isolados que produziram pigmento de cor negra (Ipec 01/12, D.O = 2,126).

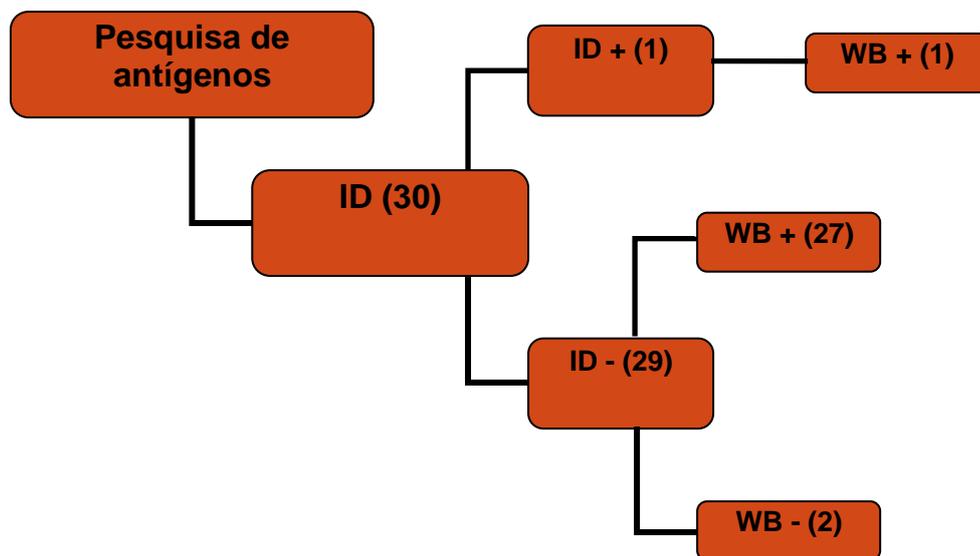


**Gráfico 3:** Produção de piomelanina em isolados de *H. capsulatum* do Rio de Janeiro: Leituras de D.O de sobrenadantes de cultura de *H. capsulatum*

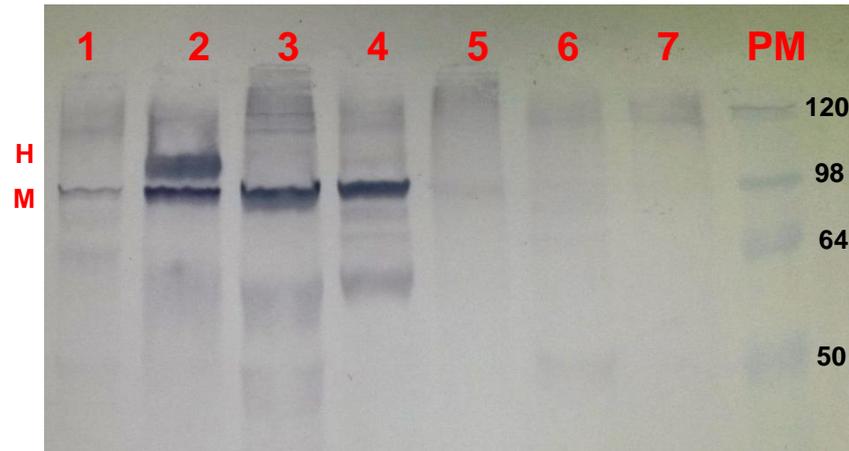
A leitura de D.O da fase leveduriforme foi realizada em todos os 30 isolados. A variação de D.O entre eles foi de 0,201 a 2,218, sendo a mediana 0,920. A leitura do branco foi 0,161.

## 5.7 PESQUISA DE EXOANTÍGENOS

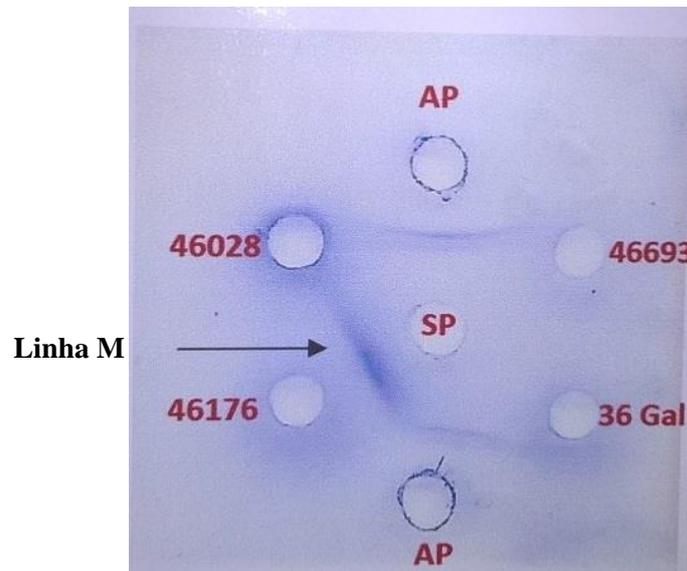
A utilização da técnica de imunodifusão dupla na pesquisa de exoantígenos com sobrenadantes de cultura concentrados apresentou reação positiva em apenas um isolado, com presença de linha de identidade com o antígeno M (Figura 11). A partir destes resultados, foi efetuada a análise de exoantígenos a partir da técnica de Western-blot (WB) que apresentou reação positiva para 28 isolados, sendo 22 para antígeno M, apenas, e seis para H e M. Esta metodologia se mostrou mais sensível que a imunodifusão. Os resultados estão resumidos no fluxograma abaixo.



**Figura 11:** Fluxograma comparativo entre imunodifusão dupla e *Western-blot*



**Figura 12:** Imagem representativa de western-blot para amostras de *H. capsulatum*. As amostras de 1, 3, 4 e 5 apresentam banda na altura de 94kDa, correspondente ao peso do antígeno M de *H. capsulatum* e amostra 2 apresenta também uma banda de 120 kDa, característica do antígeno H.



**Figura 13:** Imunodifusão em gel de agarose. Isolado 46176 apresentando linha de precipitação M.

**SP:** soro padrão; **AP:** antígeno padrão

## 5.8 ANÁLISE DE FENÓTIPOS IDÊNTICOS

Na análise global de nossos resultados foi verificado que 4 isolados (Igs 4/5, CO4, EP02 e RPS 35) obtidos de solo de diferentes regiões geográficas do estado do Rio de Janeiro, bem como uma cepa clínica (Ipec 04/12) apresentaram fenótipos idênticos sugerindo que este fenótipo poderia ser considerado tipo característico do Estado do Rio de Janeiro.

## 6 DISCUSSÃO

Os dados literários (PINE, 1960) sobre a classificação morfológica de isolados de *H. capsulatum* apresentam resultados semelhantes aos que encontramos neste estudo. Dentre os 30 isolados, 25 apresentaram características morfológicas clássicas no que diz respeito à cor e aspecto das colônias, e presença de estruturas fúngicas micelianas, como hifas hialinas septadas, macroconídios tuberculados, microconídios e a capacidade de conversão à forma leveduriforme. Dentre os isolados, apenas cinco não apresentaram macroconídios à microscopia, sendo nestes isolados observadas apenas hifas hialinas e microconídios.

Poucos são os estudos realizados para classificação dos fenótipos de *H. capsulatum* em albino ou *brown*. Tewari em 1972 observou que o fenótipo *brown* demonstrava ser mais virulento quando em experimentação animal com camundongos. Berliner, (1973b), analisou diferentes meios de cultivo adicionados de diferentes indicadores de pH, e com o uso de cepas de referência avaliou as melhores condições para evidenciar e distinguir os fenótipos de *H. capsulatum* na fase leveduriforme em albino e *brown*. No presente estudo, foi observada uma maior prevalência do fenótipo *brown*, uma vez que este fenótipo corresponde a isolados com grande número de macro e microconídios, perfil morfológico observado em 25 dos 30 isolados do estudo, corroborando com os dados da literatura quanto à classificação dos fenótipos em albino e *brown* (BERLINER, 1973b). Em nossa avaliação, pudemos associar a caracterização do fenótipo albino com a baixa produção de melanina, os dois isolados classificados como albinos foram negativos para a produção de eumelanina, bem como também apresentaram baixa produção de melanina DHN e piomelanina.

Quanto à capacidade de isolados de *H. capsulatum* crescerem em diferentes valores de pH, os resultados obtidos no estudo são semelhantes aos do trabalho realizado por Berliner (1973a). Estes dados demonstram que o fungo é capaz de crescer também em situações variadas quanto a esse tipo de condição. E que, de fato, a melhor faixa para seu crescimento é aquela correspondente à encontrada tanto no solo quanto no interior do organismo humano. O pH do solo enriquecido com compostos nitrogenados é o ideal para o crescimento de *H. capsulatum*. Um estudo avaliando prevalência e distribuição de fungos em solos na Índia, identificou a presença de *H. capsulatum* em solos com pH 7,5 e 9,0 (JAIN et al., 2012). Já o valor de pH sanguíneo normal está entre 7,35 e 7,45 (MOTA; QUEIROZ, 2010). Desta forma, os resultados obtidos nesta análise corroboram com aqueles descritos na literatura (BERLINER, 1973a).

A pesquisa de exoantígenos é uma ferramenta útil para a caracterização de isolados de *H. capsulatum* através da identificação dos antígenos H e M do fungo. Esta análise também pode ser utilizada no diagnóstico laboratorial da histoplasmose, através da pesquisa de anticorpos em amostras de soro dos pacientes de casos suspeitos. A imunodifusão dupla, técnica desenvolvida por Ouchterlony em 1953, pode ser utilizada tanto para a pesquisa de antígenos quanto de anticorpos de *H. capsulatum* (OUCHTERTLONY, 1953). Standard e Kaufman (1976) avaliaram a presença de exoantígenos em isolados de *H. capsulatum* através da imunodifusão dupla e obtiveram uma sensibilidade de 100%. Alguns estudos desenvolvidos posteriormente, também apontaram a pesquisa de exoantígenos como uma ferramenta rápida, de fácil execução e alta sensibilidade para caracterização de isolados de *H. capsulatum* (DISALVO, 1980; PADHYE, 1992). Em nossa avaliação, pudemos evidenciar que, diferente dos trabalhos relatados anteriormente, para a pesquisa de antígenos de *H. capsulatum* a partir de culturas fúngicas, a técnica de imunodifusão dupla não apresentou boa sensibilidade na caracterização dos exoantígenos. Apenas um isolado apresentou linha de precipitação correspondente ao antígeno M. Em contrapartida, ao utilizar o método de *Western-blot* para a caracterização dos exoantígenos, 28 isolados apresentaram reação positiva, 22 isolados positivos para o antígeno M e seis apresentavam ambos os antígenos, H e M. Estes dados estão de acordo com o trabalho publicado por Reiss e colaboradores (2000), que observaram que métodos imunológicos como o *Western-blot* podem aumentar a sensibilidade na detecção de exoantígenos de *H. capsulatum*. Apenas dois isolados apresentaram reação negativa pelo *Western-blot*, entretanto, ambos apresentaram presença de macro e microconídios em microcultivo, bem como capacidade de conversão *in vitro*. Neste caso, sucessivos repiques por longo período destes isolados podem ter interferido na capacidade de produção de exoantígenos.

A necessidade de conversão da fase filamentosa de *H. capsulatum* à fase leveduriforme é reconhecida como obrigatória para a confirmação do diagnóstico da histoplasmose (NEMECEK et al., 2006). Meddoff em 1986 observou que cepas incapazes de converter a fase leveduriforme tornavam-se avirulentas (MEDDOFF, 1986). De forma semelhante, neste trabalho foi possível observar a ocorrência de um isolado que apresentou baixa conversão à fase leveduriforme quando incubado a temperatura de 37°C. Este mesmo isolado apresentou características discrepantes dos demais quando submetido à execução de testes que dependiam da obtenção de leveduras para sua execução como produção de urease e melanina, apresentando resultados significativamente mais baixos que os demais. No entanto,

este isolado apresentou reação positiva para a pesquisa do antígeno M de *H. capsulatum*, na técnica de *Western-blot*.

Diferente de outros fungos patogênicos, como *Cryptococcus neoformans*, por exemplo, que já teve a produção de urease confirmada como um fator de virulência, estudos sobre a produção de urease em *H. capsulatum* são escassos. Segundo De Hoog (2000) apenas *H. capsulatum* var. *capsulatum* seria capaz de produzir urease *in vitro*. Entretanto, em 2003, Sharmin e colaboradores avaliaram a produção de urease em 50 isolados de *H. capsulatum*, dentre eles 40 de *H. capsulatum* var. *capsulatum*, cinco de *H. capsulatum* var. *duboisii* e cinco de *H. capsulatum* var. *farciminosum*. Todos os 50 isolados foram capazes de degradar a uréia quando cultivados em caldo uréia de Christensen (SHARMIN, 2003). Sendo assim, os resultados obtidos em nossa avaliação coincidem com aqueles observados por Sharmin e colaboradores, uma vez que todos os isolados do presente estudo foram positivos no teste qualitativo de produção de urease. Apenas o isolado RPS 86 apresentou baixa produção de urease, embora tenha sido capaz de virar o indicador de pH para rosa. Porém em nossa avaliação utilizamos a fase leveduriforme do fungo, e não a filamentosa, o que necessita a conversão *in vitro* do fungo, e este isolado não apresentou conversão completa, resultando num baixo número de leveduras para o preparo do inóculo. A virulência destes isolados não foi testada para que pudesse ser comparada aos achados de Sharmin que não observou correlação entre patogenicidade e produção de urease ao utilizar sete isolados após conversão em inoculação animal. Porém, acreditamos poder encontrar alguma correlação em estudos futuros, pois os isolados que apresentaram alta produção de urease, também produziram melanina em maior quantidade, e a melanina já é um fator de virulência reconhecido em diversas espécies fúngicas. Assim como a produção de urease representa um fator de virulência em fungos como *C. neoformans* e *C. posadasii*, sugerimos a possibilidade de que a urease possa estar ligada ao aumento de virulência também em *H. capsulatum*.

Um dos fatores de virulência mais estudado em fungos são as melaninas. São inúmeros os trabalhos relatando a produção e efeito protetor em diversos modelos fúngicos (PAGANO; DHAR, 2015). Com relação à produção de melanina DHN, analisando a cor da colônia macroscopicamente na fase filamentosa, apenas seis isolados apresentaram pigmentação na colônia (cor bege) e 16 foram capazes de produzir pigmento marrom no reverso da colônia quando cultivados em MM após 30 dias. Sendo assim, os dados sugerem de *H. capsulatum* seriam capazes de produzir pigmento independente da adição de compostos externos, porém, para isto seria necessária a extração de pigmento em todos os isolados, a fim de analisá-los e classificá-los corretamente como um tipo de melanina. Estudos previamente

realizados com isolados de *H. capsulatum*, demonstraram que a presença deste tipo de pigmento está localizada nos conídios do fungo (NOSANCHUCK et al., 2002), em nosso estudo observamos que isolados que apresentavam macroconídios, também foram produtores de melanina DHN (n=16), e todos os isolados com ausência de macroconídios não apresentaram produção visível deste tipo de melanina (n=5). Entretanto, nove isolados apresentaram dados discrepantes nesta análise, pois apresentavam presença de macroconídios e ausência na produção de melanina DHN visualmente quando cultivados em meio de cultura. No entanto, a análise visual não representa uma metodologia suficiente para confirmar a produção de melanina pelos isolados, sendo necessária nestes isolados realizar futuramente a extração de melanina a partir dos conídios para confirmar a presença de melanina DHN nos mesmos.

Avaliando a produção de eumelanina em isolados de *H. capsulatum*. Nosanchuck e colaboradores em 2002 demonstraram através de experimentos *in vitro* e *in vivo*, que o fungo é capaz de produzir eumelanina através da via L-DOPA tanto na fase filamentosa, quanto leveduriforme (NOSANCHUCK et al., 2002). No mesmo ano, estudo realizado com isolados melanizados de *C. neoformans* e *H. capsulatum* demonstrou que a presença do pigmento confere maior proteção às células fúngicas contra a ação de antifúngicos como anfotericina B e caspofungina (VAN DUIN et al., 2002). Em nosso trabalho, os resultados desta avaliação foram semelhantes à produção de melanina DHN, pois também foi verificada a pigmentação de cor bege na colônia em seis isolados e produção de pigmento no reverso de 16 isolados. Entretanto, a adição de L-DOPA ao meio de cultura (MM) foi capaz de estimular a produção de pigmento nos isolados que já apresentavam pigmentação no reverso da colônia. Nestes isolados a coloração no reverso da colônia passou de marrom a negra. A cor das colônias, entretanto, não sofreu modificação, colônias brancas permaneceram brancas e colônias de cor bege permaneceram bege. Não avaliamos, no entanto, a produção de eumelanina em leveduras, mas apenas na fase filamentosa.

Estudos recentes têm verificado ainda que diversos fungos são capazes também de produzir um tipo de melanina solúvel, a partir da disponibilidade de L-tirosina, a piomelanina. Modelo experimental com *Aspergillus fumigatus* demonstrou a capacidade do mesmo em produzir piomelanina (SCHMALER-RIPCKE et al., 2009). Almeida-Paes e colaboradores em 2012 avaliaram a produção de piomelanina em isolados de *Sporothrix schenckii*, *S. brasiliensis* e *S. globosa* e observaram que células produtoras de piomelanina eram menos susceptíveis à ação da radiação ultravioleta e a compostos oxidativos nitrogenados

(ALMEIDA-PAES et al., 2012). Nosso trabalho traz a primeira avaliação de produção de piomelanina em isolados clínicos e ambientais de *H. capsulatum*.

A caracterização fenotípica visando a aplicação de alguns isolados/cepas de microrganismos em estudos taxonômicos e produção de reagentes para serem utilizados no diagnóstico microbiológico é um dos fatores preponderantes nos estudos que avaliam fenótipos e/ou genótipos, uma vez que variações intra-específicas são enormes em organismos eucariotos. Tem-se demonstrado que há uma grande variabilidade inter-laboratorial no diagnóstico imunológico da paracoccidiodomicose (BATISTA et al., 2009; VIDAL et al., 2014) uma vez que a maioria dos ensaios são realizados com antígenos e anticorpos produzidos *in house* onde se demonstrou que a preparação antigênica deve ser um dos grandes fatores que influenciam a acurácia dos testes sorológicos.

Sabe-se que a composição estrutural da parede celular de *H. capsulatum* é bem complexa, e de grande importância, uma vez que esta representa a estrutura fúngica que interage com o ambiente e com o hospedeiro. É composta por carboidratos como quitina,  $\alpha$ -1,3-glucana,  $\beta$ -1,3-glucana, galactomanana, manoproteínas e lectina; lipídeos como cermidamono-hexosida e vesículas extracelulares; e proteínas como Hsp 60, Hsp 70, antígenos M e H, YPS3, histona H2B e melanina (GUIMARAES et al., 2011). Estes componentes podem atuar como suporte conferindo rigidez ou flexibilidade a parede celular e protegendo o fungo contra fatores ambientais e do hospedeiro, ou ainda representar fatores de virulência, como os antígenos fúngicos. Baseada em sua composição, *H. capsulatum* foi classificado em quimiotipo 1 com elevado conteúdo de quitina, níveis raramente detectáveis de  $\alpha$ -1,3-glucana e alta concentração de proteínas e quimiotipo 2 que apresenta reduzida taxa de quitina e alta concentração de glicose como polímero  $\alpha$ -1,3-glucana (DOMER et al., 1967; 1971). Quatro fatores e cinco sorotipos (1,2; 1,4; 1,2,3; 1,2,4; 1,2,3,4) também foram demonstrados. Os fatores 1 e 4 são compartilhados com o *B. dermatitidis* e provavelmente estão associados a galactomanana, enquanto que os outros são específicos para o *H. capsulatum* (KAUFMAN; KAPLAN, 1961; KAUFMAN; BLUMER, 1966). Entretanto, até o presente a determinação de fenótipos de *H. capsulatum* característicos de cada região geográfica e sua importância em estudos taxonômicos e no diagnóstico da histoplasmose não tem sido demonstrada. Nossos resultados apontam para a existência de cepas-tipo do Estado do Rio de Janeiro. Entretanto, estudos posteriores em nível genético devem ser incluídos para a confirmação desta nossa proposição.

## 7 CONCLUSÕES

- ✓ As técnicas utilizadas para caracterização de fenotipos de *H. capsulatum* apresentaram boa acurácia;
- ✓ Corrobora-se a dificuldade no processo de conversão da fase micelial para leveduriforme, sendo cepa-dependente;
- ✓ É necessário meio de conversão específico, sendo o ML-GEMA o mais indicado para este tipo de análise;
- ✓ O teste dos exoantígenos para identificação de cepas apresentou bom rendimento somente quando empregada a técnica de *western-blot*, corroborando dados já apresentados na literatura;
- ✓ Os resultados encontrados no conjunto de métodos fenotípicos empregados neste estudo apontam que os mesmos podem ser utilizados para determinação de cepas-tipo;
- ✓ Foram caracterizadas neste estudo algumas cepas como tipo, representantes dos isolados de *H. capsulatum* do estado do Rio de Janeiro, porém estudos complementares avaliando a nível genético esses isolados devem ser realizados.

## REFERÊNCIAS

- Aidé MA. Capítulo 4 – Histoplasmosose. J. Bras. Pneumol . 2009; 35(11): 1145-1151.
- Alam ASE, Hasan Z, Khan MAI, Zulkifl MA, Samdani ATM, Islam MT, Roy KB. Chronic disseminated histoplasmosis in an immunocompetent man presented as bilateral adrenal masses with partial adrenocortical insufficiency-a rare condition. J. Bang. Col. Phys. Surg. 2012; 29(4), 235-240.
- Almeida F, Lacaz CS. Cogumelos do gênero *Histoplasma* isolados de lesões de cromomicose. Associação de fungos nas lesões. FoL. Clin. Biol. 1939; 9:65-69.
- Almeida L, Lacaz CS. Considerações em torno de duas amostras de *Histoplasma* isoladas de dermatite verrucosa e do escarro. An. Fac. Med. S. Paulo, 1941; 17: 561-575.
- Almeida-Paes R, Frases S, Monteiro PCF, Gutierrez-Galhardo MC, Zancopé-Oliveira RM, Nosanchuk JD. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. Micro. Infec. 2009; 11(5), 554-562.
- Almeida-Paes. R. Fatores de virulência e antígenos de *Sporothrix* spp. relacionados à endemia de esporotricose no estado do Rio de Janeiro. Tese de Doutorado em Biologia Celular e Molecular – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2012a.
- Almeida-Paes R, Frases S, Arauj, GS, Oliveira MM, Gerfen GJ, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Biosynthesis and functions of a melanoid pigment produced by species of the *Sporothrix* complex in presence of L-tyrosine. Appl. Environ. Microbiol. 2012b; 78(24): 8623-8630.
- Bayry J, Beaussart A, Dufrêne YF, Sharma M, Bansal K, Kniemeyer O, Beauvais A. Surface structure characterization of *Aspergillus fumigatus* conidia mutated in the melanin synthesis pathway and their human cellular immune response. Infec. Immun. 2014; 82(8), 3141-3153.
- Batanghari JW, Deep GS, Di Cera E, Goldman E. *Histoplasma* acquisition of calcium and expression of *CBP1* during intracellular parasitism. Mol. Microbiol. 1998; 27(3):531-539.
- Batista JJ, Camargo ZP, Fernandes AP, Fontes CJF, Hahn RC. Is the geographical origin of a *Paracoccidioides brasiliensis* isolate important for antigen production for regional diagnosis of paracoccidioidomycosis. Mycoses. 2009; 53: 176-80.
- Bava J, Troncoso A. Giemsa and Grocott in the recognition of *Histoplasma capsulatum* in blood smears. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 2013; 3(5): 418-420.
- Berliner MD. *Histoplasma capsulatum*: effects of pH on the yeast and mycelial phases in vitro. Sabouraudia. 1973a; 11(3):267-270.
- Berliner MD. *Histoplasma capsulatum*: vital staining for the differentiation of the albino and brown phenotypes in vitro. Sabouraudia. 1973b; 11(3):271-273.

- Bialek R, Feuchet A, Aepinus C, Just-Nubling G, Robertson VJ, Knobloch J, Hohle R. Evolution of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. *J. Clin Microbiol.* 2002; 40(5):1644-1647.
- Bracca A, Tosello ME, Girardini JE, Amigot SL, Gomez C, Serra E. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in human clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(4):1753-1755.
- Buitrago MJ, Canteros CL, De Leon GF, Gonzalez A, Oliveira MME, Muñoz CO, Ramirez JA, Toranzo AI, Zancopé-Oliveira RM, Estrela MC. Comparison of PCR protocols for detecting *Histoplasma capsulatum* DNA through a multicenter study. *Rev. Ibero Am. Micol.* 2013; 30(4): 256-260.
- Carreira A, Ferreira LM, Loureiro V. Brown pigments produced by *Yarrowia lipolytica* result from extracellular accumulation of homogentisic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67(8): 3463-3468.
- Casadevall A, Rosas AL, Nosanchuk JD. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr. Op. Microbiol.* 2000; 3(4): 354-358.
- Chick EW, Compton SB, Pass T, Mackey B, Hernandez C, Austin EJR. Hitchcock's birds, or the increased rate of exposure to *Histoplasma* from blackbird roost sites. *Chest.* 1981; 80(4):434-438.
- Christensen WB. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella*. *J Bacteriol.* 1946; 52(4):461-466.
- Cox GM, Mukherjee J, Cole GT, Casadevall A, Perfect JR. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infec. Immun.* 2000; 68(2): 443-448.
- Da Rocha-Lima H. Histoplasmosis und epizootische Lymphangitis. *Arch. F. Schiffs. U. TropeHyg.* 1912; 16: 79-85.
- Darling ST. A protozoön general infection producing pseudotubercles in the lung and focal necroses in the liver, spleen and lymphonodes. *J. Am. Med. Assoc.* 1906; 46(17): 1283-1285.
- Darling ST. The morphology of the parasite (*Histoplasma capsulatum*) and the lesions of histoplasmosis, a fatal disease of tropical america. *J. Exp. Med.* 1909; 11(4):515-531.
- Deep JR, George S. The immune response to *Histoplasma capsulatum*: unearthing its secrets. *The J. Labor. Clin. Med.* 1994; 123(2): 201.
- De Hoog GS, Guarro J, Figueras GMJ. Atlas of Clinical Fungi. Hypomycetes, dimorphic onygelanes: *Histoplasma*. *Cent. Schimme. Utrecht. The Netherlands.* 2000; 2: 709.
- DeMonbreau WA. The cultivation and cultural characteristics of darling's *Histoplasma capsulatum*. *Am. J. Trop. Med.* 1934; 14(2): 93-125.
- DiSalvo AF, Sekhon AS, Land GA, Fleming WH. Evaluation of the exoantigen test for identification of *Histoplasma* species and *Coccidioides immitis* cultures. *J. Clin. Microbiol.* 1980; 11(3): 238-241.

- Domer JE, Hamilton JG, Harkin JC. Comparative study of cell walls of the yeast-like and mycelial phases of *Histoplasma capsulatum*. J. Bacteriol. 1967; 94: 466-474.
- Domer JE. Monosaccharide and chitin content of cell walls of *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. J. Bacteriol. 1971; 107(3):870-877.
- Edwards MR, Harzen EL, Edwards GA. The micromorphology of the tuberclose spores of *Histoplasma capsulatum*. Canad. J. Microbiol. 1960; 6(1): 65-70.
- Edwards JA, Rappleye CA. *Histoplasma* mechanisms of pathogenesis-one portfolio doesn't fit all. FEMS Microbiol Lett. 2011; 324(1):1-9.
- Eissenberg LG, Goldman WE. *Histoplasma* variation and adaptive strategies for parasitism: new perspectives on histoplasmosis. Clin. Microbiol. Rev. 1991; 4(4):411-421.
- Eisenman HC, Casadevall A. Synthesis and assembly of fungal melanin. Appl. Microbiol. Biotech. 2012; 93(3): 931-940.
- Emmons CW. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil. Pub. Health Rep. 1949; 64:892-896.
- Emmons CW. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil in Washington, D.C. Pub. Health Rep. 1961; 76(7): 591-595.
- Escher M, Kainikkara TM, Grabner A, Ott G, Stange EF, Herrlinger KR. Histoplasmosis: uncommon opportunistic infection in a patient with HIV infection. Deut. Mediz. Woch. 2012; 137(6): 260-264.
- Farina C, Rizzi M, Ricci L, Gabbi E, Caligaris S et al., Imported and autochthonous histoplasmosis in Italy: new cases and old problems. Rev. Iberoam. Micol. 2005; 22(3):169-171.
- Ferreira MS, Borges AS. Histoplasmose. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2009; 42(2): 192-198.
- Figueiredo-Carvalho MHG, Santos FB, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM, Almeida-Paes R. 1-Dihydroxyphenylalanine induces melanin production by members of the genus *Trichosporon*. FEMS Yeast Res. 2014; 14(6), 988-991.
- Gomes BL, Figueroa JI, Hamilton AJ, Ortiz BL, Robledo MA, Restrepo A, Hay RJ. Development of novel antigen detection test for histoplasmosis. J. Clin. Microbiol. 1997; 35: 2618-2622.
- Gregory G, Linda R. Disseminated histoplasmosis complicating HIV infection. Blood. 2012; 120(26): 5101-5101.
- Guimaraes AJ, Pizzini CV, Guedes HLM, Albuquerque PC, Peralta JM, Hamilton AJ, Zancopé-Oliveira RM. ELISA for early diagnosis of histoplasmosis. J Med Microbiol. 2004; 53(6):509-514.
- Guimaraes AJ, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Diagnosis of Histoplasmosis. Brazilian J Microbiol. 2006; 37:1-13.
- Guimaraes AJ, Cerqueira MD, Nosanchuk JD. Surface architecture of *Histoplasma capsulatum*. Frontiers in Microbiol. 2011; 2 (155): 1-14.

- Hage CA, Ribes JA, Wengenack NL, Baddour LM, Assi M, McKinsey DS, Wheat LJ. A multicenter evaluation of tests for diagnosis of histoplasmosis. *Clinical Infectious Diseases*, 2011 53(5), 448-454.
- Hilbett DS, Binder M, Bischoff JF. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* 2007; 111:509-547
- Hoog, GS. Significance of fungal evolution for the understanding of their pathogenicity illustrated with agents of phaeohyphomycosis. *Mycoses*. 1997; 40(2):5-8.
- Hoogan LH, Klein BS, Levitz SM. Virulence factors of medically important fungi. *Clin. Microbiol. Rev.* 1996; 9(4): 469-488.
- Holbrook ED, Rappleye CA. *Histoplasma capsulatum* pathogenesis: making a lifestyle switch. *Curr. Op Microb.* 2008; 11(4): 318-324.
- Holbrook ED, Smolnycki KA, Youseff BH, Rappleye CA. Redundant catalases detoxify phagocyte reactive oxygen and facilitate *Histoplasma capsulatum* pathogenesis. *Infect Immun.* 2013; 81(7): 2334-2346.
- Holbrook ED, Kemski MM, Richer SM, Wheat LJ, Rappleye CA. Glycosylation and Immunoreactivity of the *Histoplasma capsulatum* Cfp4 Yeast-Phase Exoantigen. *Infection and immunity*, 2014 82(10), 4414-4425.
- Hwang LH, Mayfield JA, Rine J, Sil A. *Histoplasma* requires SID1, a member of an iron-regulated siderophore gene cluster for host colonization. *Plos Pathog.* 2008; 4:e1000044.
- Jain RM, Mody K, Mishra A, Jha B. Physicochemical characterization of biosurfactant and its potential to remove oil from soil and cotton cloth. *Carbohydrate polymers*, 2012 89(4), 1110-1116.
- Kane J, Fisher JB. The differentiation of *T. rubrum* and *T. mentagrophytes* by use of Christensen's urea broth. *Can J Microbiol.* 1971; 17:911-913.
- Karimi K, Wheat LJ, Connolly P, Cloud G, Hajjeh R, Wheat E, et al. Differences in histoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome in the United States and Brazil. *J Infect Dis.* 2002 Dec 1; 186(11):1655-1660
- Kasuga T, Taylor JW, White TJ. Phylogenetic relationship of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungal *Histoplasma capsulatum* Darling. *J Clin Microbiol.* 1999; 37:653-663.
- Kasuga T, White TJ, Koenig G, McEwen J, Restrepo A, Castañeda E, Lacaz CS, Heins-Vaccari EM, Freitas RS, Zancopé-Oliveira RM, Qin Z, Negroni R, Carter DA, Mikami Y, Tamura M, Taylor ML, Miller GF, Poonwan N, Taylor JW. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol Ecol.* 2003; 12(12):.3383.
- Kathuria S, Sing, PK, Meis JF, Chowdhary A. In Vitro Antifungal Susceptibility Profile and Correlation of Mycelial and Yeast Forms of Molecularly Characterized *Histoplasma capsulatum* Strains from India. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2014 58(9), 5613-5616.
- Kauffman L, Kaplan W. Preparations of a fluorescent antibody specific for the yeast phase of *Histoplasma capsulatum*. *J. Bacteriol.* 1961; 82: 729-735.

- Kauffman L, Blumer S. Occurrence of serotypes among *Histoplasma capsulatum* strains. J Bacteriol. 1966; 91(4):1434-1439.
- Kauffman CA, Freifeld AG, Andes DR, Baddley JW, Herwaldt L, Walker RC, Pappas PG. Endemic fungal infections in solid organ and hematopoietic cell transplant recipients enrolled in the Transplant Associated Infection Surveillance Network. Transp. Infect. Dis. 2014; 16(2): 213-224.
- Klein BS, Tebbets B. Dimorphism and virulence fungi. Curr. Op Microbiol. 2007; 10(4): 314-319.
- Koepsell SA, Hinrichs SH, Iwen PC. Applying a real-time PCR assay for *Histoplasma capsulatum* to clinically relevant formalin-fixed paraffin-embedded human tissue. J Clin Microbiol. 2012; 50:3395-3397.
- Kwong-Chung KJ, Weeks RJ, LARSH HW. Studies on *Emmonsia capsulata* (*Histoplasma capsulatum*). II. Distribution of the two mating types in 13 endemic states of the United States. Am. J. Epidemiol. 1974; 99: 44-49.
- Kwong-Chung KJ, Bennett JE. Histoplasmosis. In: Medical Mycology. 3era ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1992; pp. 464-513.
- Lacaz CDS, Porto E, Heins-Vaccari E, Melo NTD. Guia de identificação de fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. Sarvier. 1998.
- La Hoz R, Loyd JE, Wheat LJ, Baddley JW. How I treat histoplasmosis. Current Fungal Infection Reports, 2013 7(1), 36-43.
- Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G, Brakhage AA. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. Fungal Genetics and Biology, 2003 38(2), 143-158.
- Lázár-Molnár E, Gacser A, Freeman GJ, Almo SC, Natherson SG, Nosanchuck JD. PD-1/PD-L costimulatory pathway critically affects host resistance to the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. Proc Nat Ac Sci United States of America. 2008; 105(7): 2658-2663.
- Leimann BCQ, Pizzini CV, Muniz MM, Albuquerque PC, Monteiro PC, Reis RS, Almeida-Paes R, Lazera MS, Wanke B, Perez MA, Zancopé-Oliveira RM. Histoplasmosis in a Brazilian center: clinical forms and laboratory tests. Rev Iberoam Micol. 2005; 22(3):141-146.
- Lindsley MD. The future of fungal serology. Curr Fung Infec Rep. 2013; 7(3): 161-170.
- Liu D, Wei L, Guo T, Tan W. Detection of DOPA-melanin in the dimorphic fungal pathogen *Penicillium marneffe* and its effect on macrophage phagocytosis in vitro. PloS one, 2014; 9(3), e92610.
- Maresca B, Kobayashi, GS. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum* e *Blastomyces dermatitidis*. Contrib Microbiol. 2000; 5: 201–216.
- McNeeley MF, Chung JH, Bhalla S, Godwin JD. Imaging of granulomatous fibrosing mediastinitis. American Journal of Roentgenology, 2012; 199(2), 319-327.

- Medoff G, Sacco M, Maresca B, Schlessinger D, Painter A, Kobayashi GS, Carratu L. Irreversible block of the mycelial -to-yeast phase transition of *Histoplasma capsulatum*. Science, 1986; 231(4737): 476-479.
- Mihu MR, Nosanchuck JD. *Histoplasma* virulence and host responses. Int. J. Microbiol. 2012; 2012: 1-5.
- Mirbod-Donovan F, Schaller R, Hung CY, Xue J, Reichard U, Cole GT. Urease produced by *Coccidioides posadasii* contributes to the virulence of this respiratory pathogen. Infec Immun. 2006; 74(1): 504-515.
- Morris ZQ, Gardner JR. Chronic Pulmonary Histoplasmosis With A Normal Chest Radiograph: A Case Report. Am J Respir Crit Care Med, 2012; 185, A6108.
- Mota IL, Queiroz RS. Distúrbios do equilíbrio ácido básico e gasometria arterial: uma revisão crítica. 2010.
- Muniz MM, Pizzini CV, Peralta JM, Reiss E, Zancopé-Oliveira RM. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains isolated from soil, animals, and clinical specimens in Rio de Janeiro State, Brazil, by a PCR-based random amplified polymorphic DNA assay. J Clin Microbiol. 2001; 39(12): 4487-4494.
- Muniz MM, Tavares PMS, Meyer W, Nosanchuck JD, Zancopé-Oliveira RM. Comparison of Different DNA-Based Methods for Molecular Typing of *Histoplasma capsulatum*. App Environ Microbiol. 2010; 76:4438-4447.
- Muniz MM, Souza CN, Oliveira MME, Pizzini CV, Almeida MA, Rodriguez-Arellanes G, Zancopé-Oliveira RM. Sexual variability in *Histoplasma capsulatum* and its possible distribution: What is going on? Rev Iberoam Micol. 2014; 31(1): 7-10.
- Muñoz C, Gomez BL, Tobon A, Arango K, Restrepo A, Correa MM, Muskus C, Cano LE, Gonzalez A. Validation and Clinical Application of a Molecular Method for Identification of *Histoplasma capsulatum* in Human Specimens in Colombia, South America. Clin. and Vaccine Immunol. 2010; 17(1): 62-67.
- Muñoz-Cadavid C, Rudd S, Zaki SR, Patel M, Moser SA, Brandt ME, Gomez BL. Improving Molecular Detection of Fungal DNA in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues: Comparison of Five Tissue DNA Extraction Methods Using Panfungal PCR. J.Clin. Microbiol. 2010; 48(6): 2147-2153.
- Negróni, R. Histoplasmosis. In: FOCACCIA, R. (Ed.). Tratado de Infectología Veronesi. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 1415-1426.
- Nemecek JC, Wuthrich M, Klein BS. Global control of dimorphism and virulence in fungi. Science. 2006, 28; 312(5773):583-588.
- Nosanchuck JD, Gomez BL, Youngchim D, Diez S, Aisen P, Zancopé-Oliveira RM, Restrepo A, Casadevall AJ. *Histoplasma capsulatum* synthesizes melanin-like pigments in vitro and during mammalian infection. Infect. Immun. 2002; 70:5124-5131.
- Ouchterlony O. Antigen-antibody reactins in gels. Acta Path Microb Scand. 1953; 32(2): 231-240.

- Pagano MC, Dhar PP. Fungal pigments: An overview. *Fungal Biomolecules: Sources. Applic Rec Develop.* 2015; 1(13): 173-181.
- Padhye AA, Smith G, McLaughlin D, Standard PG, Kaufman L. Comparative evaluation of a chemiluminescent DNA probe and an exoantigen test for rapid identification of *Histoplasma capsulatum*. *J Clin Microbiol.* 1992; 30(12): 3108-3111.
- Paula AVD & Aide MA. As microepidemias de histoplasmose do Estado do Rio Janeiro; The microepidemics of histoplasmosis in the state of Rio de Janeiro. *J. bras. Med,* 1985;49(1), 18-26.
- Pal AK, Gajjar DU, Vasavada AR. DOPA and DHN pathway orchestrate melanin synthesis in *Aspergillus* species. *Medical mycology,* 2014; 52(1), 10-18.
- Pizzini CV, Zancopé-Oliveira RM, Reiss E, Hajjeh R, Kauffman L, Peralta JM. Evaluation of a *western blot* test in an outbreak of acute pulmonary histoplasmosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999; 6(1):20-23.
- Pine L. Morphological and physiological characteristic of *Histoplasma capsulatum*: In: Sweany HD. *Histoplasmosis.* Springfield, Charles C. Thomas, 1960; 1: 40-75.
- Prado M, Silva MB, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CS. Mortality due to systemic mycoses of a priary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104(3): 513-521.
- Rappleye CA, Engle JT, Goldman WE. RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrate a role for alpha-(1,3)-glucan in virulence. *Mol. Microbiol.* 2004; 53:153-165.
- Rappleye CA, Eissenberg LG, Goldman WE. *Histoplasma capsulatum* alpha-(1,3)-glucan blocks innate immune response by the beta-glucan receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007; 104:1366-1370.
- Rappleye CA. Molecular mechanisms of *Histoplasma* pathogenesis. In: *Human Fungal Pahtogens.* Springer. 2014; 1: 129-140.
- Reiss E. *Molecular Immunology of Mycotic and Actinomycotic Infections.* Elsevier, New York. 1986; 77-97.
- Reiss E, Obayash T, Orle K, Yoshida M, Zancopé-Oliveira RM. Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections. *Med Mycol.* 2000; 38(s1): 147-159.
- Rodrigues CC. Avaliação da infecção por *Histoplasma capsulatum* por meio de reações intradérmicas em moradores da zona urbana e rural do Município de Pratânia (SP). Tese de Doutorado em Doenças Infeciosas. 171p. Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP, Botucatu, SP, 2004
- San-Blas G, San-Blas F. Molecular aspects of fungal dimorphism. *Crit Rev Microbiol.* 1984; 11: 101–127.
- Scheel CM, Samayoa B, Herrera A, Lindsley MD, Benjamin L, Hart J, Lima S, Rivera BE, Raxcaco G, Chiller T, Arathoon E. Development and evaluation of an enzyme-linked mmunosorbent assay to detect *Histoplasma capsulatum* antigenuria in immunocompromised patients. *Clin. Vaccine Immunol.* 2009, 6(6):852-8.

- Scheel CM, Zhou Y, Theodoro RC, Abrams B, Balajee SA, Litvintseva AP. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for detection of a *Histoplasma capsulatum* DNA in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2014; 52(2): 483-488.
- Schmalzer-Ripcke J, Sugareva V, Gebhard P, Winkler R, Kniemeyer O, Heinekamp T, Brakhage AA. Production of pyomelanin, a second type of melanin, via the tyrosine degradation pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Applied and environmental microbiology*, 2009 75(2), 493-503.
- Sharmin S, Ohori A, Sano A, Kamei K, Yamaguchi M, Takeo K, Miyaj, M. *Histoplasma capsulatum* variety *duboisii* isolated in Japan from an HIV-infected Ugandan patient. *Japan J Med Mycol.* 2003; 44(4): 299-306.
- Sebghati TS, Engle TJ, Goldman WE. Intracellular parasitism by *Histoplasma capsulatum*: fungal virulence and calcium dependence. *Science* 2000; 290:1368-1372.
- Secor J. Inhibition of barnyardgrass 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by sulcotriene. *Plant Physiol.* 1994; 106(4): 1429-1433.
- Selim SA, Soliman R, Osmar K, Padhye AA, Ajello L. Studies of histoplasmosis farciminosi (epizootic lymphangitis) in Egypt. *Eur J Epidemiol.* 1985; 1(2): 84-89.
- Shahani L. Disseminated *Histoplasma* and CMV infection presenting as subacute intestinal obstruction in an immunocompromised patient. *BMJ case reports*, 2012, bcr0820114732.
- Sierra JEO, Torres JMO. New clinical and histological patterns of acute disseminated histoplasmosis in human immunodeficiency virus-positive patients with acquired immunodeficiency syndrome. *The American Journal of Dermatopathology*, 2013 35(2), 205-212.
- Singh N, Pizanis C, Davis J. A difficult diagnosis: acute histoplasmosis. *Clinical kidney journal*, 2012 5(3), 244-246.
- Standard PG, Kauffman L. Specific immunological test for the rapid identification of members of the genus *Histoplasma*. *J Clin Microbiol.* 1976; 3(2): 191-199.
- Taylor ML, Miller GF, Poonwan N, Taylor JW. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol Ecol.* 2003; 12(12): 3383-3401.
- Tewari RP, Berkhout FJ. Comparative pathogenicity of albino and *brown* types of *Histoplasma capsulatum* for mice. *Journal of Infectious Diseases*, 1972. 125(5), 504-508.
- Toranzo AL, Tiraboschi IN, Fernandez N, Ibarra-Camou B, Rivas MC, Lee W, Canteros CE. Diagnóstico molecular de histoplasmosis humana em muestras de sangre entera. *Rev Arg Microbiol.* 2009; 41(1): 20-26.
- Unis G, Oliveira FM, Severo LC. Histoplasmosis disseminada no Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2004; 37(6):463-468.
- Van de Sande WW, de Kat J, Coppens J, Ahmed AO, Fahal A, Verbrugh H, van Belkum A. Melanin biosynthesis in *Madurella mycetomatis* and its effect on susceptibility to itraconazole and ketoconazole. *Microbes and Infection.* 2007; 9(9): 1114-1123.

- Van Duin D, Casadevall A, Nosanchuk JD. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2002 46(11), 3394-3400.
- Vasanthakumar A, DeAraujo A, Mazurek J Schilling M, Mitchell R. Pyomelanin production in *Penicillium chrysogenum* is stimulated by L-Tyrosine. *Microbiology*, 2015; mic-0.
- Vidal MSC, Del Negro GMB, Vicentini AP, Svidzinski TIE, Mendes-Giannini MJS, Almeida AMF, Martinez R, Camargo ZP, Tabora CP, Bernard G. Serological diagnosis of paracoccidioidomycosis: high rate of inter-laboratorial variability among medical mycology reference centers. *Plos Negl Trop Dis*. 2014; 8: e3174. *cimens. N Engl J Med*. 1986, 314(2):83-88.
- Wheat J, French ML, Kohler RB, Zimmerman SE, Smith WR, Norton JA, Slama TG. The diagnostic laboratory tests for histoplasmosis: analysis of experience in large urban outbreak. *An Int Med*. 1982; 97(5): 680- 685.
- Wheat J, Garringer T, Brizendine E, Connoly P. Diagnosis of histoplasmosis by antigen detection based upon experience at the histoplasmosis reference laboratory. *Diag Microbiol Infec Dis*. 2002; 43: 29-37.
- Wheat J, Freifeld AG, Kleiman MB, Baddley JW, McKinsey DS, Loyd JE et al. Clinical practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis: 2007 update by the infections diseases society of america. *Clin Infec Dis*. 2007; 45: 807-825.
- Wheeler MH, Stpanovic RD. Melanin biosynthesis and the metabolism of flaviolin and 2-hydroxijuglone in *Wangiella dermatitidis*. *Arch Microbiol*. 1985; 142(3): 234-241.
- Woo PC, Tam EW, Chong KT, Cai JJ, Tung ET, Ngan AH, Yuen KY. High diversity of polyketide synthase genes and the melanin biosynthesis gene cluster in *Penicillium marneffeii*. *FEBS journal*, 2010; 277(18), 3750-3758.
- Woods JP. *Histoplasma capsulatum*: Molecular genetics, pathogenesis and responsiveness to environment. *Fungal Gen Biol*. 2002; 35:.81-97.
- Zancopé-Oliveira RM, Tavares PMS, Muniz MM. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains in Brazil. *FEMS Immun Med Microbiol*. 2005b; 45: 43-449.
- Zancopé-Oliveira RM, Guimaraes AJ, Nosanchuk JD, Muniz MM, Albuquerque PC, Almeida-Paes R. Histoplasmosis . In: Liu D. *Molecular Detection of Human Fungal Pathogens*. 1ed. Boca Raton FL. CRC Press. 2011: 1: 263-274.
- Zancopé-Oliveira RM, Muniz MM, Wanke B. Histoplasmosis. In: COURA JR. *Dinâmica da doenças infecciosas e parasitárias*. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2013; 1: 1238-1249.

**ANEXO A – Resultados obtidos nas análises fenotípicas de isolados de *H. capsulatum* incluídos no estudo, com exceção do crescimento em pH ácido e básico**

Isolado	Fase filamentosa		Conídios		Fenótipos		Produção de urease			Eumelanina/DHN			Piomelanina			Conversão %		Exoantígenos	
	Cor	Aspecto	Macro	Micro	Albino	Brown	Fraca	Média	Forte	B!	B#	B\$	Fraca	Média	Forte	M a L	ID	Western-blot	
Ipec 22/11	Bege	Glabro	P*	P		X			X			X			X	100	-	+ (M)	
Ipec 24/11	Bege	Glabro	P	P		X			X		X			X		100	-	+ (M)	
Ipec 25/11	Bege	Glabro	P	P		X			X		X			X		100	-	+ (M)	
Ipec 27/11	Bege	Glabro	P	P		X			X		X		X			100	-	+ (M)	
Ipec 01/12	Bege	Glabro	P	P		X			X		X				X	100	-	+ (M)	
Ipec 04/12	Branco	Cotonoso	P	P		X		X		X			X			100	-	+ (M)	
Ipec 05/12	Bege	Glabro	P	P		X			X		X			X		75	-	+ (M)	
Ipec 06/12	Bege	Glabro	P	P		X			X	X			X			75	-	+ (M)	
Ipec 07/12	Bege	Glabro	P	P		X			X		X		X			75	-	+ (M)	
Ipec 09/12	Bege	Glabro	P	P		X		X			X		X			75	-	-	
Ipec 11/12	Branco	Glabro	P	P		X		X		X			X			100	-	+ (M)	
20231	Bege	Glabro	P	P		X		X			X		X			100	-	-	
38874	Branco	Cotonoso	A**	P	X				X		X		X			100	-	+ (M)	
39130	Branco	Cotonoso	A	P		X		X		X			X			50	-	+ (M)	
39439	Branco	Glabro	P	P		X	X				X		X			75	-	+ (H/M)	
42247	Bege	Glabro	P	P		X		X			X			X		75	-	+ (M)	
44938	Bege	Glabro	P	P		X		X			X				X	100	-	+ (H/M)	
46028	Marrom	Glabro	P	P		X			X			X		X		100	-	+ (H/M)	
46176	Marrom	Glabro	P	P		X		X				X	X			100	+	+ (H/M)	
46693	Marrom	Glabro	P	P		X			X			X	X			50	-	+ (H/M)	
36 gal	Marrom	Glabro	P	P		X			X			X		X		75	-	+ (H/M)	
RS 36	Bege	Cotonoso	A	P		X			X	X			X			100	-	+ (M)	
RPS 35	Bege	Cotonoso	P	P		X		X		X			X			100	-	+ (M)	
RPS 86	Bege	Cotonoso	A	P		X	X			X			X			25	-	+ (M)	
EP02	Bege	Cotonoso	P	P		X		X		X			X			100	-	+ (M)	
TI01	Bege	Cotonoso	P	P	X			X		X			X			75	-	+ (M)	
TI05	Bege	Cotonoso	A	P		X		X		X			X			75	-	+ (M)	
IT04	Bege	Cotonoso	P	P		X			X	X			X			100	-	+ (M)	
IGS 4/5	Bege	Cotonoso	P	P		X		X		X				X		100	-	+ (M)	
CO4	Bege	Cotonoso	P	P		X		X		X				X		100	-	+ (M)	

**P\*** Presente, **A\*\*** Ausente **B!** Colônias brancas sem pigmento no reverso, **B#** Colônias brancas com pigmento no reverso, **B\$** Colônias bege com pigmento no reverso **H:** Antígeno H, **M:** Antígeno M

**Urease:** DO 0,160 (mín) - 1,102 (máx) Considerados intervalos de 0,314 (3 pontos): **Fraco produtor:** 0,160 - 0,474 **Médio produtor:** 0,475 - 0,788 **Forte produtor:** 0,789 - 1,102

**Piomelanina:** DO 0,201 (mín) - 3,164 (máx) Considerados intervalos de 0,704 (4 pontos): **Fraco produtor:** 0,201 - 0,943 **Médio produtor:** 0,944 - 1,68 **Forte produtor:** 1,684 - 2,42 / 2,424 – 3,164