

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA BÁSICA
CURSO DE MESTRADO EM
MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA**

VARIABILIDADE GENÉTICA EM *Histoplasma capsulatum*

**CURITIBA
2005**

ELAINE CRISTINA MARTINS IMANO

VARIABILIDADE GENÉTICA EM *Histoplasma capsulatum*

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Universidade Federal do Paraná, para obtenção do título de Mestre, Área de Concentração: Microbiologia.

Orientador: Prof^a Dra. Vânia Aparecida Vicente

Co-orientador: Prof^o Dr. Zoilo Pires de Camargo

**CURITIBA
2005**

Dedico este Trabalho

Ao meu querido esposo Marcelo, o melhor amigo, pai e profissional que já tive a felicidade de conhecer...Pelo amor, companheirismo e apoio constante e por compartilhar cada momento, desde os mais felizes aos mais difíceis...

Aos meus filhos, Marcelo Hideki e Helena Yaiço, que procuraram compreender, superar e participar das tantas etapas percorridas, com paciência e alegria, mesmo nos momentos de ausência...

Aos meus pais, Elair e Sidneid, pelo apoio incondicional, compreensão e doação e por terem possibilitado cada momento de tranquilidade...no decorrer e conclusão desse período.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus por toda força, apoio e por estar sempre ao meu lado. Por ser tão bom comigo e com todos que eu amo.... Por ter traçado para mim um caminho com tanta luz, sorte, amor, oportunidades... e, principalmente, por ter me dado amigos verdadeiros e tão especiais.....
- À minha querida amiga Professora Dra. Vânia Aparecida Vicente, pela constante orientação, competência, paciência, companheirismo, por cada um de seus ensinamentos brilhantes, por todo esse período de convivência e, principalmente, por ter acreditado em mim e abraçado meu ingresso no Programa num momento em que tudo indicava que não conseguiria concretizar este grande sonho.... Agradeço por cada momento, desde o mais difícil ao mais descontraído, e por nunca ter me abandonado durante esta caminhada. Aqui, demonstro toda minha gratidão, admiração e sincero afeto por ti.
- Ao Professor Dr. Zoilo Pires de Camargo, pela co-orientação, contribuindo também com o fornecimento de linhagens de *H. capsulatum*.
- À Professora Rosângela Lameira Pinheiro, por toda amizade, apoio, ensinamentos, auxílio e valiosa colaboração durante meus trabalhos no laboratório de Micologia do Hospital de Clínicas.
- Ao Professor Dr. Flávio Queiroz Telles, por suas colocações brilhantes, sugestões e colaboração no decorrer deste trabalho e com o fornecimento de isolados de fungos.
- À Professora Dra. Vanete Tomaz Soccol por toda a sua importância e competência. Por ter confiado em mim quando tudo mostrava que não seria capaz de concluir esta etapa tão importante. Agradeço, ainda, por ter me acolhido, de braços abertos, em seu laboratório, período de fundamental para conclusão deste trabalho.
- À Professora Dra. Chirlei Glienke de Blanco, por toda sua competência, amizade, apoio, sugestões e todos os ensinamentos indispensáveis.

- Ao Professor Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza por ser tão querido e admirável e por estar sempre de braços abertos para ajudar. Agradeço por todo apoio na realização dos meus RAPDs e seqüenciamento, foco principal da minha dissertação.
- Ao Corpo docente do Curso de Pós Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pelo estímulo constante na busca pelo aperfeiçoamento e por todas as palavras e ensinamentos.
- À professora Dra. Yanê Carvalho, por cada momento que esteve ao meu lado, pela amizade, pelo incentivo constante, por toda ajuda no desenvolvimento da parte experimental e manuscrito deste trabalho.
- A pesquisadora Juliana Vitória Bittencour, Professor Dr. Higa e demais amigos do LAMEF por toda ajuda e companheirismo que muito contribuíram para o andamento desta pesquisa.
- Ao Professor Dr. Walter A. Boeger, que, mesmo sem muito mais tempo, procurou me ajudar e iluminar meu trabalho com todas as suas sugestões e conhecimentos admiráveis, na fase final dessa redação.
- À Universidade Federal do Paraná, ao Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, ao Departamento de Patologia Básica, Genética e Bioquímica, pela oportunidade, pela acolhida nos laboratórios e empréstimo de equipamentos, que muito contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa.
- Ao CNPq, a CAPES e a FUNPAR pelo apoio financeiro e compra de material de laboratório.
- A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 O FUNGO <i>Histoplasma capsulatum</i>	4
3.1.1 Epidemiologia e Importância Clínica.....	9
3.1.2 Isolamento e Diagnóstico de <i>Histoplasma capsulatum</i> Por Meio de Técnicas Convencionais.....	16
3.2 VARIABILIDADE GENÉTICA EM <i>H. capsulatum</i>	18
3.2.1 PCR/RAPD - <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>	24
3.2.2 PCR/Seqüências ITS - <i>Internal Transcribed Spacer</i>	39
3.2.3 Análise da Variabilidade Genética	42
4 MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	42
4.2 MEIOS DE CULTURA	44
4.2.1 Meio Batata-Glicose-Ágar (BDA).....	44
4.2.2 Meio Ágar-BHI (RIBEIRO SOARES, 2002)	44
4.2.3 Meio Ágar-Fubá.....	46
4.2.4 Meio Ágar Sabouraud – pH: 7,0	45
4.2.5 Meio Ágar Sabouraud com Ciclohexamida e Cloranfenicol (<i>Mycose!</i> ®)	45

4.2.6	Meio ML-Gema	45
4.3	SOLUÇÕES E REAGENTES	46
4.3.1	Corante Azul de Algodão (CRUZ, 1981).....	46
4.3.2	dNTP	46
4.3.3.	EDTA 0,5M	46
4.3.4	Gel de Agarose (0,8%)	47
4.3.5	Gel de Agarose (1,6%)	47
4.3.6	Iniciadores – <i>Primers</i>	47
4.3.7	Solução de Brometo de Etídio (SAMBROOK, FRITSCH, MANIATIS; 1989)	47
4.3.8	Solução de L-cisteína a 1%	47
4.3.9	Solução EDTA + 1% N-Laurilsarcosinato de Sódio (NaEDTA).....	48
4.3.10	Solução Salina 0,85% (p/v)	48
4.3.11	Tampão da Amostra	48
4.3.12	Tampão CTAB.....	48
4.3.13	Tampão de corrida para gel de agarose (TEB 10 x) - pH 8,0.....	48
4.3.14	Tampão de Extração de DNA (RAEDER & BRODA, 1985).....	48
4.3.15	Tampão Tris-EDTA (TE).....	49
4.4	PREPARO DO MATERIAL - ESTERILIZAÇÃO.....	49
4.5	IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS	49
4.6	CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA	50
4.6.1	Extração de DNA Total	50
4.6.2	Quantificação do DNA Total	50
4.6.3	RAPD	51
4.6.3.1	Amplificação do DNA/RAPD.....	51
4.6.3.2	Análise de polimorfismo obtido por RAPD.....	51
4.6.4	Seqüenciamento da Região ITS1-5,8S -ITS2 do DNAr.....	52

4.6.4.1	PCR – Ribotipagem (Reação para Obtenção do Amplicon).....	52
4.6.4.2	Reação de seqüenciamento	53
4.6.4.3	Precipitação e seqüenciamento do DNA	53
4.6.4.4	Alinhamento das seqüências e construção da árvore filogenética	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1	CULTIVO DOS ISOLADOS DE <i>H. capsulatum</i> E TESTE DE REVERSIBILIDADE.....	56
5.2	ANÁLISE MOLECULAR DE ISOLADOS MORFOLOGICAMENTE IDENTIFICADOS COMO <i>H. capsulatum</i>	62
5.2.1	Análise por Meio de Marcadores RAPD	62
5.2.2	Análise das Seqüências das Regiões ITS1-5.8S-ITS2 do DNA Ribossomal.....	72
5.2.2.1	PCR-gene específico e sequenciamento.....	73
6	CONCLUSÕES	80
	BIBLIOGRAFIA	81
	ANEXOS	98
	ANEXO I - Seqüências nucleotídicas obtidas no <i>Genbank</i> .	
	ANEXO II - Alinhamento das regiões ITS-5.8S-ITS do DNA ribossômico dos isolados de <i>H. capsulatum</i> . Programa de alinhamento utilizado “Clustal S 1.8” (THOMPSON et al., 1997).	
	ANEXO III - Alinhamento das regiões ITS-5.8S-ITS do DNA ribossômico dos isolados de <i>H. capsulatum</i> e seqüências pré-existent no bando de dados (<i>GenBank</i>). Programa de alinhamento utilizado “Clustal S 1.8” (THOMPSON et al., 1997).	
	ANEXO IV - Artigo: “Variabilidade genética em <i>Histoplasma capsulatum</i> do Brasil”.	

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	MACROMORFOLOGIA DE ISOLADO DE <i>H. capsulatum</i>	6
FIGURA 2 -	MICROMORFOLOGIA DE <i>H. capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>	7
FIGURA 3 -	DIFERENTES ETAPAS DO DESENVOLVIMENTO DO MACROCONÍDIO DE <i>H. capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i> a 25°C	8
FIGURA 4 -	EXAMES LABORATORIAIS UTILIZADOS PARA O DIAGNÓSTICO DA HISTOPLASMOSE.....	17
FIGURA 5 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS SÍTIOS ESPECÍFICOS DE LIGAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> ITS1, ITS2, V9D E LS266 E SUAS LOCALIZAÇÕES DENTRO DO DNAr.....	54
FIGURA 6 -	MACROSCOPIA DO ISOLADO DE <i>H. capsulatum</i> E LINHAGEM REFERÊNCIA DE <i>H. capsulatum</i> var. <i>duboisii</i>	56
FIGURA 7 -	DIFERENTES PADRÕES DE DESENVOLVIMENTO ENCONTRADOS ENTRE ISOLADOS DE <i>H. capsulatum</i> , QUANDO CULTIVADOS SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA	58
FIGURA 8 -	MICROMORFOLOGIA DO ISOLADO 4 COM CONIDIOGÊNESE CARACTERÍSTICA DE <i>H. capsulatum</i>	59
FIGURA 9 -	MACROMORFOLOGIA E MICROMORFOLOGIA DO ISOLADO 12 APÓS SETE DIAS DE CULTIVO, A 25°C e 37°C	62
FIGURA 10 -	PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DE RAPD OBTIDO DE <i>H. capsulatum</i> e <i>Exophiala jeanselmei</i> UTILIZANDO O <i>PRIMER</i> OPX17	63
FIGURA 11 -	DENDROGRAMA OBTIDO A PARTIR DA ANÁLISE DE UPGMA EM MARCADORES RAPD EM ISOLADOS DE <i>H. capsulatum</i> (TABELAS 1 E 2)	66
FIGURA 12 -	DENDROGRAMA OBTIDO A PARTIR DA ANÁLISE DE UPGMA EM MARCADORES RAPD DAS LINHAGENS DAS TABELAS 1 E 2 EXCETO OS ISOLADOS 12, 23, 29, 36	67
FIGURA 13 -	ÁRVORE ENRAIZADA CONSENSO OBTIDA A PARTIR DA ANÁLISE DE MÁXIMA PARCIMÔNIA EM MARCADORES RAPD EM ISOLADOS DE <i>H. capsulatum</i> (TABELAS 1 E 2) UTILIZANDO OS <i>PRIMERS</i> OPX 11, 14, 17 E OPA 10, 13, 16.....	70
FIGURA 14 -	PERFIL ELETROFORÉTICO DA REAÇÃO DE PCR UTILIZANDO OS <i>PRIMERS</i> ITS1 E ITS4	74
FIGURA 15 -	ÁRVORE FILOGENÉTICA ENRAIZADA OBTIDA A PARTIR DO SEQUENCIAMENTO DE REGIÕES ITS – ANÁLISE DE MÁXIMA PARCIMÔNIA.....	78
FIGURA 16 -	ÁRVORE FILOGENÉTICA ENRAIZADA, NÃO ULTRAMÉTRICA, OBTIDA A PARTIR DO SEQUENCIAMENTO DE REGIÕES ITS – ANÁLISE BAYSEANA.....	79

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - NOMENCLATURA, ORIGEM E PROCEDÊNCIA DAS LINHAGENS-REFERÊNCIA.....	42
TABELA 2 - CÓDIGO, QUADRO CLÍNICO, MATERIAL UTILIZADO PARA O ISOLAMENTO E PROCEDÊNCIA DOS ISOLADOS DE <i>H. capsulatum</i>	42
TABELA 3 - SEQÜÊNCIA DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NO RAPD (Invitrogen®).....	51
TABELA 4 - SEQÜÊNCIAS E POSIÇÕES ESPECÍFICAS DOS <i>PRIMERS</i> PARA A AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS1-5.8S-ITS2 DO DNAr.....	53
TABELA 5 - ISOLADOS QUE REALIZARAM CONIDIOGÊNESE A 25°C E REVERTERAM A 37°C	57
TABELA 6 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS MARCADORES RAPD (WEIR & COCKERHAM, 1984)	68
TABELA 7 - DIFERENÇA MÉDIA OBSERVADA DENTRO E ENTRE OS DOIS GRUPOS OBTIDOS COM MARCADORES RAPD COM A EXCLUSÃO DOS ISOLADOS 12, 23, 29, 36 e 37 (WEIR & COCKERHAM, 1984).....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

- AFLP: *Amplified fragment length polymorphism*
- CTAB: Brometo de cetiltrimetilamônio
- DNA: Ácido desoxirribonucléico
- dNTP: Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
- EDTA: Ácido etileno diamono tetracético
- HE: *Hematoxilina-Eosina*
- ITS: *Internal Transcribed Spacer*
- kb: Quilo base (1000 pares de bases)
- kDa: Quilo Dalton
- MO: Microscópio ótico
- MEV: Microscópio eletrônico de vareduorra
- PAS: *Periodic Acid-Schiff*
- pb: Pares de bases
- PCR: *Polymerase Chain Reaction*
- RAPD: *Random Amplified Polymorphic DNA*
- rDNA: DNA ribossomal
- RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*
- RNA: Ácido ribonucleico
- RNase: Ribonuclease
- rpm: Rotações por minuto
- Tris: Tris-(hidroximetil)-aminometano
- μm : micrômetro
- var.: variedade

RESUMO

A histoplasmose é uma infecção fúngica de caráter oportunista, com evolução aguda ou crônica capaz de acometer aves, homem e outros mamíferos e seu agente etiológico é o *Histoplasma capsulatum*. Métodos de identificação de isolados de *H. capsulatum* utilizando características morfológicas e teste de reversibilidade são influenciados diretamente pelo tempo e técnicas de cultivo o que pode dificultar a identificação precisa do agente. Dentro deste contexto este trabalho objetivou a caracterização de isolados clínicos de *H. capsulatum* por meio de técnicas moleculares, utilizando marcadores RAPD e seqüenciamento de regiões ITS do DNAr visando à elucidação taxonômica, estudo da variabilidade genética e um melhor entendimento da relação de isolados *H. capsulatum*, de diferentes procedências, com seus hospedeiros. Foram avaliados 34 isolados de *H. capsulatum* oriundos de pacientes de três estados brasileiros e linhagens referências de *H. capsulatum* var. *capsulatum*, de *H. capsulatum* var. *duboisii* e de *Exophiala jeanselmei* como grupo externo, totalizando 37 amostras. Marcadores RAPD e seqüências ITS utilizados mostraram resultados congruentes, revelando polimorfismo entre os isolados e relação quanto à procedência. Isolados primários com dificuldade de reversão foram distribuídos nos diferentes grupos formados por RAPD e, a partir do seqüenciamento de regiões ITS verificou-se a ocorrência de similaridade genética entre isolados procedentes do Brasil e linhagens de *H. capsulatum* var. *farciminosum*.

Palavras chaves: *Histoplasma capsulatum*, variabilidade genética, RAPD, seqüências ITS.

ABSTRACT

Histoplasmosis is an opportunistic fungal infection characterized by acute or chronic evolution that is capable of affecting birds, humans and other mammals whose etiological agent is *Histoplasma capsulatum*. Methods for the identification of isolates of *H. capsulatum* using morphological characteristics and reversibility tests are directly influenced by the time and the culture techniques, possibly hampering the precise identification of the agent. In this context, the objective of the present study was the characterization of clinical isolates of *H. capsulatum* through molecular techniques, using RAPD markers and sequencing the ITS region of the rDNA, to elucidate the taxonomic position, to assess the genetic variability, and to understand the relationships between the isolates of *H. capsulatum* from different sources and their hosts. Thirty-four isolates of *H. capsulatum* obtained from patients of three Brazilian states, were combined with reference lineages of *H. capsulatum* var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii*, and *Exophiala jeanselmei* that were used as the outgroup, for a total of 37 samples. RAPD markers and ITS sequences showed congruent results, revealing polymorphism among the isolates with respect to their origin. Primary isolates that had difficulty in reversing were distributed among the different groups from the RAPD analysis. Also, the sequencing of the ITS region showed a genetic similarity between isolates from Brazil and the strains of *H. capsulatum* var. *farciminosum*.

Keywords: *Histoplasma capsulatum*, genetic variability, RAPD, ITS sequences.

1 INTRODUÇÃO

A histoplasmose é uma infecção fúngica, de caráter oportunista, com evolução aguda ou crônica capaz de acometer aves, homem e outros mamíferos (RAMDIAL et al., 2002; SILVA-VERGARA et al., 2001; WHEAT, 1996; COHEN et al., 1991; MUNIZ et al., 2001) e seu agente etiológico é o fungo *Histoplasma capsulatum* (DRUTZ, 1988; DRUTZ, 1989; RIPPON, 1989; SAROSI, 1986; SZANISZLO, 1985).

Epidemiologicamente, o *H. capsulatum* se distribui de forma cosmopolita sendo encontrado principalmente no hemisfério norte, incluindo algumas áreas do sudoeste dos Estados Unidos, sul do México e também América do Sul (DRUTZ, 1988; DRUTZ, 1989; RIPPON, 1989; SAROSI, 1986; SZANISZLO, 1985; RAMDIAL et al., 2002; WHEAT, 1996).

A histoplasmose humana, em geral, manifesta-se primariamente e predominantemente (cerca de 90% dos casos) nos pulmões, causando o quadro pneumonite aguda, muitas vezes assintomático e de regressão espontânea. Entretanto, dependendo da exposição durante o contágio, da variedade do agente e ou das características imunológicas do hospedeiro, a patogênese pode manifestar-se com clínica pulmonar aguda de variável gravidade podendo ser caracterizada por uma doença progressiva e potencialmente fatal quando as defesas do hospedeiro estão prejudicadas (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; RIPPON, 1990; BORGES et al., 1997; FEMAN & TILFORD, 1985; SOUZA et al., 1995). É uma enfermidade relativamente rara, restrita a surtos endêmicos e ganhou, mais recentemente, renovada importância, por sua maior frequência e seu comportamento oportunista em paciente imunodeprimidos pela infecção do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). O *H. capsulatum* é um fungo naturalmente patogênico, que quando incidente em paciente imunossuprimido apresenta clínica, evolução e prognósticos mais graves (BORGES et al., 1997; FEMAN & TILFORD, 1985; SOUZA et al., 1995; MUNIZ et al., 2001; POONWAN et al., 1998; HALL et al., 1995).

Ecologicamente o *H. capsulatum* é um fungo dimórfico, saprobionte, encontrado de forma ubíqua na natureza, disseminado pelo solo e poeira ricos em nitrogênio e ambientes contaminados por excrementos de aves, morcegos e outros mamíferos infectados (RAMDIAL et al., 2002; SILVA-VERGARA et al., 2001; WHEAT, 1996; COHEN et al., 1991), sendo isolado de grupos de indivíduos que visitaram grutas habitadas por morcegos ou que tiveram contato com galinheiros, pombais ou casas desabitadas (MUNIZ et al., 2001). Na natureza, em temperaturas ambientais (em torno de 25°C), é encontrado na sua forma micelial ou infectante. Porém, quando inalado ou cultivado à temperatura corpórea (37°C), em meios ricos como ágar infusão de cérebro-coração acrescidos ou não de sangue, o *H. capsulatum* se desenvolve na forma de levedura, ou parasitária, formando colônias cremosas, úmidas, brilhantes e lisas. Tal dimorfismo é freqüentemente utilizado como um critério de identificação *in vitro* (HAMILTON, 1998; PERROTTA et al., 2001; KERSULYTE et al., 1992; RIPPON, 1990; POONWAN et al., 1998; AJELLO, 1960; HALL et al., 1995; WHEAT, 2001). No entanto, nem todos os isolados preservam tal característica, o que dificulta sua identificação por meio dos métodos tradicionais. Sendo assim, a caracterização morfológica das colônias não deve ser usada como um critério único na identificação do agente etiológico desta enfermidade. Dentro desse contexto, o uso de métodos moleculares é de fundamental importância. O uso de marcadores RAPD pode fornecer subsídios para confirmação da identificação deste agente e do diagnóstico da doença, além de possibilitar o estudo da variabilidade genética de isolados de diferentes procedências (CARTER et al., 1997; KEATH et al., 1992; SPITZER et al., 1989; VINCENT et al., 1986). Como instrumento auxiliar na confirmação dos dados obtidos por RAPD, o uso de seqüências ITS do DNAr permite, também, a identificação das relações filogenéticas e tem representado um grande avanço no estudo desses fungos. Dessa forma, dados de seqüenciamento aliados aos marcadores moleculares obtidos por RAPD, foram utilizados visando a elucidação taxonômica, estudo da variabilidade genética e um melhor entendimento da relação de isolados *H. capsulatum*, de diferentes procedências, com seus hospedeiros.

2 OBJETIVOS

- Utilizar marcadores RAPD e seqüenciamento de regiões ITS do DNAr como auxiliar na identificação de isolados morfologicamente identificados como *H. capsulatum*.
- Verificar a variabilidade genética entre diferentes isolados de *H. capsulatum*.
- Identificar relações existentes entre isolados, suas procedências e diversidade de quadros clínicos por meio de marcadores RAPD e seqüências ITS.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O FUNGO *Histoplasma capsulatum*

Embora exista uma estimativa de 100.000 espécies de fungos, as micoses sistêmicas são causadas por um pequeno grupo desses microrganismos. Desde seu isolamento, por Darling em 1906, o *H. capsulatum* tem sido documentado como o agente etiológico da histoplasmose e sua forma teleomórfica denominada *Ajellomyces capsulatus* (POONWAN et al., 1998; AJELLO, 1960; HALL et al., 1995; SILVA-VERGARA et al., 2001; KLITE & DIERCKS, 1965; WOODS, 2002; FERNANDEZ et al., 2001; REID & SCHAFFER, 1999; SANO & MIYAJI, 2003; TIAN & SHEARER, 2002).

Taxonomicamente, o *H. capsulatum*, é um Eucarioto, do reino Fungi, encontra-se na divisão (filo) Ascomycota, subdivisão (subfilo) Ascomycotina, classe Ascomycetes, ordem Onygenales, família Onygenaceae, gênero *Histoplasma* (*Ajellomyces*), espécie *Histoplasma capsulatum*; sendo que esta apresenta três variedades: *H. capsulatum* var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii* e *H. capsulatum* var. *farciminosum* (PERROTTA et al., 2001; KERSULYTE et al., 1992; RIPPON, 1990; KWON-CHUNG & BENNETT, 1992) baseadas nas características morfológicas (CAMPBELL & BERLINER, 1973), polimorfismo genético, (CARTER et al., 1997; KEATH et al., 1992; SPITZER et al., 1989; VINCENT et al., 1986) e preferência por diferentes regiões geográficas e hospedeiros. Tais variedades do fungo são evolutivamente, ecologicamente e biologicamente diferentes (VINCENT et al., 1986) e cada uma responsável por uma forma da doença (WHEAT, 2001).

Morfologicamente, o *H. capsulatum* var. *capsulatum* e o *H. capsulatum* var. *duboisii* são indistinguíveis em sua fase micelial, no entanto, nos tecidos animais o *H. capsulatum* var. *duboisii* é encontrado como elemento leveduriforme, de forma ovalada, maior e de parede mais espessa do que a *H. capsulatum* var. *capsulatum*, medindo de 10 a 15µm, de localização extracelular no tecido do hospedeiro quando corado por PAS ou pela prota-metanamina (PERROTTA et

al., 2001; KERSULYTE et al., 1992; RIPPON, 1990; KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; TIAN & SHEARER, 2002).

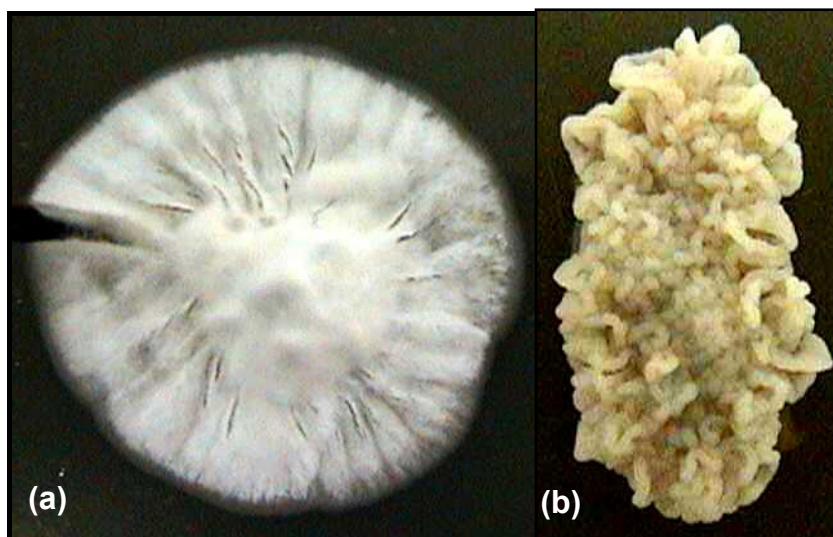
Assim como os demais agentes micóticos sistêmicos, o *H. capsulatum* sp é fungo é inerentemente virulento, causa doença em seres humanos sadios ou imunocomprometidos e apresenta aspectos bioquímicos e morfológicos que lhe permite escapar das defesas do hospedeiro (DRUTZ, 1988; DRUTZ, 1989; RIPPON, 1989; SAROSI, 1986; SZANISZLO, 1985). Trata-se de um fungo termodimórfico, difícil de ser cultivado *in vitro* dependendo da variedade a ser examinada, e os métodos utilizados para seu cultivo assim como o tempo de cultura *in vitro* afetam diretamente sua morfologia, esporulação e habilidade de dimorfismo (HAMILTON, 1998; PERROTTA et al., 2001; KERSULYTE et al., 1992; RIPPON, 1990; POONWAN et al., 1998; AJELLO, 1960; HALL et al., 1995; WHEAT, 2001; SILVA-VERGARA et al., 2001; WOODS, 2002; LIMA et al., 2001; WOODS et al., 2002; TIAN & SHEARER, 2002).

As características morfológicas e dimorfismo são adaptações dos fungos para sua preservação na natureza. LIMA et al., 2001 realizaram um estudo com o objetivo de verificar as melhores condições para se preservar as características biológicas do *H. capsulatum*, mesmo após um longo período de cultivo em laboratório. Tais autores concluíram que é necessário estabelecer um meio ambiente apropriado, utilizar pequenos períodos para o repique, escolher o tempo exato de intervenção para indução do crescimento e desenvolvimento, particular para cada linhagem, e monitorar periodicamente as culturas. Além disso, demonstraram que o melhor meio para preservar o fungo é sob óleo mineral. Para tal, mantiveram linhagens de *H. capsulatum* em ágar dextrose sob óleo mineral ou somente no solo por diferentes períodos, durante 8 a 49 anos. Das 15 linhagens de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* estudadas, somente uma, cultivada em óleo (guardada por 15 anos), permaneceu viável, porém perdeu a capacidade de esporulação e dimorfismo.

Macroscopicamente, em meios de cultura definidos a temperatura ambiental, o *H. capsulatum* apresenta um desenvolvimento filamentososo, cresce como culturas brancas, algodonosas, de desenvolvimento lento, com micélio aéreo, que tendem a escurecer com o tempo (Figura 1a). Em temperaturas

corpóreas (37°C), desenvolve-se em sua fase leveduriforme formando colônias cremosas, úmidas, brilhantes e lisas (Figura 1b).

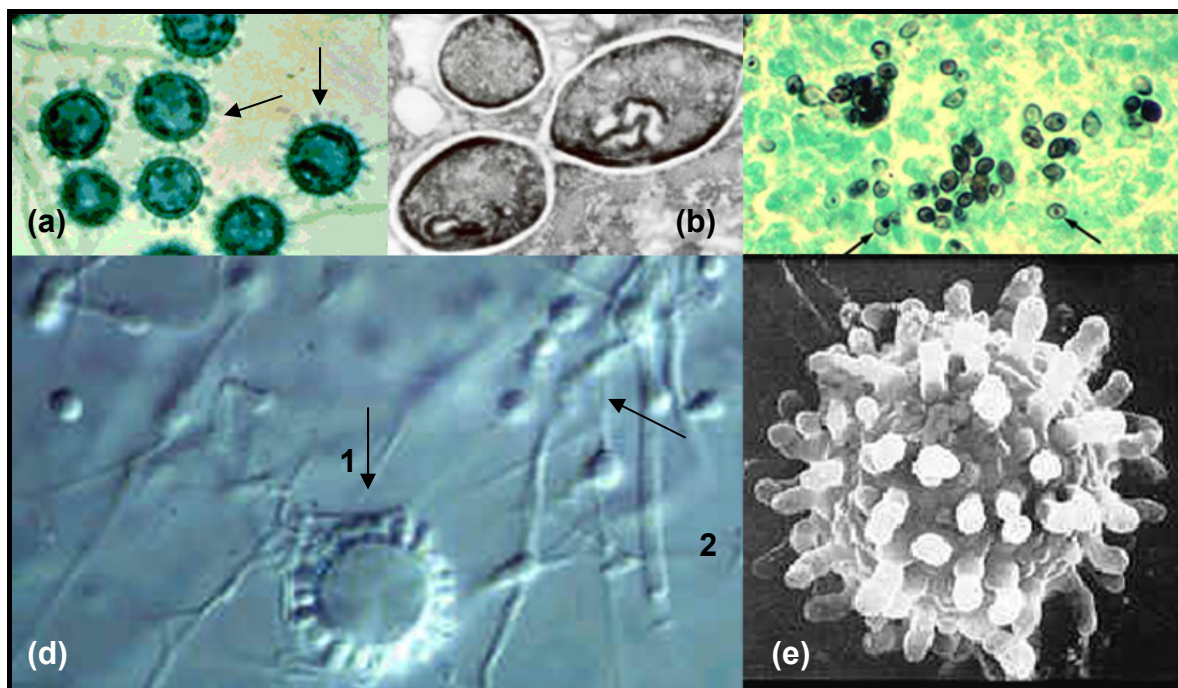
FIGURA 1 - MACROMORFOLOGIA DE ISOLADO DE *H. capsulatum*



Colônia isolada em ágar Sabouraud: (a) cultivo a 25°C mostrando fase micelial, (b) cultivo a 37°C mostrando fase leveduriforme. Fonte: o autor.

Microscopicamente, nas temperaturas ambientais, observam-se hifas hialinas delicadas, septadas, ramificadas, que produzem microconídios ou clamidoconídios lisos e equinulados e macroconídios tuberculados (Figuras 2a, 2b, 2d e 2e). Nas temperaturas corpóreas e em meios ricos, pode-se observar, microscopicamente, pequenas células leveduriformes (Figuras 2b e 2c) medindo de 1 a 5µm de diâmetro, que são encontradas, quando no tecido do hospedeiro, quase que exclusivamente no interior de macrófagos. As células leveduriformes, no meio de cultura, podem apresentar brotamento, o que raramente se observa nos tecidos (KERN, 1988; DRUTZ, 1988; DRUTZ, 1989; RIPPON, 1989; SAROSI, 1986; SZANISZLO, 1985; ARMBRUSTER et al., 1996; BELLMAN et al., 1997; BODILY et al., 1996; DEODHARE & SAPP, 1997; HAJJEH, 1995; KILBY et al., 1998; RAZA et al., 1996; SULLIVAN et al., 1998; WHEAT, 1994; WHEAT, 2001; SILVA-VERGARA et al., 2001; KLITE & DIERCKS, 1965).

FIGURA 2 - MICROMORFOLOGIA DE *H. capsulatum* var. *capsulatum*



(a) Conidiogênese em fase micelial (MO), fonte: www.vetmed.wisc.edu/students/vetmycology/lab.htm; (b) Microconídio de *H. capsulatum* var. *capsulatum* (MET), fonte: www.fmvz.unam.mx/.../patologia/microscopia.htm; (c) Fase leveduriforme no tecido (MO), fonte: www.cat.cc.md.us/.../lab10/histlung.html; (d) Macroconídios(1) e microconídios(2) (MEV), fonte: www.doctorfungus.org/.../histoplasmosis.htm; (e) Macroconídio tuberculado de *H. capsulatum* var. *capsulatum* (MEV), fonte: www.mycolog.com/chapter23.htm.

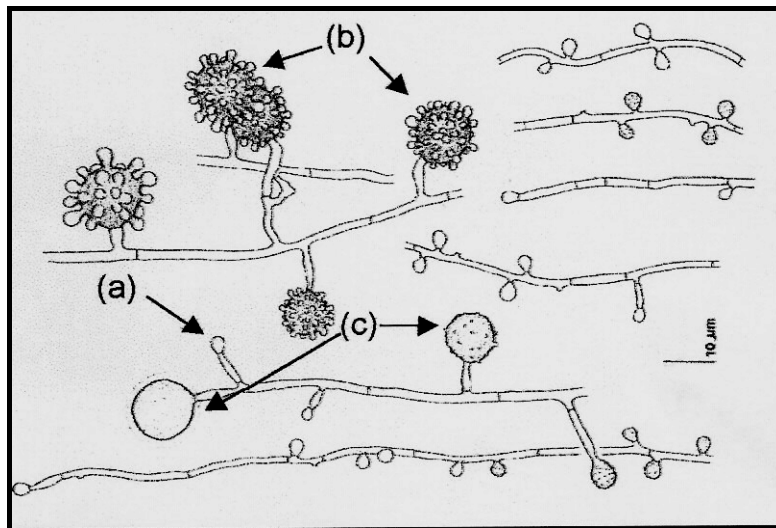
De maneira geral, o microrganismo cresce como um multicelular no meio ambiente (forma infectante). e conídios, fragmentos de hifas e/ou outros elementos infecciosos do fungo são inalados por humanos ou outros animais. No hospedeiro, são fagocitados pelos macrófagos pulmonares e depois se convertem, intracelularmente, como leveduras parasitas capazes de replicar em macrófagos onde exista uma diminuição da capacidade microbicida ocasionada, por exemplo, por alterações do sistema imune do hospedeiro (RAMDIAL et al., 2002, RIPPON, 1989; SAROSI, 1986; SZANISZLO, 1985; MAGRINI & GOLDMAN, 2001; WOODS, 2002; REID & SCHAFFER, 1999), vindo ser esta a trajetória da infecção.

Em hospedeiros imunocompetentes, no entanto, os macrófagos adquirem atividade fungicida e controlam a infecção. A fungemia transitória antes do desenvolvimento da imunidade contribui para a distribuição de granulomas calcificados no fígado e baço freqüentemente observados durante a necropsia de

pacientes de áreas endêmicas. No entanto, organismos viáveis podem persistir no hospedeiro após a resolução da histoplasmose não complicada e virem a ser a origem da doença disseminada em casos de imunodeficiência em pacientes que não possuem uma história de exposição recente (DRUTZ, 1988; DRUTZ, 1989).

Existe uma variação de estruturas filamentosas encontradas quando o *H. capsulatum* se desenvolve a 25°C que podem ser observadas na Figura 3.

FIGURA 3 - DIFERENTES ETAPAS DO DESENVOLVIMENTO DO MACROCONÍDIO DE *H. capsulatum* var. *capsulatum* a 25°C



(a) Microconídio jovem, desenvolvimento do microconídio; (b) Macroconídio tuberculado maduro; (c) Macroconídio liso ou levemente tuberculado (adaptação: HOOG & GUARRO, 1995).

O dimorfismo no *H. capsulatum* está intimamente envolvido com as estratégias de adaptação para a sobrevivência do fungo, que faz deste um patógeno intracelular facultativo quase que exclusivo das células do retículo-endotelial de mamíferos (WOODS, 2002; TIAN & SHEARER, 2002). Um grande número de estudos envolvendo biologia molecular, genética reversa para o desenvolvimento da biologia da célula e imunologia tem criado uma integração para o avanço do entendimento do dimorfismo e sua relação com a virulência desta importante patologia (MAGRINI & GOLDMAN, 2001; WOODS, 2002; TIAN & SHEARER, 2002; TIAN & SHEARER, 2001).

TIAN & SHEARER (2001) caracterizaram a patogênese causada pelo *H. capsulatum*, em particular no que diz respeito ao possível papel de genes expressados especificamente na fase micelial do fungo, chamados de MS88 e MS8, e que podem ser silenciados na fase leveduriforme. Além disso, TIAN & SHEARER (2002) acrescentaram que para a doença se manifestar, é necessário que ocorra uma mudança no fungo de sua fase micelial (infectante) para leveduriforme (parasitária).

O parasitismo do *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 pelo *Histoplasma* não inibe a fusão do fagossoma com o lisossoma, isto é, o fagolisossoma (EISSENBURG et al., 1988). Assim o fungo é exposto a uma grande quantidade de produtos oxidantes e enzimas degradativas provenientes do macrófago que constituem as defesas do hospedeiro (WOLF et al., 1987; SCHNUR & NEWMAN, 1990). O organismo pode adotar estratégias de sobrevivência (EISSENBURG & GOLDMAN, 1991) para se defender contra a acidificação intracelular (EISSENBURG et al., 1993), limitação de elementos essenciais incluindo cálcio (BATANGHARI et al., 1998; PATEL et al., 1998) e ferro (TIMMERMAN & WOODS, 2001) e restrição em metabólitos essenciais.

3.1.1 Epidemiologia e Importância Clínica

O *H. capsulatum* é um fungo saprobionte e tem sido isolado de fezes de aves, morcegos e outros mamíferos como cachorros, gatos, ratos e outros roedores, carnívoros de vida silvestre, em marsupiais como o *Didelphis albiventris*, um marsupial encontrado no estado de Minas Gerais no Brasil (SILVA-VERGARA et al., 2001), e em solos com alto teor de nitrogênio e fosfato recolhidos nos locais freqüentados por estes animais, o que confirma a presença do fungo na natureza (ARMBRUSTER et al., 1996; BELLMAN et al., 1997; BODILY et al., 1996; DEODHARE & SAPP, 1997; HAJJEH, 1995; KILBY et al., 1998; RAZA et al., 1996; SULLIVAN et al., 1998. WHEAT, 1994; SILVA-

VERGARA et al., 2001; KLITE & DIERCKS, 1965; WOODS, 2002; BRUCE, 2001). No entanto, as aves não são infectadas, enquanto que a infecção natural ocorre em morcegos (PERROTTA et al., 2001; KERSULYTE et al., 1992; RIPPON, 1990; SILVA-VERGARA et al., 2001; KLITE & DIERCKS, 1965; BRUCE, 2001).

O *H. capsulatum* é cosmopolita, amplamente distribuído em regiões subtropicais e tropicais, nas quais existem áreas de grande endemicidade, particularmente o centro-oeste, meio-oeste, incluído as regiões de Ohio e Vale do Mississipi, dos Estados Unidos (DEEPE & BULLOCK, 1992; MUNIZ et al., 2001; SILVA-VERGARA et al., 2001; REID & SCHAFER, 1999; TIAN & SHEARER, 2002), além de áreas das províncias de Ontario e Quebec, Canadá, Panamá, México, Honduras, Guatemala, Nicarágua, Venezuela, Guiana Francesa, Colômbia, Ilhas do Caribe, Peru, Brasil, Argentina e outras áreas dispersas das Américas Central e do Sul. Também foram descritos casos de histoplasmose na Europa (FERNANDEZ et al., 2001; PERROTTA et al., 2001; KERSULYTE et al., 1992; RIPPON, 1990; KERN, 1988; DRUTZ, 1988; DRUTZ, 1989; RIPPON, 1989; SAROSI, 1986; SZANISZLO, 1985; MUNIZ et al., 2001; LATINI, 1985; RUBINSTEIN & NEGRONI, 1981; KWON-CHUNG & BENNETT, 1992, ARMBRUSTER et al., 1996; BELLMAN et al., 1997; BODILY et al., 1996; DEODHARE & SAPP, 1997; HAJJEH, 1995; KILBY et al., 1998; RAZA et al., 1996; SULLIVAN et al., 1998. WHEAT, 1994; SILVA-VERGARA et al., 2001; KLITE & DIERCKS, 1965; DURKIN et al., 2001; WOODS, 2002; SANO & MIYAJI, 2003) e em países da Ásia, tal como Indonésia, Tailândia, Índia, Myanmar e Japão (AJELLO, 1960; SANO et al., 2001; UEDA et al., 2003; SANO & MIYAJI, 2003; TIAN & SHEARER, 2002).

De acordo com PERROTTA et al. (2001), KERSULYTE et al. (1992), RIPPON (1990), KWON-CHUNG & BENNETT (1992), AJELLO (1960) acredita-se que as diferentes variedades do fungo tenham uma distribuição regional limitada: a *H. capsulatum* var. *capsulatum* tem distribuição mundial, é endêmica na América, incluindo o Brasil (MUNIZ et al., 2001; KARIMI et al., 2002; BORGES et al., 1997; SOUZA et al., 1995; SILVA-VERGARA et al., 2001), e algumas áreas da África, Ásia e Europa; a *H. capsulatum* var. *duboisii* é encontrada somente na

África e por último a *H. capsulatum* var. *farciminosum*, foi descrita apenas como patógeno de cavalos e mulas em algumas áreas da Europa, África e Ásia.

Várias microepidemias de histoplasmose respiratória têm sido descritas quando ambientes abrigando o fungo são alterados por atividades humanas tal como exploração de cavernas, demolições de construções antigas, arrumações de acampamentos, desflorestamentos, urbanização maciça em locais antes ocupados pela natureza, trabalho em locais de risco manuseando solos ricos em componentes orgânicos, limpeza de galinheiros, em coletas de amostras de solo de locais suspeitos, em ocupações rural (SZANISZLO, 1985; KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; JIMENEZ et al., 2002) e também por meio de transplantes de órgãos contaminados (LIMAYE et al., 2000).

A histoplasmose, também é conhecida como doença de Darling, citomicose reticulo endotelial, doença das cavernas e doença dos “exploradores de cavernas” devido suas características (KERN, 1988; DRUTZ, 1988; DRUTZ, 1989; RIPPON, 1989; SAROSI, 1986; SZANISZLO, 1985; MUNIZ et al., 2001). Pode ser considerada uma infecção micótica clinicamente similar a infecção bacteriana da tuberculose, pois tanto o *H. capsulatum* quanto o *Mycobacterium tuberculosis* utilizam os macrófagos como célula hospedeira e podem causar comprometimento agudo ou crônico do pulmão, infecção disseminada e reativação da doença (WOODS, 2002).

A histoplasmose é uma doença sistêmica e respiratória (MUNIZ et al., 2001; XUE et al., 1992; RUBIN et al., 1959), relativamente rara, restrita a surtos epidêmicos, apresentando manifestações variadas, dependendo do estado imunológico do paciente. Como exemplo, pode-se ressaltar o quadro bucopulmonar em homens tabagistas ou alcoolistas crônicos, cujo sistema imunológico encontra-se comprometido. Mais recentemente, a histoplasmose ganhou renovada importância, dada sua maior frequência e por seu comportamento oportunista em paciente imunodeprimidos: tais como pacientes com SIDA; com câncer hematológicos, que estejam sendo submetidos a altas doses de corticóides; ou mesmos em crianças menores de um ano e pessoas acima de 54 anos. Em tais casos apresenta clínica, evolução e prognósticos mais graves podendo ser letal, (MIGNOGNA et al., 2001; WHEAT et al., 1990)

requerendo um pronto diagnóstico e tratamento específico (MUNIZ et al., 2001; WHEAT et al., 1991; RIPPON, 1990; KERSULYTE et al., 1992; XUE et al., 1992; RUBIN et al., 1959). Antes do coquetel da terapia antiretroviral, a histoplasmose acometia de 5 a 20% dos pacientes com SIDA nas áreas de endemicidade em todo mundo. Entretanto ainda hoje no Brasil, a histoplasmose pode vir a infectar mais de 5% de indivíduos com SIDA, em regiões endêmicas (BORGES et al., 1997; FEMAN & TILFORD, 1985; SOUZA et al., 1995; MUNIZ et al., 2001; POONWAN et al., 1998; HALL et al., 1995).

Em algumas situações, principalmente em pacientes imunodeprimidos mas também em imunocompetentes, como consequência da disseminação, o fungo pode se localizar em vários outros sítios, como a região ocular, cavidade bucal, laringe, pele, sistema nervoso, trato gastrointestinal, glândulas adrenais, no interior dos nervos cutâneos, em abscesso na tíbia, assim como nos demais ossos, mesmo em pacientes sem nenhuma evidência de envolvimento pulmonar por histoplasmose, muitas vezes sendo confundido com carcinoma (FERNANDEZ et al., 2001; RODRIGUEZ et al., 2001; ARMBRUSTER et al., 1996; BELLMAN et al., 1997; BODILY et al., 1996; DEODHARE & SAPP, 1997; HAJJEH, 1995; KILBY et al., 1998; RAZA et al., 1996; SULLIVAN et al., 1998. WHEAT, 1994; WHEAT, 2001; WOODS, 2002; BONNET et al., 2002) .

A histoplasmose clássica, causada pela variedade *H. capsulatum* var. *capsulatum* possui três formas: a histoplasmose-infecção, a histoplasmose-doença e a histoplasmona e fibrose mediastinal (RAMDIAL et al., 2002; WHEAT, 1996; HAY, 1993; WHEAT, 2001).

A histoplasmose-infecção pode se expressar de forma assintomática ou como Infecção pulmonar aguda. Em 95% dos casos, apresenta quadro assintomático que se resolve de forma espontânea e um terço dos pacientes podem apresentar resolução residual pulmonar caracterizada por calcificações residuais nodulares pulmonares, similares ao da tuberculose. Em 5 a 10% dos casos, podem estar associados a lesões cutâneas tipo eritema nodoso, artrite, derrame pleural ou derrame pericárdico (KERN, 1988; SAROSI, 1986; SZANISZLO, 1985; WHEAT, 2001).

Na histoplasmose clássica, a histoplasmose-doença pode se expressar em quadro pulmonar crônico isolado ou multifocal crônico, em adultos, disseminada aguda, em jovens, e disseminada oportunista, em pacientes imunodeprimidos.

A histoplasmose pulmonar crônica, isolada e cavitária do adulto, é observada em pacientes masculinos, idosos e com doença pulmonar obstrutiva crônica de base. Manifesta-se com tosse produtiva, dor torácica, dispnéia progressiva, febre e ainda inapetência e adinamia. O quadro radiográfico sugere tuberculose e mesmo após o tratamento, as condições ventilatórias pulmonares permanecem limitadas.

A histoplasmose multifocal crônica é a mais comum da forma clássica da histoplasmose. Típica de adulto do sexo masculino caracteriza-se pela presença de lesões tegumentopulmonares. Seu quadro clínico é a presença de lesão de mucosa bucofaríngea, ulcerada, com granulações finas ou não, às vezes recobertas por pseudomembrana ou aspecto necrótico. É característica a lesão ulcerada da língua, de disposição longitudinal, associada à macroglossia e muito dolorosa. As lesões cutâneas ocorrem em torno de 10% dos casos com aspecto ulcerovegetante e as vezes ulceronecrotico com infecção secundária e mais raramente acneiforme. O comprometimento pulmonar é de intensidade variável, predominando infiltrado intersticial difuso. Apresenta raro comprometimento hepatoesplênico. Em um pequeno número de casos, a infecção inicial não é curada e há progressão da histoplasmose disseminada, caracterizada por replicação intracelular contínua das leveduras do *H. capsulatum* no interior de macrófagos, provavelmente devido a um defeito na imunidade celular e da extensão da parasitização do sistema fagocitário mononuclear (BAVA et al., 1996; DRUTZ, 1988; DRUTZ, 1989; RIPPON, 1989; SAROSI, 1986; SZANISZLO, 1985; WHEAT, 2001).

A histoplasmose disseminada aguda é observada na infância e adolescência. É uma forma clínica rara e corresponde à progressão do fungo no complexo primário, particularmente em órgãos ricos em células do sistema monocítico-fagocitário. Ao exame, observam-se adenomegalia generalizada com tendência a fistulação e hepatoesplenomegalia. A presença de lesões cutâneas caracteriza-se pelo padrão acneiforme inicial e evolução para lesão ulcerada e ulcerovegetante. Pode haver comprometimento meningoencefálico.

A histoplasmose disseminada oportunista, uma forma grave da histoplasmose, é descrita com grande incidência em adultos com neoplasias hematológicas, em uso ou que realizaram tratamento citotóxico contra carcinomas ou terapia com imunossupressores como esteróides (principalmente corticoterapia crônica); associada à SIDA em pacientes com níveis de células CD4+, em média, de 33/mm³, isto é, imunodeficiência severa (POLIS KOVACS, 1992; WHEAT et al., 1990; RAMDIAL et al., 2002), ou a outro fator de imunossupressão grave. Em casos raros, também tem sido descrita em idosos, crianças e em pacientes com deficiência de células da imunidade secundária (DRUTZ, 1988; DRUTZ, 1989; RIPPON, 1989; SAROSI, 1986; SZANISZLO, 1985; WHEAT, 2001). Tal forma de histoplasmose apresenta aspectos muito semelhantes àquela que ocorre na infância. Pode decorrer tanto da reativação de foco quiescente, devido a infecção pelo vírus HIV-1 que pode deflagrar reativação do *H. capsulatum* latente em pacientes previamente expostos à histoplasmose, quanto da progressão de infecção recente. Caracteriza-se por evolução aguda e subaguda (POLIS KOVACS, 1992; WHEAT et al., 1990) com febre e emagrecimento, freqüência de lesões bucocutâneas, adinamia, anorexia, adenomegalia, anemia, comprometimento da medula óssea e manifestações pulmonares em 40% dos casos, hepatomegalia em 25% e doença septicêmica em 10% dos casos. As manifestações cutâneas ocorrem em aproximadamente 10% a 25% dos casos, principalmente em pacientes com histoplasmose e SIDA, sendo, portanto, um instrumento de diagnóstico (NEGRONI et al., 1990), podendo coexistir com doenças granulomatosas dos pulmões tais como tuberculose e sarcoidose (RAMDIAL et al., 2002). As lesões cutaneomucosas são polimorfas, únicas ou múltiplas, de padrão papuloacneiforme, ulceronecrotico ou ulcerovegetante (NEGRONI et al., 1990). O envolvimento do sistema nervoso central, uma complicação rara da histoplasmose disseminada, também foi descrita associada à infecção pelo HIV. Todos os órgãos podem ser afetados e a expressão bucal e cutânea podem se manifestar com extensões variadas, dependendo do comprometimento imunológico do paciente (WHEAT et al., 1990; BELLMAN et al., 1997). Nos últimos 50 anos, em indivíduos imunocompetentes, poucos são os relatos de casos de histoplasmose com lesão em pele e boca mesmo quando os pacientes apresentavam a forma disseminada (MILLER et al., 1982; PISANTY, 1979; CATANEI & KERVRAN, 1945; ZIEGLER, 1946; CAMAIN et al., 1958; DROUHET & VILASCO,

1958; TIECKE et al., 1963; AKINOSI, 1970; SANYAL et al., 1973; BASLER & FRIEDMAN, 1974; TOTH & FRAME, 1983; ADEKEYE et al., 1988; LOH et al., 1989; PADHYE et al., 1994; TIAGO et al., 1998). Quando presentes, as lesões cutâneas podem ser múltiplas e apresentar aspecto morfológico variável. Em 85% dos casos de histoplasmose associada a SIDA, esta pode corresponder à primeira manifestação oportunistica da síndrome (BORGES et al., 1997; MCKINSEY et al., 1997; NEGRONI et al., 1990; WHEAT et al., 1990). O comprometimento com lesões extrapulmonares é resultante da manifestação sistêmica generalizada da doença (REDDY et al., 1970). De acordo com MIGNOGNA et al. (2001) pacientes imunocompetentes raramente são acometidos pela histoplasmose bucal sendo apenas encontrada a forma localizada da manifestação. Em pacientes com SIDA, entretanto, manifestações bucais têm assumido considerável importância (cerca 25-45% dos casos) se tornando mais agressiva, com várias lesões que podem se disseminar, (MILLER et al., 1982; ODA et al., 1990; SAROSI & JOHNSON, 1992) ocorre em estágios tardios da doença disseminada comparado com outros casos e o avanço da imunossupressão provavelmente está associado com o agravamento da histoplasmose disseminada e com o grande número de mortalidade.

Ainda em relação a histoplasmose clássica, a histoplasmona é um quadro raro de infecção pelo *H. capsulatum* que corresponde ao quadro de massa tumoral pulmonar, constituída de tecido colágeno e calcificações, que aumenta lenta e progressivamente de tamanho e que envolve um foco primário cicatrizado com clínica geralmente silenciosa (KWON-CHUNG & BENNET, 1992; NEGRONI et al., 1990; RIPPON, 1989; BONNET et al., 2002; PAPHITOU & BARNETT, 2002). Tal quadro também foi diagnosticado por PAPHITOU & BARNETT (2002) no Texas. Além disso, tem sido relatada a ocorrência de histoplasmona intracraniana, enfermidade rara que pode mimetizar quadros de neoplasia cujo diagnóstico diferencial é a partir da evolução e acentuação do anel das lesões cerebrais. A fibrose mediastinal corresponde a mesma resposta de hipersensibilidade da histoplasmona, no entanto, envolve massa ganglionar de espaço mediastinal (DRUTZ, 1988; DRUTZ, 1989; RIPPON, 1989; SAROSI, 1986; SZANISZLO, 1985; KWON-CHUNG & BENNET, 1992; NEGRONI et al., 1990; RIPPON, 1989).

Além da histoplasmose clássica, existem mais duas formas da doença, a histoplasmose africana causada pelo *H. capsulatum* var. *duboisii* e a histoplasmose farciminosi conhecida como Pseudofacy, causada pelo *H. capsulatum* var. *farminosum*.

A histoplasmose africana foi descrita por Ducan em 1943, em Gana (DUCAN, 1947) e epidemiologicamente, é endêmica de regiões de clima tropical úmido da África subtropical (VINCENT et al., 1986), mas alguns casos, têm sido descritos em outras regiões, inclusive na América do Sul (NEGRONI, 1996). É caracterizada por doença localizada e de evolução crônica, com manifestação primária cutânea cujo aspecto morfológico varia de pápula e nódulos a lesão ulcerovegetante. As características distinguíveis desta doença para a histoplasmose clássica são a raridade das lesões pulmonares, a prevalência das formas localizadas com envolvimento da pele, mucosa bucal, tecidos subcutâneos, articulações e osso e presença de lesões linfáticas e viscerais abominais na forma disseminada (COCKSHOTT et al., 1964; DRUTZ, 1988; DRUTZ, 1989; RIPPON, 1989; SAROSI, 1986; SZANISZLO, 1985).

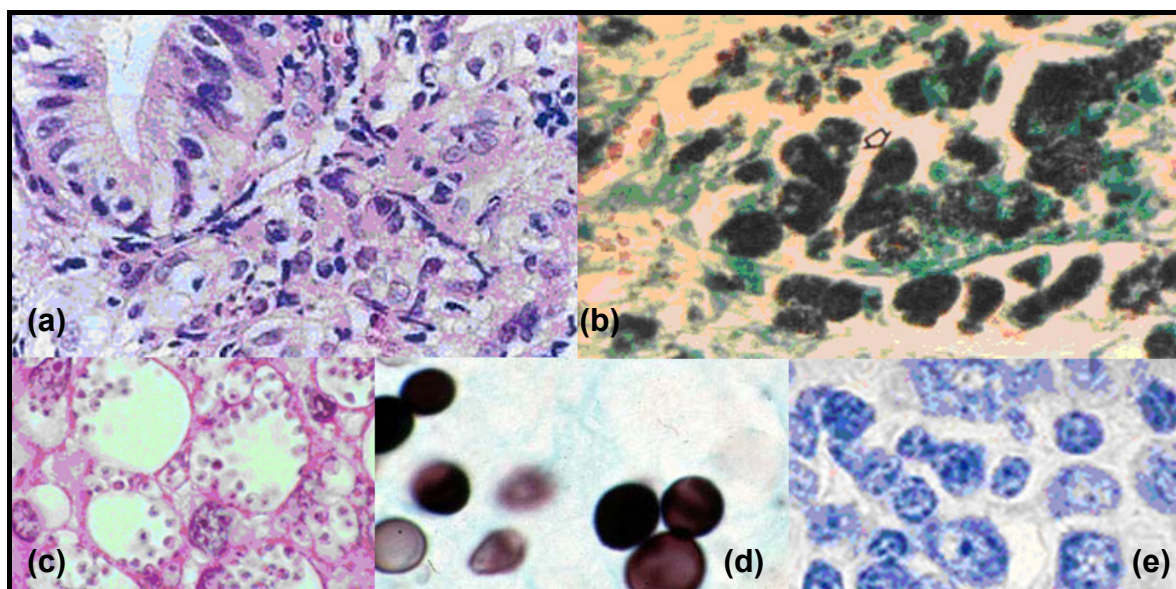
A histoplasmose farciminosi causa o episódio de linfagenite em eqüinos (cavalos, mulas e burros) com envolvimento patológico de ossos, abscessos de tecidos moles, lesões cutâneas e não causa doença em humanos (SAROSI, 1986; SZANISZLO, 1985).

3.1.2 Isolamento e Diagnóstico de *Histoplasma capsulatum* Por Meio de Técnicas Convencionais

O diagnóstico da histoplasmose tem sido evidenciado classicamente a partir da análise morfológica microscópica e macroscópica de colônias isoladas; exame histopatológico de lesão cutaneomucosa ou ganglionar; hemocultivo; punção medular e cultivo de material de medula óssea, que são positivo em mais de 90% dos casos. Exames citopatológico do escarro; por meio de testes antigênicos tem apresentado grande valor nos casos de histoplasmose disseminada, mas apresentam limitação para casos da infecção localizada (NEGRONI et al., 1990; BIALEK et al., 2002; HAMILTON, 1998; BONNET et al., 2002). Biópsia de pulmão e pele, corados com HE (Figuras 4a e 4c), giemsa

(Figura 4e), PAS (Figura 4b) ou Grocott (Figura 4d), são utilizados por mostrar intenso parasitismo nas células do sistema retículo endotelial. No entanto, a identificação desse agente se confirma por meio do teste de reversibilidade *in vitro*, a partir do aspecto da colônia em ágar Sabouraud e Mycosel® (RIBEIRO & SOARES, 2002). Tal técnica baseia-se no caráter dimórfico e reversibilidade do *H. capsulatum* e, apesar de demorado, é o método mais confiável para a identificação deste agente. A taxonomia do *Histoplasma* é realizada freqüentemente baseada nesse critério (NEGRONI et al., 1990; BIALEK et al., 2002; HAMILTON, 1998; TIAGO et al., 1998; BONNET et al., 2002).

FIGURA 4 - EXAMES LABORATORIAIS UTILIZADOS PARA O DIAGNÓSTICO DA HISTOPLASMOSE



(a) gastrite ulcerada com macrófagos distendidos por *H. capsulatum*. Presença de halo claro indicando falsa impressão de cápsula (HE, 40x), fonte: TARAZONA et al., 2003; (b) pneumonite por leveduras *H. capsulatum* intracelulares prata positivos nos pneumócitos/macrófagos do revestimento alveolar (prata metenamina, 500x), fonte: www.fmtm.br/instpub/fmtm/patge/index.htm; (c) macrófagos parasitados por *H. capsulatum* (HE, 100x), fonte: www.yamagiku.co.jp/pathology/case/case176.htm; d) levedura de *H. capsulatum* var. *duboisii* circulante no sangue (Gomori-Grocott), fonte: www.bioltrop.org/.../histoplasnose.htm; (e) levedura de *H. capsulatum* (giemsa), fonte: www.bioltrop.org/.../histoplasnose.htm.

Paralelamente aos exames laboratoriais tem se utilizado como exame complementar à investigação por meio de testes radiográficos, tomografia computadorizada, broncoscopia e teste de sorologia nos casos de histoplasnose

associada à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), porém tal técnica apresenta percentual de falso-negativo elevado, em torno de 30% na fixação do complemento e 42% na imunodifusão (NEGRONI et al., 1990), sendo necessária a biópsia para a identificação micológica e histologia exata da lesão, principalmente em pacientes fumantes (BONNET et al., 2002). Lesões pulmonares e uma alta quantidade do fungo no baço são sinais característicos da patologia da *H. capsulatum* var. *capsulatum* (DURKIN et al., 2001; WOODS, 2002) e o diagnóstico da histoplasmose africana é realizado por meio de exame direto ou histopatológico (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; LACAZ et al., 1991; WHEAT, 2001; FERNANDEZ et al., 2001).

Microscopicamente, no interior dos macrófagos, o *H. capsulatum* apresenta-se na forma leveduriforme, arredondado ou ovalado e de cor azul quando na coloração de Giemsa (Figura 4e). O citoplasma se cora de azul claro, e o núcleo fica localizado em um dos pólos e se cora intensamente. Pode-se observar um halo claro ao redor do fungo e nessas formas são difíceis de serem diagnosticados no exame microscópico direto do escarro. Nos cortes histológicos, são vistos no interior dos macrófagos com aspecto de partículas basófilas circundadas por halo claro. A identificação é corroborada pelo método de PAS e impregnação pela prata. Em preparos corados com HE o fungo aparece com halo claro ao seu redor. Além desses, *H. capsulatum* pode ser isolado a partir do cultivo de baço, fígado e pulmões de camundongo inoculados intraperitonealmente com escarros, solo contaminado ou fezes de morcegos contaminados (NEGRONI et al., 1990; BIALEK et al., 2002; HAMILTON, 1998; KLITE & DIERCKS, 1965).

3.2 VARIABILIDADE GENÉTICA EM *H. capsulatum*

A variabilidade genética em microrganismos tem sido verificada a partir de técnicas convencionais (CAMPBELL & BERLINER, 1973) e moleculares (CARTER et al., 1997; KEATH et al., 1992; SPITZER et al., 1989; VINCENT et al., 1986). As convencionais baseiam-se na análise fenotípica a partir da caracterização morfológica (conidiogênese e macromorfologia da colônia), 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, o *Histoplasma*, um fungo de difícil cultivo *in vitro*. As técnicas moleculares, por sua vez, fornecem ferramentas suficientes para evidenciar e entender aspectos relacionados direta ou indiretamente com o DNA. Desta forma, a genética molecular tem sido de grande importância para a identificação e análise do comportamento e patogenicidade do *H. capsulatum*, assim como na diferenciação de indivíduos e no estudo filogenético desses organismos (WOODS, 2002).

Embora algumas vezes conflitantes, como pode ser observado principalmente na classificação taxonômica de microrganismos (SAMUELS, 1995; SEIFERT, 1995), os dados moleculares podem ser utilizados como métodos complementares para a confirmação de hipóteses baseadas nos estudos morfológicos (ALFENAS et al., 1991). No caso de fungos de importância clínica, os métodos moleculares são aplicados para a obtenção de dados mais precisos para taxonomia, uma vez que métodos clássicos apresentam uma limitada resolução e para o estudo da filogenia, onde tais métodos facilitam a construção de árvores filogenéticas as quais podem servir como um modelo do suposto curso da evolução (HOOG et al., 1998; McEWEN et al., 2000).

Vários são os métodos moleculares utilizados, atualmente, para o estudo de fungos, tais como eletroforese de isoenzimas, campo pulsado, análise do polimorfismo do DNA telomérico e a análise AFLP. O seqüenciamento parcial de genes ribossomais é o método de escolha no estudo de filogenia mostrando diferentes taxas de evolução de acordo com o domínio, identificando o número de substituição de bases dentro de uma única espécie e microsátélites (HOOG, 1997; KEATH et al., 1992; SPITZER et al., 1990; SPITZER et al., 1989; VAN GELDEREN DE KOMAID et al., 1992; KERSULYTE et al., 1992; POONWAN et al., 1998; REYES-MONTES et al., 1999; MCEWEN et al., 2000). Tais métodos têm sido usados no estudo da variabilidade entre espécies (MOLNAR et al., 1996) e população (UIJTHOF et al., 1994; UIJTHOF et al., 1995; HOOG, 1997). No entanto, no momento, os resultados ainda não são por demais conclusivos e é de extrema importância determinar o nível de diversidade taxonômica revelado em cada método (SEIFERT et al., 1995).

A variabilidade genética em *H. capsulatum* vem sendo verificada a partir de diversas técnicas de biologia molecular. A técnica de RAPD tem possibilitado identificar a relação do genótipo com o estado imunológico do pacientes e a forma clínica da doença, além de ser capaz de revelar subtipos de linhagens individualmente (KERSULITE et al., 1992).

Em *H. capsulatum* KERSULYTE et al. (1992), distinguiram entre isolados, classes de RFLP. Ainda verificaram que os isolados clínicos são bastante diversos, mas seus genomas permanecem estáveis durante cultura em laboratório. Estes resultados sugerem novas possibilidades para análise epidemiológica e estudos de populações fúngicas de hospedeiros infectados. A diversidade de isolados clínicos de *H. capsulatum* demonstrada pelos autores está de acordo com o fato de este fungo residir em muitos tipos de solos e climas, e com sua capacidade de infectar muitas espécies animais.

Em estudos iniciais, isolados de *H. capsulatum* var. *capsulatum* foram agrupados dentro de três amplas classes baseado-se em RFLP de cópia de gene simples, tal como *YPS3* (KEATH et al., 1992), ou DNAs ribossomal e mitocondrial (VINCENT et al., 1986; SPITZER et al., 1989). A classe I é representada pelos isolados com atividade subclínica (GASS & KOBAYASHI, 1969) que exibem característica atípica de tolerância a temperaturas mais baixas (CARUSO et al., 1987), baixa virulência (MEDOFF et al., 1987), e maior tamanho do genoma (STEELE et al., 1989; CARR & SHEARER, 1998). Os membros da classe II, incluem duas linhagens comumente usadas dentro dos modelos de virulência tal como G217B e G222B, são amplamente distribuídos através da América do Norte. Além disso, existe diversidade significativa em isolados da classe II encontrado em pacientes que pode refletir (mostrar) a distribuição no meio ambiente (KERSULYTE et al., 1992). Isolados da classe III tal como G184 (A e B) e G186 (A e B) encontrados principalmente na América Central e apresentam virulência intermediária.

Classes adicionais de RFLP (4, 5 e 6) também têm sido identificadas trazendo dentro de seu genótipo molecular dados para a análise da evolução do microrganismo. Estudos envolvendo parentesco filogenético das variedades, fronteiras geográficas e a análise da distância entre quatro genes codificantes de

proteínas (KASUGA et al., 1999) distinguiram seis classes de *H. capsulatum* (classe I da América do Norte; classe II da América do Norte, América Central, grupo A e B da América do Sul e *H. capsulatum* var. *duboisii*) nos quais os autores consideraram existirem seis espécies distintas de *Histoplasma* e consideraram a distinção em *H. capsulatum* var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii* e *H. capsulatum* var. *farciminosum* filogeneticamente pouco significativa e arbitrária (KASUGA et al., 2001). Recentemente, a partir da transcrição de regiões internas do DNAr, JIANG et al. (2000) também sugeriram que o *Histoplasma* apresenta uma grande variabilidade genética.

Mais recentemente KASUGA et al., 2003 analisaram as relações filogenéticas de 137 indivíduos das três variedades, vindos de 6 continentes diferentes, utilizando diferentes seqüências de DNA de 4 genes codificadores de proteínas independentes. Oito classes foram identificadas: (i) classe 1 da América do Norte; (ii) classe 2 da América do Norte; (iii) classe A da América Latina; (iv) classe B da América Latina; (v) classe da Austrália; (vi) classe da Holanda/Indonésia; (vii) classe da Europa e (viii) classe Africana. Sete das oito classes representaram geneticamente grupos de isolados que podiam ser reorganizados em espécies relacionadas filogeneticamente. A única exceção foi a classe da Europa que se agrupou com a classe A da América Latina. As relações filogenéticas entre as classes podem ser um marco filogenético. Dentro dessas oito classes foram encontrados indivíduos *H. capsulatum* var. *capsulatum*. A classe Africana incluiu todos os *H. capsulatum* var. *duboisii* tal como indivíduos das outras duas variedades. Os 13 indivíduos *H. capsulatum* var. *farciminosum* foram distribuídos entre três classes filogenéticas. Estes achados sugerem que o conhecimento das três variedades de *Histoplasma* se torna sem sentido se analisada filogeneticamente. Além disso porém, tem-se reconhecido a existência de populações geográficas ou espécies filogenéticas geneticamente distintas.

Diversas técnicas têm sido utilizadas para identificação de genes que são diferenciadores ou reguladores durante a infecção primária dos macrófagos. COLONNA-ROMANO et al. (1998) utilizaram ddRT-PCR (*PCR-based differential display of reverse transcription products*) para identificar diversos produtos de genes que são fortemente e preferencialmente expressados por leveduras

celulares durante sua infecção primária. Um dos genes identificados, p100, teve alta homologia para uma família de ativadores transcricionais, e podem funcionar como um regulador chave para influenciar gene de expressão do parasita no seu hospedeiros no ambiente (PORTA et al., 1999).

Genes expressados na fase leveduriforme parasitária do *H. capsulatum*, os quais são silenciosos na fase micelial, foram recentemente clonados e analisados. ABIDI & KEATH (1998) amplificaram por PCR com sondas marcadas, as presuntivas regiões reguladoras 5' de dois genes específicos (yps-3 e yps 21:E-9), para identificação do DNA nuclear ligado a proteínas, as quais podem influenciar na transcrição de genes fase-específicos, com o objetivo de promover um melhor entendimento da regulação molecular dos genes envolvidos na transição e manutenção da fase leveduriforme. As interações proteína-DNA foram avaliadas por análise de Western blot na qual proteínas extraídas das fases leveduriforme e micelial da linhagem virulenta G217B de *H. capsulatum* foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide*) e visualizadas pela capacidade de ligação ao sitio marcado 517-bp (G217B yps-3) ou 395-bp (G217B yps 21:E-9) da região funcional reguladora 5'. Uma única proteína nuclear 30-kDa (p30) extraída da fase micelial da linhagem G217B, altamente virulenta, porém ausente na fase leveduriforme de alguns organismos, foi identificada. Em linhagens de *H. capsulatum* com baixa virulência, sensíveis à temperaturas baixas, foi detectada carência da atividade da proteína p30 ligada tanto a fase micelial quanto a leveduriforme.

TIAN & SHEARER (2001) realizaram uma crítica caracterização da patogênese do *H. capsulatum* em particular no que diz respeito ao possível papel dos genes expressados especificamente na fase micelial. Para tal, os autores produziram uma biblioteca de DNAC e removeram seqüências específicas e comuns da fase leveduriforme utilizando enzimas de degradação de substrato. Após isso, investigaram uma seleção aleatória de clones identificados como fragmentos DNAC representando 16 diferentes genes reguladores positivos da fase micelial. Devido a múltiplos fragmentos de DNAC poderem ser tratados como alelos na investigação genética, os autores realizaram análise de probabilidade para estimar o número total de genes reguladores positivos da fase micelial. Foram estimados 27 genes

reguladores positivos dos 16 fragmentos de DNAC que tinham sido isolados. Nesse trabalho, os autores isolaram e analisaram, pela primeira vez, o DNAC de dois genes específicos da fase micelial: MS8 (*GenBank* AF292398) e MS88 (*GenBank* AF357882). O MS8 foi mais fortemente expressado na fase micelial, mas não detectado por *Northern blots* na fase leveduriforme. Estimou-se que a proteína funcional MS8 tinha 21.3 kDa (203aa), que era muito rica em glutamina e glicina. O MS88 transcrito foi expressado fracamente na fase micelial e não foi detectado na fase leveduriforme. Estimou-se que a proteína funcional MS88 tinha 22.5 kDa (219 aa). A busca de similaridade utilizando *GenBank* revelou que a proteína funcional MS8 foi similar a uma proteína rica em glutamina, de pouco entendimento funcional, de fungos *Colletotrichum gloeosporioides* (*GenBank* U94186). Não foram encontrados pontos significantes na proteína funcional MS88.

Além disso, TIAN & SHEARER (2002) acrescentaram que para a doença se manifestar, é necessário que ocorra uma mudança no fungo de sua fase micelial (infectante) para leveduriforme (parasitária). No entanto, existe a necessidade de maiores esclarecimentos a respeito dos genes específicos reguladores de tal dimorfismo, que podem, por exemplo, ser silenciados na fase leveduriforme. Para examinar tal hipótese, os autores analisaram múltiplas expressões e a inibição de genes específicos da fase leveduriforme do *Histoplasma*. O gene MS8 é fortemente expresso, produzindo a proteína de 21-kDa, extremamente rica em glicina e glutamina. A alteração da morfologia da levedura a 37°C ou da fase micelial a 25°C não alterou a vigorosa expressão do MS8, que apresenta um promotor chamado TEF1. A expressão do MS8 na levedura foi exibida fortemente em meio líquido denso e em forma de colônias pegajosas em placas de ágar. Mutantes onde o gene MS8 foi inibido formaram leveduras aparentemente normais a 37°C, mas originaram micélios aberrantes a 25°C. Colônias filamentosas, cujo gene MS8 foi inibido, foram mais espessas se comparadas com as normais, tinham superfície granular, produziam um pigmento vermelho escuro, e formavam hifas pequenas as quais foram 40% mais largas com um distinguível formato retorcido “zig-zag”. No entanto, embora a inibição do gene MS8 tenha resultado em efeitos expressivos no desenvolvimento da fase filamentosa, experimentos adicionais são requeridos para elucidar a contribuição

funcional de outros genes relacionados a esta expressão no dimorfismo e/ou na virulência (CARTER et al., 1997).

Marcas moleculares multialélicas tais como microsátélites e pequenas seqüências repetitivas têm sido aplicadas largamente para o estudo genético de populações de algumas espécies eucarióticas, mas suas aplicações para o estudo dos fungos têm sido relativamente limitados. Tais marcas são analisadas diretamente por PCR e podem ser detectadas até mesmo a partir de DNA extensamente degradado em patógenos ou organismos com dificuldade de cultivo e também com DNAs impuros sem que se precise eliminar o tecido dos hospedeiros. CARTER et al. (2001) em seu trabalho desenvolveu marcas multialélicas de genomas de *H. capsulatum* e *Aspergillus parasiticus* e mostrou que essas marcas podem ser usadas para distinguir isolados desses fungos. Além disso, os mesmos autores analisaram isolados de *H. capsulatum*, utilizando microsátélites, obtidos de espécimes clínicos dos Estados Unidos e América do Sul e observaram diferenças genéticas entre tais populações e linhagens oriundas da Índia e Alabama. Uma divisão de marcas foi observada entre os isolados da Índia e da classe I isolada do Missouri. Diferenças genéticas também, foram observadas entre populações da América do Norte e da Colômbia.

Ainda para a diferenciação deste microrganismo, grandes agrupamentos podem ser definidos utilizando-se hibridização com a sonda *yps3* (KEATH et al., 1989), com uma discriminação adicional aplicando-se a mesma sonda de *South Blots* para DNA mitocondrial (SPITZER et al., 1989).

Um melhor entendimento da identificação de isolados clínicos e do ambiente de *H. capsulatum* contribuirá no desenvolvimento de uma estimativa de fontes de infecção endógena *versus* exógena e auxiliará a descobrir curso da transmissão da infecção durante surtos da doença.

3.2.1 PCR/RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*

A reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polimerase Chain Reaction*) foi desenvolvida por Kary Mullis na década de 80, possibilitando a produção, *in vitro*, de múltiplas cópias de seqüências específicas de DNA, sem a necessidade de se

clonar estes segmentos (ALBERTS et al., 1994). A técnica de PCR consiste de uma reação de polimerização em cadeia para a amplificação de seqüências de DNA por uma reação enzimática *primer* dirigida (ERLICH, 1989). Sendo assim, a partir da PCR, pode-se obter *in vitro* um aumento da quantidade de uma determinada seqüência de DNA, representando assim um grande recurso para o estudo das seqüências de DNA *in vitro* e, conseqüentemente, uma série de aplicações nas mais diferentes áreas.

Esta técnica baseia-se na desnaturação do DNA genômico, submetendo-o a altas temperaturas, e deste modo, permitindo que as duas fitas simples originadas sejam duplicadas. Para que esta reação ocorra, é necessário um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples), utilizados como iniciadores (*primers*), que irão se hibridar às fitas simples do DNA em suas extremidades 3'OH. Estes *primers* são sintetizados artificialmente de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares a seqüências específicas que flanqueiam a região alvo. O passo decisivo para expansão da técnica de PCR ocorreu quando SAIKI et al. (1985) isolaram uma DNA polimerase (*Taq polimerase*) de uma bactéria (*Thermus aquaticus*) que vive em fontes térmicas, e cuja enzima polimeriza a 72°C, mantendo assim a atividade por algumas horas a 95°C. Isso possibilitou a completa automatização do processo de PCR (WATSON et al., 1992).

Um ciclo de PCR envolve três etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A fita dupla do DNA alvo é desnaturada a partir da elevação da temperatura para 92° a 95°C. Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida para 35°C a 60°C, dependendo essencialmente do tamanho e seqüência do *primer* utilizado, permitindo a hibridização de cada *primer* com as seqüências complementares que flanqueiam a região alvo. Em seguida a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase atinja seu ponto ótimo de atividade, e realize a extensão a partir de cada terminal 3' dos *primers*. Esta extensão envolve a adição dos quatro nucleotídeos (adenina, citosina, timina e guanina), utilizando como molde a seqüência alvo, de maneira que uma cópia desta seqüência é feita no processo. Este ciclo é repetido por algumas dezenas de vezes. Uma vez que a quantidade de DNA dobra a cada

ciclo, a amplificação segue uma progressão geométrica de maneira que, depois de “n” ciclos, são produzidas 2^n duplas fitas de DNA. Esta escala de amplificação permite, portanto, iniciar com quantidade mínima de DNA e terminar a reação com grandes quantidades de DNA de uma seqüência específica de interesse.

A PCR tem sido utilizada para amplificar seqüências do gene RNAr (BIALEK et al., 2002; BIALEK et al., 2001; BIELAK et al., 2000) do *Histoplasma* e tem sido introduzido como uma ferramenta auxiliar para o diagnóstico da infecção deste e outros fungos (HEBART et. al, 2000; PORTA et al., 1999). Ele pode ser utilizado como método eficaz de diagnóstico de *Histoplasma* quando existam dificuldades para a realização da cultura ou então quando o fungo não foi satisfatoriamente isolado (BIALEK et al., 2002; BIALEK et al., 2001).

HAYNES et al. (1995), propuseram a identificação e detecção de diversos fungos patogênicos de humanos utilizando PCR específica a partir de *primers* de seqüência de DNAr. Os produtos de seqüenciamento para cada fungo analisado eram bandas de tamanhos diferentes, possibilitando a padronização para cada espécie em questão.

CARTER et al., 1997 examinaram 30 isolados de *H. capsulatum* vindos de Indianópolis e oito oriundas da Colômbia ambos com 11 marcas bialélicas e três marcas multiploalélicas. Estas marcas do genoma de *H. capsulatum* foram amplificadas por PCR com *primers* específicos e os produtos da amplificação foram analisados baseando-se na presença ou ausência do determinado fragmento de restrição. Cada um dos 30 isolados de Indianópolis se mostrou diferente para essas marcas, enquanto que os oito isolados da Colômbia mostraram modelos idênticos para as 11 marcas bialélicas, mas diferentes modelos para as três marcas multialélicas.

A tecnologia de PCR tem gerado diversas classes de marcadores moleculares que podem ser aplicadas no estudo do DNA inteiro ou fragmentado. Todos os métodos utilizam *primers* que amplificam pontos específicos ou não do genoma de um determinado organismo. Uma das limitações da técnica PCR, é a necessidade do conhecimento prévio da seqüência que flanqueia o segmento a ser amplificado para que os nucleotídeos possam ser construídos (WATSON et al., 1992; ALBERTS et al., 1994). Para resolver este problema desenvolveu-se

uma técnica denominada, mais comumente, de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

Esta técnica foi descrita simultaneamente e independentemente no início da década de 90 por dois grupos de pesquisadores, WELSH & McCLELLAND, 1990, e WILLIAMS et al., 1990. No entanto, WILLIAMS et al., 1990, patentearam a tecnologia com o nome que se consagrou denominada de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* - Amplificação de DNA polimórfico ao acaso), descrevendo a técnica no contexto da análise Mendeliana, demonstrando a identificação de marcadores genéticos para mapeamento. WELSH & McCLELLAND, 1990, por sua vez propuseram a denominação mais apropriada para a técnica chamando-a de AP-PCR (*Arbitrary Primer Polymerase Chain Reaction* - Reação de polimerização em cadeia por *primers* arbitrários) (WELSH & McCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al., 1990), uma vez que os *primers* possuem seqüências arbitrárias, mas a amplificação tecnicamente não ocorre ao acaso, mas sim em lugares específicos do genoma. O experimento deste grupo gerou os perfis de amplificação genômicos simples e reproduzíveis para a identificação de linhagens, utilizando géis de eletroforese em poliacrilamida de maior poder de resolução juntamente com *primers* um pouco mais longos.

O RAPD ou AP-PCR é uma técnica que promove perfis de amplificação DNA bastante sensíveis e eficientes, capazes de distinguir diferenças entre linhagens da mesma espécie (BERG-DOUGLAS et al., 1994) e baseia-se na amplificação de segmentos do DNA, utilizando o mesmo princípio da PCR (SAIKI et al., 1985). A principal diferença entre a PCR usual e o RAPD está na reação de amplificação que utiliza apenas um único *primer*, com uma seqüência arbitrária de 10 a 15 bases. A amplificação somente ocorre se este *primer* arbitrário for complementar a um sítio em uma das fitas, e complementar a um mesmo sítio (com orientação invertida) na outra de DNA. Os fragmentos amplificados apresentam de 4 a 10kb, dependendo do limite máximo de amplificação da DNA polimerase empregada (WILLIAMS et al., 1990).

A análise RAPD tem sido utilizada para estudos de variabilidade genética em espécies de fungos filamentosos (WOODS et al., 1993; HAYDEN et al., 1994; GUTHRIE et al., 1992; VASCONCELOS et al., 1994; LIYANAGE et al., 1992;

GOODWIN & ANNIS, 1991; SCHÄFER & WOSTEMEYER, 1992; MANULIS et al., 1993). Esta técnica permite caracterizar e avaliar o grau de similaridade genética entre genótipos aos níveis inter e intraespecíficos, sendo altamente sensíveis a diferenças de até um único nucleotídeo entre o *primer* e o DNA molde. Permite ainda a obtenção de perfis de amplificação genômicos de indivíduos, variedades e populações; a análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais, populações de melhoramento e bancos de germoplasma; a construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica, a localização de genes de interesse econômico e médico, e ainda a obtenção de novos marcadores para diagnósticos via PCR (FUNGARO & VIEIRA, 1998; FUNGARO 2000).

Fenótipos moleculares, gerados por RAPD, podem servir para diagnosticar diferentes níveis taxonômicos. Considerando-se um determinado *primer*, os produtos de amplificação, via RAPD, podem ser classificados em dois grupos: variáveis (polimórficos) e constantes (não-polimórficos). Perfis de RAPD de representantes de vários gêneros podem conter bandas comuns a um ou outro gênero, enquanto outras bandas podem ser exclusivas. Caso várias espécies pertencentes a esse gênero sejam analisadas e uma das bandas exclusivas do gênero estiver presente em todas elas, pode-se concluir que esta banda é um marcador gênero-específico. Da mesma forma, quando se tem o perfil de RAPD de espécies de um mesmo gênero, algumas bandas poderão ser compartilhadas por algumas espécies, enquanto outras poderão ser exclusivas de uma dada espécie. Se vários indivíduos dessa espécie forem analisados e essa banda estiver presente em todos eles, pode-se concluir um marcador espécie-específico (FUNGARO & VIEIRA, 1998). Dessa forma, os marcadores de RAPD podem ser utilizados para diagnóstico molecular de diferentes níveis taxonômicos. Fragmentos polimórficos detectados entre indivíduos de uma população também podem ser utilizados para se determinar o que se chama de identidade clonal, o que normalmente é requerido em estudos envolvendo organismos de reprodução assexuada (marcadores clone-específicos).

Em *Histoplasma*, o RAPD vem sendo utilizado no estudo da variedade e na detecção de polimorfismo entre diferentes linhagens. A diversidade nos padrões de bandas de linhagens de *H. capsulatum* isolados de espécimens clínicos ou

solo de várias regiões da América tem sido descritas (KEATH et al., 1992; SPITZER et al., 1990) e estudos genotípicos tem tido um grande poder para diferenciar esses isolados.

Linhagens brasileiras de *H. capsulatum* procedentes do estado do Rio de Janeiro, isoladas de pacientes HIV+, imunocompetentes, do solo e de animais tiveram seus perfis de amplificação comparados, utilizando-se RAPD, por MUNIZ et al. (2001). Para tal, utilizaram sete isolados de animais infectados e 28 de humanos de diversas localidades do estado do Rio de Janeiro. Os resultados mostraram que linhagens do Rio de Janeiro se distinguiram de linhagens isoladas dos Estados Unidos, incluídas neste trabalho, mostrando menos de 70% de similaridade para cada um dos quatro *primers* utilizados. O polimorfismo genético entre as linhagens isoladas de animais e solo obtidos da mesma área geográfica teve 100% de similaridade sugerindo que micro-habitats no meio ambiente podem agir como fonte de infecção para animais e população humana local.

REYES MONTES et al. (1999) analisaram o perfil eletroforético da histoplasmina em poliacrilamida e modelo de RAPD de isolados de *H. capsulatum* de pacientes com SIDA associada a histoplasmose, no México. Linhagens procedentes de pacientes e ambientes isolados da Guatemala, Colômbia e Panamá, foram também analisados. Todas as amostras de histoplasmina foram divididas em quatro porções antigênicas de 200, 49, 10.5 e 8.5 kDA em eletroforese de poliacrilamida. Concordando com estas percentagens, baseadas na SDS-PAGE (*análise da imagem eletroforética da histoplasmina*), os isolados foram divididos em dois grupos: o grupo A de todos os isolados estudados associados a SIDA e duas linhagens referência de humanos isolados de pacientes com SIDA do México, e grupo B que incluiu linhagens isoladas de guano de morcegos, de morcegos infectados e de excretas de aves do estado de Guerrero, México; mais três linhagens de humanos com histoplasmose vindos da Guatemala, Panamá e Colômbia. O modelo de DNA a partir de RAPD-PCR mostrou três bandas dominantes de 4.4, 3.2 e 2.3 kb no estudo dos isolados. Quatro grupos de DNA polimórficos foram relatados: grupo I foi formado pela maioria dos *H. capsulatum* associados a SIDA, uma linhagem humana da Colômbia, duas linhagens referência de pacientes do México com SIDA e uma

linhagem de histoplasmose humana da Guatemala. O grupo II foi formado apenas por uma linhagem do Panamá. O grupo III incluiu três linhagens: uma do México de pacientes com SIDA e dois isolados da natureza no estado de Guerrero (de guano de morcego e excretas de aves). Finalmente, o grupo IV, consistiu em somente uma linhagem isolada de um morcego infectado capturado em Guerrero. Em ambas as análises foram usadas ferramentas para tipagem de *H. capsulatum* de diferentes origens e regiões geográficas e foi observada uma relação bem estreita entre as características fenotípicas e genotípicas.

Isolados clínicos de *H. capsulatum* têm sido localizados dentro de várias classes diferentes usando RFLP, mas, em geral, não têm sido distinguidos mais adiante disso. KERSULYTE et al. (1992) utilizaram o método de perfis de amplificação de RAPD, para distinguir isolados dentro das classes de RFLP. Os autores concluíram que cada um dos 29 isolados de RFLP da classe 2, o grupo endêmico do meio oeste da América, apresentou diferença no padrão de bandas de RAPD quando pelo menos 3 *primers* foram avaliados. Desta forma, os isolados clínicos de *H. capsulatum* foram bastante diversos, mas seus genomas permanecem estáveis durante a cultura de laboratório. Além disso, demonstraram que existe uma associação entre o genótipo e as diversas áreas geográficas em diferentes países e que linhagens da América do Sul tem uma maior diversidade entre si do que os encontrados nos Estados Unidos (VINCENT et al., 1986; KERSULYTE et al., 1992; CARTER et al., 1997).

PERROTTA et al. (2001) determinaram a relação genética entre os isolados de *H. capsulatum* de pacientes argentinos HIV+ e de isolados de outras regiões geográficas. Para tal analisou-se o padrão de bandas obtidas por RAPD de 26 isolados: 11 isolados clínicos da Argentina (oito infectados por HIV com SIDA e três não infectados), 09 de Buenos Aires e 02 da Província do Chaco, 02 linhagens do CDC, duas linhagens do México e 01 do Uruguai. Baseado no padrão de bandas obtido foi possível construir um dendrograma o qual apresentou três grupos principais. O grupo I continha os dois isolados Mexicanos. O grupo II apenas uma linhagem do CDC de origem desconhecida e no grupo III os 13 outros isolados segregados em quatro subgrupos. O subgrupo IIIa incluía dois isolados de Buenos Aires isolados de pacientes com e sem SIDA. Neste

estudo pode se observar que existe uma relação entre os genótipos e sua origem geográfica e que provavelmente também haja uma relação genotípica entre a condição imunológica do paciente com SIDA e a capacidade de infecção da linhagem.

TAYLOR et al. (2000) pesquisaram o polimorfismo genético de 13 linhagens de *H. capsulatum* isolados de morcegos contaminados, capturados aleatoriamente nos estados de Morelos, Puebla e Oaxaca no México, utilizando-se o método RAPD-PCR. Para amplificação por PCR utilizando-se os seguintes *primers*: 5'-AACGCGCAAC-3' e 5'-GCGATCCCCA-3'. Para cada uma das diferentes regiões foi revelado um modelo de DNA polimórfico comum para os isolados de *H. capsulatum*. Este modelo foi compartilhado por sete linhagens de *H. capsulatum* isolados de diferentes espécies de morcegos não migratórios (*Artibeus hirsutus*) capturados de uma caverna de Morelos, de cinco linhagens isoladas de morcegos migratórios infectados capturados em Morelos e Puebla (*Leptonycteris nivalis*) e uma linhagem isolada de outro morcego migratório capturado em Oaxaca. De acordo com o trabalho, foi sugerido que este modelo de DNA polimórfico representaria marcas do fungo originário de cada região geográfica estudada, considerando esta distribuição nos três diferentes estados da República Mexicana, a função dos morcegos como responsáveis pela distribuição do *H. capsulatum* na natureza, as suas atividades e migrações entre seus habitats. A análise do DNA de *H. capsulatum* isolados de morcegos infectados, de casos clínicos, e de excretas de aves, tem mostrado uma maior relação entres os isolados de morcegos e isolados clínicos, em contraste daqueles isolados de excretas de aves.

POONWAN et al. (1998), estudaram 13 linhagens de *H. capsulatum* isolados de pacientes da Tailândia com SIDA. Para a análise do RAPD foram utilizados três diferentes *primers* e esta mostrou que o modelo de DNA dos isolados de Thai são muito similares e homogêneos, com somente uma linhagem diferente, embora os modelos fossem claramente diferentes das linhagens referência da América do Norte, para todos os *primers* testados. Apesar da diferença no padrão de banda ser menor, os isolados de Thai poderiam ser classificados de dois para quatro grupos. Uma banda de PCR (por volta de

700pb) comum para todos os *H. capsulatum* foi extraída e a seqüência de seu DNA determinada. Um novo conjunto de *primer* para a identificação da espécie de *H. capsulatum* foi desenvolvido baseado na informação que tais *primers* foram 100% bem sucedidos na identificação de linhagem referência tão bem como em todos os isolados de Thai. Neste trabalho, também foram discutidos os resultados dos testes de especificidade do conjunto de *primers* para identificação de *H. capsulatum*.

KARIMI et al. (2002) compararam parâmetros clínicos e demográficos entre pacientes com SIDA associada a histoplasmose no Brasil e nos Estados Unidos. Os isolados brasileiros foram caracterizados por meios de análise de RFLP e o perfil de amplificação de seus DNAs por RAPD-PCR. Lesões na pele ocorreram em 66% dos pacientes brasileiros, comparado com 1-7% dos pacientes norte-americanos. Dos 21 pacientes, quatro morreram (19%), uma razão similar aos pacientes norte-americanos (5-13%). Em relação à tipagem do DNA nuclear, os isolados brasileiros foram igualmente divididos entre classes 5 e 6 da América do Sul, e o RAPD-PCR mostrou 18 perfis de amplificação genéticos diferentes para os 20 isolados. Lesões de pele foram mais comuns nas infecções dos organismos das classes 5 e 6 do que da classe 2 de *H. capsulatum*.

3.2.2 PCR/Seqüências ITS - *Internal Transcribed Spacer*

Por sua vez, o DNA ribossômico (DNAr), contido nas regiões organizadoras do nucléolo (NOR), tem sido objetivo de um grande número de estudos, com diversas aplicações na genética, evolução e melhoramento, podendo ser utilizado para uma ampla faixa de níveis taxonômicos. Tal interesse está diretamente relacionado a estrutura destas regiões, que se encontram em locais específicos do genoma e repetidos em seqüência inúmeras vezes. Pelo fato de o DNAr ser caracteristicamente repetitivo, uma propriedade que permite uma série de aplicações, e por estar situado em regiões específicas do genoma, a proporção de DNAr é, em geral, alta em relação ao conteúdo total de DNA da espécie (WHITE et al., 1990; FERREIRA, 2001).

Em geral, as regiões 28S, 18S, e 5,8S das unidades de repetição, não apresentam variações de seqüência, enquanto que as regiões internas que são

transcritas conhecidas como ITS (*Internal Transcribed Spacer*), variam enormemente. As seqüências codificantes do DNAr evoluem muito lentamente e são altamente conservadas, possibilitando a sua utilização em estudos com organismos pouco relacionados taxonomicamente, enquanto que as regiões espaçadoras internas destes genes (ITS), evoluem rapidamente, apresentando alto polimorfismo, e sendo assim, de grande interesse nos estudos filogenéticos de gêneros, espécies e populações (WHITE et al., 1990; FERREIRA, 2001).

Esta característica permite, a sua utilização na obtenção de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) nos locos de DNAr por meio do uso de enzimas de restrição. O número de cópias de uma determinada seqüência de DNAr, e variações de nucleotídeos nestas seqüências, também têm sido utilizadas em tais estudos. Os dados gerados através destas técnicas têm sido utilizados para estudos de filogenia e evolução, bem como para caracterização e análise de diversidade genética (FERREIRA, 1994).

A similaridade entre a paracoccidiodomicose e a blastomicose sugere que existe uma estreita relação entre os dois agentes etiológicos. Onde o agente da primeira doença é exclusivo de áreas endêmicas da América Latina e o da segunda doença é endêmico na América do Norte e África. Em viajantes sintomáticos visitando ambas as áreas endêmicas, é difícil diferenciar as doenças e acredita-se que a terapia e prognóstico para estas duas tenham diferenças significantes. Com o objetivo de identificar diferenças no gene 18S RNAr (DNAr) para uso como ferramenta de diagnóstico molecular, os autores sequenciaram este gene de cinco isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* e compararam com seqüências conhecidas de outros fungos. Para a análise filogenética foram utilizados Neighbor-Joining, Máxima parcimônia e Máxima probabilidade e finalmente, o teste Kishino-Hasegawa que revelou que o *P. brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis*, e *Emmonsia parva* são mais estritamente relacionados do que o *Histoplasma capsulatum* e *B. dermatitidis*, cuja forma teleomórfica pertence ao mesmo gênero *Ajellomyces*. De acordo com outros trabalhos que usaram seqüências de regiões ITS e subunidades grandes do DNAr, dados de suas próprias subunidades pequenas mostraram que os fungos dimórficos *P. brasiliensis* devem ser agrupados dentro da ordem Onygenales e são

estritamente relacionados com membros da família Onygenaceae. Existem sugestões na análise filogenética molecular que a família Onygenaceae pode ser mais ampla podendo ser dividida dentro de duas famílias. O subgrupo que inclui *P. brasiliensis* constituído por todas as espécies atogênicas. As diferenças dentro da 18S DNAr parecem ser também pequenas para permitir a identificação de espécies dos membros de família Onygenaceae patogênica de humanos usando seqüências alvo dentro desse gene (BIELEK et al., 2000).

LARENA et al. (1999), analisando seqüências depositadas no *GenBank*, desenvolveram um *primer*, chamado de ITS4A, com alta especificidade para Ascomicetos. Utilizando-se este *primer* e o *primer* universal para fungos superiores (ITS1F), foi possível amplificar a região (ITS1-5,8S-ITS2 do DNAr), em apenas amostras de fungos Ascomicetos, resultando em um fragmento de 600 a 800pb. Este trabalho demonstra uma estratégia rápida e confiável na discriminação de Ascomicetos dos demais grupos taxonômicos (Basidiomicetos, deuteromicetos, Zygomycetos e Mastigomicetos).

JIANG et al. (2000) em seu trabalho tipificaram 24 isolados *H. capsulatum* por meio de variações nas seqüências nucleotídicas das regiões (ITS1-5,8S-ITS2) do RNAr. A região ITS1 do ITS é a região 1 localizada entre o 18S e o 5.8S de RNAr e ITS2 ficam localizadas entre o 5.8S do RNAr e o 26S do RNAr. O resultado desta análise indicou que as seqüências ITS1 dos diferentes isolados não são idênticas. Foram encontradas variações em 20 dos 496 nucleotídios que foram seqüenciados. Dez diferentes modelos de seqüência, designados de tipo A ao H, foram observados quando as seqüências dos isolados foram alinhadas. Doze isolados oriundos de Indianópolis foram classificados dentro de quatro diferentes tipos. Dois isolados de New York fizeram parte do tipo G. Três isolados de diferentes cidades foram para o tipo F. Os seis isolados restantes isolados foram de diferentes tipos.

A habilidade de detecção de *H. capsulatum* de amostras do solo tem sido limitada por falta de velocidade, segurança e métodos caros. O método de PCR foi desenvolvido para permitir a detecção direta do *H. capsulatum* do solo. Um protocolo de PCR de dois estágios foi seguido empregando-se dois *primers* específicos para fungo e um conjunto de *primers* específicos para região ITS e

5.8S DNAr do *H. capsulatum*. O limite estimado de detecção deste método é de dez esporos. E contraste para o mais caro e indireto inóculo em ratos, que requer de seis a oito semanas por amostra analisada, a análise de solo contaminado com *H. capsulatum* por PCR pode ser completada em menos de dois dias (REID & SCHAFFER, 1999).

O número de casos de histoplasmose vem crescendo na Ásia. Com o objetivo de estudar a estrutura e patogenicidade do agente etiológico dessa enfermidade, TAMURA et al. (2002), realizaram análise da seqüência de DNA da região ITS com o objetivo de entender a epidemiologia e evolução do *H. capsulatum*. Duas linhagens de *H. capsulatum* var. *capsulatum* foram isoladas no Japão: uma proveniente de um paciente com SIDA da província do Thai e outra de um paciente imunocompetente originário da China. No estudo, foi investigada a relação filogenética entre os dois isolados e linhagens referência *H. capsulatum* originárias de outras populações geográficas. A análise por RAPD das duas linhagens de *H. capsulatum* mostrou que elas tinham modelos de bandas similares aqueles das linhagens referência oriundas da província do Thai e América do Norte, embora tais modelos fossem pouco diferentes. A filogenia de trinta isolados de *H. capsulatum* das três variedades geograficamente diferentes, foi avaliada utilizando-se seqüências de nucleotídeos da região (ITS1-5.8S-ITS2 do DNAr). As regiões ITS apresentavam informações suficientes para demonstrar o parentesco filogenético entre os isolados. Foi construído o dendrograma das seqüências ITS que mostrou que trinta linhagens de *H. capsulatum* poderiam ser classificadas dentro de oito classes de acordo com a região geográfica: tipo Ásia (i), tipos América do Sul A(ii) e B(iii), tipos América do Norte 1(iv) e 2(v), *H. capsulatum* var. *duboisii* tipo A(vi) e B(vii) e tipo leste da Ásia(viii). Baseado na análise das regiões ITS, as duas linhagens isoladas de pacientes do Thai e China no Japão se mostraram diferentes do tipo Ásia (i) nos quais oito isolados do Thai, um da China, um da Inglaterra e um da Indonésia foram incluídos. Algumas extensões de DNA polimórfico foram observadas entre os isolados tipo América 1 e as linhagens do Thai e China isoladas no Japão. Dessa forma acreditou-se que os isolados do Thai e China foram únicos e formaram uma nova classe, a tipo Leste da Ásia (viii) para as duas linhagens. Os mesmos autores realizaram uma análise por RAPD de dois isolados clínicos do Japão, um do Thai (isolado IFM

49109) e outro da China com SIDA (isolado IFM 49110). Esta análise mostrou que eles tinham modelos de banda similares a linhagem referência da Ásia, mas seus modelos eram claramente diferentes aos modelos de bandas de duas linhagens referência da América do Norte. Nesta pesquisa, os autores utilizaram, ainda, polimorfismo de DNA das regiões ETS (*external transcribed spacer region*) e ITS (*Internal transcribed spacer region*) para o estudo da estrutura das populações de *H. capsulatum* e para deduzir a origem das duas linhagens isoladas no Japão. Um dendrograma das regiões ITS de 27 isolados de regiões geográficas diferentes, das variedades *H. capsulatum* var. *duboisii* e *H. capsulatum* var. *capsulatum* mostrou que os 27 isolados poderiam ser classificados em 6 classes: tipo Ásia, tipo América do Sul A e B, tipo América do Norte 1 e 2 e tipo *H. capsulatum* var. *duboisii*. Os dois isolados japoneses IFM49109 e IFM49110 foram incluídos geneticamente no tipo América do Norte 1, porém diferentes. Os autores julgaram que os dois isolados japoneses foram únicos e dessa forma criaram um novo grupo tipo Leste da Ásia. O dendrograma construído a partir da análise de uma parte da região ETS também mostrou que os dois isolados japoneses eram geneticamente únicos entre os isolados de diferentes regiões geográficas. A análise das seqüências de DNA das regiões ITS e ETS sugeriu que a distancia entre os micro habitats pode vir a determinar proximidade da estrutura genética das populações de *H. capsulatum* de regiões geográficas diferentes.

SANO et al. (2001) realizaram biópsia de pele de dois cães, um de Tóquio e outro de Kumamoto, que não tinham história de viagem para fora do Japão, e encontraram elementos fúngicos de 1-2 ou 2-4 micrômetros de diâmetro no interior de macrófagos. Além disso, realizaram comparação da região ITS do DNAr e estas tiveram uma razão de homologia de mais de 97.4% com a seqüência correspondente de *Ajellomyces capsulatus* sendo diagnosticada a infecção por *H. capsulatum*. Como a infecção não foi trazida de uma área endêmica e os animais podem ter sido infectados domesticamente, acredita-se o *H. capsulatum* está presente no seu próprio país de origem. Os exames epidemiológicos em cães com histoplasmose podem ser capazes de estimar casos humanos oriundos do próprio Japão.

UEDA et al. (2003) verificaram que lesões de histoplasmose em cães no Japão diferem daquelas de cachorros da América do Norte. Cães afetados no Japão tinham apresentado múltiplas lesões granulomatosas ou a pele do focinho ou gengivas ulceradas e não tinham lesões pulmonares ou gastrointestinais. Neste trabalho, os autores fizeram uso da PCR para o diagnóstico e estudo das características da histoplasmose canina no Japão. Para tal foram avaliadas amostras de pele ulcerada removidas cirurgicamente de uma fêmea nativa de Shiba-inu com cinco anos de idade que havia migrado para o Japão. As amostras de pele tinham algumas leveduras no interior dos macrófagos. O DNA das amostras foi extraído e a técnica de PCR aplicada. Foi detectado por seqüenciamento de regiões ITS do DNA que esta tinha 99.7% de homologia com *Ajellomyces capsulatus* (o teleomórfico do *H. capsulatum*). Histórias de manifestações clínicas anteriores de linfagites em eqüinos no Japão, e um caso autóctone de histoplasmose farciminosi em humanos indicaram que este cão deve ter sido infectado com *H. capsulatum* var. *farciminosum*.

Segundo SANO & MIYAJI (2003) a histoplasmose é classificada de acordo com a variedade do agente causal. A histoplasmose farciminosi conhecida como Pseudofarcy é manifestada somente em eqüinos onde invade os nódulos e ductos linfáticos, e é isolado de cavalos. Historicamente, o Japão foi uma área endêmica de histoplasmose farciminosi antes da II Guerra Mundial e mais de 20.000 casos foram notificados em cavalos usados por militares. Interessantemente, cachorros japoneses com histoplasmose mostram úlceras na pele e lesões granulomatosas uniformemente, mas sem envolvimento pulmonar ou gastrointestinal, ambos muito similares a pseudofarcy. Neste trabalho, foi identificado *H. capsulatum* var. *farciminosum*, por meio de seqüenciamento de regiões ITS do DNA, em um paciente humano sem histórico de viagem para fora do país nem imigração. Estes fatos indicam que a pseudofarcy não é apenas uma doença infecciosa de cavalos, mas uma zoonose fúngica. Histoplasmose canina no Japão pode ser uma manifestação diferente de pseudofarcy porque se assemelha há casos de humanos, em relação manifestações clínicas e história regressa do doente.

Emmonsia crescens, um agente da adiaspiromicose, *Blastomyces dermatitidis*, o agente da blastomicose, e *H. capsulatum*, o agente da histoplasmose,

são conhecidos em seu estágio meiótico (sexual) no gênero *ascomycete Ajellomyces* (família *Onygenaceae*, ordem *Onygenales*) e sua fase não sexual conhecida como *E. parva*. Para avaliar as relações entre membros do gênero *Ajellomyces* foi utilizado seqüenciamento de regiões ITS de DNAr. Tais regiões foram determinadas por amplificação de fragmentos de DNA (PCR) e analisadas filogeneticamente para avaliar as variações genéticas dentro do gênero *Emmonsia*. A partir de tal estudo, verificou-se que *E. crescens* e *E. parva* são espécies diferentes e que isolados de *E. crescens* estão localizados dentro de dois grupos correlacionados com seus continentes de origem. Consideráveis variações ocorreram entre isolados previsivelmente classificados como *E. parva*. Alguns isolados, incluindo alguns oriundos de pacientes humanos, são filogeneticamente distintos e representam uma espécie não descrita. *B. dermatitidis* é espécie irmã de *E. parva*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *H. capsulatum* são ancestrais de isolados de *Emmonsia* (PETERSON & SIGLER, 1998).

KASUGA et al. (1999) realizou um estudo filogenético no qual utilizaram 46 linhagens de *H. capsulatum* de diferentes procedências geográficas e que incluía representantes das três variedades do fungo. Para tal utilizou a seqüência parcial de DNA de 4 genes e os resultados foram similares aos já citados. Este foi o único trabalho no qual uma linhagem de *H. capsulatum* proveniente do sul da Argentina se agrupou com um proveniente da Colômbia e com um *H. capsulatum* var. *farciminosum* proveniente da Índia e Egito.

LECLERC et al. (1994) estudaram a filogenia de dermatófitos e fungos dimórficos utilizando a subunidade grande do RNAr (25S rRNA). Seqüências de 595 nucleotídeos alinhados, cobrindo os dois mais divergentes domínios D1 e D2, permitiram uma comparação de relações filogenéticas de diferentes níveis. As espécies dimórficas (da família *Onygenaceae*) foram separadas significativamente dos dermatófitos (*Arthrodermataceae*) e de um terceiro grupo incluindo geofílicos e espécies patogênicas muito leves (*Onygenaceae* e *Gymnoascaceae*). No nível de espécie, a variedade *H. capsulatum* var. *duboisii* e *H. capsulatum* var. *farciminosum* confirmaram a relação com *H. capsulatum*. Os fungos dimórficos *Emmonsia parva*, ao contrário de uma forma parasita completamente diferente (em forma de esporos ao invés de células leveduriformes) fizeram um grupo compacto com *Blastomyces*

dermatitidis o qual teve uma forma perfeita similar ao *H. capsulatum*. A partir de seus dados, teleomórficos de *E. parva*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *H. farciminosum*, três fungos dimórficos conhecidos somente em seu estado anamórfico, pertenceriam a família Onygenaceae e ao gênero *Ajellomyces*. Entre os Arthrodermataceae, e família contendo espécies mais queratinofílicas, não foi possível estabelecer uma hierarquia de espécies clara. Somente *Ctenomyces serratus*, a espécie adaptada para degradar queratina de espécies semelhantes, *Trichophyton ajelloi* e *Trichophyton terrestre*, foram significativamente separados. A especiação de dermatófitos verdadeiros resultou mais provavelmente de uma evolução recente de adaptação parasitária. Entre as espécies usadas como grupos externos, os dois patógenos emergentes *Pseudallescheria boydii* (*Scedosporium apiospermum*) e *Scedosporium prolificans* (*Scedosporium inflatum*) se mostraram em dois grupos distintos.

Além dessas aplicações, foram desenvolvidas sondas específicas para oligonucleotídeos com o objetivo de identificar rapidamente fungos dimórficos patogênicos, *in situ*. Foram utilizados os *primers* universais para fungos ITS1 e ITS4, específicos para as regiões conservadas do DNAr, para amplificar DNA de *H. capsulatum*. Tais sondas hibridizam apenas DNA de fungos dimórficos e podem ser usadas como critério diferencial de eliminação no diagnóstico de linhagens patogênicas.

Sendo assim, os dados de seqüenciamento desse gene DNAr com interação dos diferentes métodos moleculares, possibilitam a reconstrução da filogenia e conseqüentemente um melhor entendimento dos fatores essenciais os quais levaram a biodiversidade deste grupo, além de nortear estudos taxonômicos. A calibração com outros métodos pode facilitar o estabelecimento de entidades população, variedades, gêneros e espécies.

3.2.3 Análise da Variabilidade Genética

Vários são os métodos utilizados para se analisar a variabilidade genética em microrganismos, incluindo-se os fenéticos e os filogenéticos. Os métodos fenéticos consideram apenas aspectos desprovidos de bases biológicas estabelecendo relações de similaridade entre táxons, com a finalidade de obter

uma classificação. Tais métodos utilizam distâncias métricas e são úteis para resumir informações sobre variação de frequências gênicas entre populações. Os métodos filogenéticos utilizam distâncias evolutivas que são formuladas para estimarem quantias de significado evolutivo, sendo essas quantias variáveis conforme a medida de distância escolhida (MEYER, 1995).

Dentre os métodos fenéticos, a análise de “Agrupamento” (UPGMA – *Unweighted PairGroup Method with Arithmetic Average*) é um modelo de agrupamento hierárquico cuja análise da variabilidade genética é realizada pelos agrupamentos das linhagens segundo os princípios adotados em taxonomia numérica. Tal método infere árvores a partir de matrizes de distância e agrupam sucessivamente pares de táxons de acordo com o nível de similaridade permitindo a construção de dendrogramas. O algoritmo opera de forma que o par de táxons mais semelhantes é unido, após isso o par de táxons recém unidos passa a ser considerado um novo táxon e esse procedimento é repetido até que todos os táxons tenham sido incorporados ao dendrograma. Para tal análise pode-se utilizar o coeficiente de similaridade de Jaccard. Tal coeficiente vem sendo utilizado largamente para análise de marcadores RAPD por desconsiderar as concordâncias negativas, as quais em RAPD podem ser decorrentes de falhas de amplificação. Além disso, tal coeficiente permite calcular similaridades com base em variáveis binárias (zero para ausência e uma para presença de bandas) empregando-se o cálculo segundo a fórmula $J = M / P$, onde M é o número de concordâncias positivas e P o número total de variáveis, menos as concordâncias negativas, sendo J a frequência de determinado agrupamento no conjunto dos dendrogramas resultantes das repetições *bootstrap* (SNEATH & SOKAL, 1973; MEYER, 1995).

O método de Máxima Parcimônia, proposto por MICHENER & SOKAL (1957), trata-se de um método filogenético e pode ser definido como aquela hipótese filogenética que apresenta o menor número de passos, cada passo sendo definido como uma mudança de caráter, como o aparecimento e desaparecimento de bandas. Trata-se, portanto, de um método de otimização. Sua metodologia baseia-se no agrupamento de unidades taxonômicas por meio de caracteres derivados, pois à medida que as características surgem em

ancestrais, elas são herdadas pelos seus descendentes. Tal método é aplicável somente para conjuntos de dados que descrevem “estado de caráter”, como a presença ou ausência de uma estrutura ou ainda a identidade de um nucleotídeo em uma seqüência de DNA. Esta situação difere daquela associada a dados comumente analisados por métodos de distâncias genéticas, que partem de frequências gênicas, pois não contempla a informação referente á frequência de genes (MEYER, 1995). Como resultado, a Máxima Parcimônia fornece árvores ultramétricas nas quais os ramos que partem de um mesmo nó apresentam necessariamente os mesmos comprimentos indicando a ocorrência de taxas de evolução constantes.

MrBayes trata-se de um programa para estimação filogenética Bayesiana que é uma análise filogenética que se baseia na “probabilidade posterior” para distribuição de suas árvores, isto é, a probabilidade de uma árvore condicionada a observações anteriores (JOHN HUELSENBECK & FREDRIK RONQUIST, 2005). O condicionamento é acompanhado do uso do teorema de Bayes. A distribuição das árvores a partir da probabilidade posterior é impossível de se calcular analiticamente; ao invés disso, MrBayes usa uma técnica de simulação chamada MCMC (*Markov chain Monte Carlo*) para estimar a probabilidade posterior das árvores e resultando em árvores não ultramétricas, cujo comprimento dos ramos representam a quantidade de diferenciação evolutiva para cada indivíduo. O programa toma como entrada uma matriz de caracteres dentro do formato NEXUS. Na saída, são produzidos vários arquivos, alguns dos quais com os parâmetros que foram testados do algoritmo MCMC (<http://morphbank.ebc.uu.se/mrbayes/>).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Foram utilizadas linhagens referência de *H. capsulatum* var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii* e *Exophiala jeanselmei* e isolados de *H. capsulatum* provenientes de pacientes com histoplasmose (Tabelas 1 e 2).

TABELA 1 - NOMENCLATURA, ORIGEM E PROCEDÊNCIA DAS LINHAGENS-REFERÊNCIA

CÓDIGO	LINHAGEM	ORIGEM	PROCEDÊNCIA
(1) Golnara ^(a)	<i>H. capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – FioCruz	Rio de Janeiro
(36) ^(b)	<i>H. capsulatum</i> var. <i>duboisii</i>	Universidade Federal do Paraná	Paraná
(37) ^(b)	<i>Exophiala jeanselmei</i>	Universidade federal do Paraná	Paraná

Linhagens gentilmente cedidas pelos pesquisadores: ^(a) Dra. Rosely M. Zancopé-Oliveira – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – FioCruz, Rio de Janeiro/RJ; ^(b) Dr. Flávio Queiroz Telles – Hospital de Clínicas – Curitiba/PR.

TABELA 2 - CÓDIGO, QUADRO CLÍNICO, MATERIAL UTILIZADO PARA O ISOLAMENTO E PROCEDÊNCIA DOS ISOLADOS DE *H. capsulatum*

CÓDIGO	ISOLADO	QUADRO CLÍNICO	ISOLAMENTO	ORIGEM
(2) ^(a)	190 R	Tuberculose/Imunocompetente		Curitiba – Pr
(3) ^(a)	Hca 20	Pancitopenia/Imunocompetente	Biopsia de Medula óssea	Curitiba – Pr
(4) ^(a)	Hca 23	UTI pediátrica-DVE/Imunocompetente	Líquor	Curitiba – Pr
(5) ^(a)	Hca 24	Neuroinfecção/Imunocompetente	Líquor	Curitiba – Pr
(6) ^(a)	Hca25 I	Febre – HIV +	Medula	Curitiba – Pr
(7) ^(a)	Hca25 II	Febre – HIV +	Sangue	Curitiba – Pr
(8) ^(d)	Hc 19	HIV +	Pústula de mão	Ubatuba - SP
(9) ^(d)	Hc 20	HIV +	Biópsia de medula óssea	Ubatuba - SP

-segue-

-continuação-

CÓDIGO	ISOLADO	QUADRO CLÍNICO	ISOLAMENTO	ORIGEM
(10) (d)	Hc 21	Imunocompetente	Biópsia de pele	Ubatuba – SP
(11) ^(e)	Hc 49	HIV +	Lavado brônquico	Rio de Janeiro
(12) ^(b)	Hc 55	HIV +	Medula	Espírito Santo
(13) ^(b)	Hc 56	HIV +	Medula	Espírito Santo
(14) ^(b)	Hc 59	HIV +	Medula	Espírito Santo
(15) ^(b)	Hc 61	HIV +	Medula	Espírito Santo
(16) ^(b)	Hc 62	HIV +	Medula	Espírito Santo
(17) ^(e)	Hc 197	Imunocompetente	desconhecido	Rio de Janeiro
(18) ^(e)	Hc 212	Meningite/ Imunocompetente	Líquor	Rio de Janeiro
(19) ^(b)	Hc 249	HIV +	Medula óssea	Espírito Santo
(20) ^(b)	Hc 250	Imunocompetente	Pulmão	Espírito Santo
(21) ^(e)	Hc 268	Meningite/Imunocompetente	Líquor	Rio de Janeiro
(22) ^(e)	Hc 340	HIV +	Líquor	Rio de Janeiro
(23) ^(e)	Hc 361	Lesão nos glúteos/Imunocompetente	Raspado de Lesão	Rio de Janeiro
(24) ^(e)	Hc 406	Paraparesia/Imunocompetente	Líquor	Rio de Janeiro
(25) ^(e)	Hc 584	HIV +	sangue	Rio de Janeiro
(26) ^(e)	Hc 712	HIV +	Pneumopatia	Rio de Janeiro
(27) ^(c)	Hc 713	Imunocompetente	Biópsia de duodeno	Ribeirão Preto – SP
(28) ^(c)	Hc 774	Imunocompetente	Pulmão	Ribeirão Preto – SP
(29) ^(c)	Hc 890	HIV +	Lesão de palato	Ribeirão Preto – SP
(30) ^(e)	6406	Imunocompetente	desconhecido	Rio de Janeiro
(31) ^(b)	Hc D.P.	Imunocompetente	desconhecido	Espírito Santo
(32) ^(d)	HcEPM	Imunocompetente	Pulmão	Ubatuba - SP
(33) ^(b)	Hc Alex	Imunocompetente	Pulmão	Espírito Santo
(34) ^(e)	Chesc	Imunocompetente	desconhecido	Rio de Janeiro
(35) ^(b)	Hc R.P.	Imunocompetente	desconhecido	Espírito Santo

Isolados gentilmente cedidos pelos pesquisadores: ^(a) Dr. Flávio Queiroz Telles – Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR.; ^(b) Dr. Gercyr Baptista – UFES (Universidade Federal do Espírito Santo), Espírito Santo; ^(c) Dra. Claudia Maffei – Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto, São Paulo; ^(d) Dra. Olga F. Gompertz – Universidade Federal de São Paulo (Escola Paulista de Medicina), São Paulo; ^(e) Dra. Rosely M. Zancopé-Oliveira – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – FioCruz, RJ.

4.2 MEIOS DE CULTURA

4.2.1 Meio Batata-Glicose-Ágar (BDA)

Infusão de batata.....200g/L

Glicose.....20g/L

Ágar.....15g/L

pH: 5,6

A batata foi descascada, picada e fervida durante 10 minutos. Em seguida o caldo foi filtrado acrescentando-se, a ele, a glicose e o ágar.

4.2.2 Meio Ágar-BHI (RIBEIRO e SOARES, 2002)

Infusão de coração.....250g

Infusão de cérebro.....200g

Peptona.....10g

Dextrose.....2g

Cloreto de sódio.....5g

Fosfato de sódio.....2,5g

Água destilada.....1.000mL

pH: 7,2 - 7,4

4.2.3 Meio Ágar-Fubá

Fubá.....20,0g

Ágar.....10,0g

Tween 80.....5,0mL

Água destilada.....500mL

pH: 6,6 - 6,8

O fubá foi adicionado em 250mL de água destilada, misturando-se até ferver. Em seguida procedeu-se a filtragem em gaze dobrada e o volume foi

completado para 250mL de água quente. O pH foi acertado e adicionou-se o Tween 80 e o ágar dissolvido nos 250 mL de água destilada restante.

4.2.4 Meio Ágar Sabouraud – pH: 7,0

Glicose	40g
Peptona caseína.....	10g
Gelose (Ágar).....	15g
Água destilada.....	1000mL

4.2.5 Meio Ágar Sabouraud com Ciclohexamida e Cloranfenicol (*Mycosef*[®])

Dextrose.....	20g
Peptona.....	10g
Ágar.....	20g
Ciclohexamida.....	500mg
Cloranfenicol.....	50mg
Água destilada.....	1000mL

O meio foi esterilizado e resfriado até 60°C, acrescentando em seguida os antibióticos, previamente dissolvidos e esterilizados em filtro “*Millipore*”. A ciclohexamida foi dissolvida em 10 mL de acetona e o Cloranfenicol em 10mL de álcool a 95°C.

4.2.6 Meio ML-Gema

Müeller-Hinton Broth (MHB).....	2,1g
Ágar.....	1,0g
Dextrose.....	2,0g
L-cisteína (sol. a 1%).....	0,5mL
Gema de ovo.....	15mL
Água destilada.....	100mL
PH: 7,0 - 7,2	

O preparo do meio procedeu-se misturando-se MHB, o ágar e a dextrose em água destilada. O meio foi esterilizado e após a resfriação até 50°C, adicionou-se a ovo e a L-cisteína.

Para o preparo das gemas, o ovo foi deixado submerso em água e sabão por dez minutos e após foi submerso em álcool 70% por mais dez minutos. As claras foram separadas e as gemas depositadas em proveta esterilizada até o volume de 15mL. Em seguida, as gemas foram adicionadas ao meio.

4.3 SOLUÇÕES E REAGENTES

4.3.1 Corante Azul de Algodão (CRUZ, 1981)

Ácido Lático.....	20,0g
Cristais de fenol.....	20,0g
Glicerina.....	20,0g
Azul de algodão (Methyl Blue Difco).....	0,05g
Água destilada.....	p/ 20,0mL

Os cristais de fenol foram dissolvidos em banho-maria, e os reagentes posteriormente adicionados. Após 24 horas a solução foi filtrada e estocada a temperatura ambiente.

4.3.2 dNTP

Os quatro desoxorribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) estoques (100mM) e armazenados a -20°C, foram diluídos em água ultrapura a 5mM (solução de uso).

4.3.3 EDTA 0,5M

EDTA.....	37,22g
Água ultrapura.....	p/100mL

pH: 8,0

O EDTA foi pesado e acrescentou-se uma parte da água ultrapura autoclavada (aproximadamente 80% - 800ml). Ajustou-se o pH com NaOH em *pellet* (aproximadamente 20g) e NaOH (4N). Para obtenção de EDTA 50mM, diluiu-se esta solução dez vezes. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

4.3.4 Gel de Agarose (0,8%)

Agarose.....	0,8g
Tampão TEB 1x.....	100mL

4.3.5 Gel de Agarose (1,6%)

Agarose.....	1,6g
Tampão TEB 1x.....	100mL

4.3.6 Iniciadores – *Primers*

Os *primers* foram diluídos em tampão TE (solução 4mM) usando o peso molecular do *primer* individual dado pelo fornecedor. Os *primers* diluídos foram mantidos a -20°C.

4.3.7 Solução de Brometo de Etídio (SAMBROOK, FRITSCH, MANIATIS; 1989)

Foram dissolvidos 1,0% (p/v) de brometo de etídio em água destilada, agitando-se por várias horas. A solução foi e então estocada á temperatura ambiente. Para revelação, foram diluídos 3µL para 100mL de água destilada.

4.3.8 Solução de L-cisteína a 1%

L-cisteína.....	1g
Água deionizada.....	100mL

A solução de aminoácidos 1% foi preparada e esterilizada por filtração em membrana a 0,22µ e estocada em frascos de vidro âmbar esterilizados.

4.3.9 Solução EDTA + 1% N-Laurilsarcosinato de Sódio (NaEDTA)

EDTA pH 8,0	50mM
N-Laurilsarcosinato de Sódio.....	1% (p/v)

4.3.10 Solução Salina 0,85% (p/v)

NaCl.....	8,5g
H ₂ O destilada.....	1000mL

4.3.11 Tampão da Amostra

Sacarose.....	40,0g
Azul de bromofenol.....	0,25g
Água destilada.....	100mL

Os ingredientes foram solubilizados e mantidos a 4°C.

4.3.12 Tampão CTAB

Tris-base.....	2,42g
Cloreto de sódio.....	8,2g
Na-EDTA.....	0,74g
CTAB.....	2g
Água ultrapura.....	80mL

pH: 7,5

A solução foi aquecida para que o Na-EDTA e o CTAB fossem dissolvidos e o volume completado para 100ml com água ultrapura autoclavada.

4.3.13 Tampão de corrida para gel de agarose (TEB 10 x) - pH 8,0

Tris-base.....	54g
Ácido bórico.....	27,5g
EDTA 0,5M.....	20mL
Água ultrapura.....	p/ 500mL

4.3.14 Tampão Tris-EDTA (TE)

Tris - HCl (pH: 8,0).....	20mM
EDTA.....	20mM

4.4 PREPARO DO MATERIAL - ESTERILIZAÇÃO

Os meios de cultura e soluções foram esterilizados em autoclave, à pressão de 1 atmosfera, por 20 minutos. Vidrarias em forno de Pasteur, a 180°C, por quatro horas. Frascos, ponteiras e tubos tipo “*ependorf*” foram autoclavados à pressão de 1 atmosfera, por 15 minutos e os procedimentos diferenciados foram especificados em cada item. Todo material contaminado foi autoclavado antes do descarte.

4.5 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS

A identificação baseou-se na morfologia das colônias após o crescimento em Ágar Sabouraud e em meio Batata-glicose-ágar (BDA) na temperatura de 25°C, com repiques trimestrais e na reversibilidade dessas a 37°C em meio ML-Gema, meio Ágar-fubá e meio BHI. Como critério adicional para a identificação foi utilizada microscopia ótica para visualização dos isolados cultivados á temperatura ambiente (25°C) e a temperatura corpórea (37°C).

As observações macroscópicas foram realizadas em colônias com 15 dias de crescimento e a análise em microscopia ótica foi realizada utilizando-se lâminas confeccionadas a partir de microcultivos com 20 dias, utilizando-se o corante Azul de algodão. As linhagens foram analisadas quanto ao tipo de esporulação *in vitro*, as estruturas de reprodução, e a presença ou ausência de microconídios e macroconídios. A confirmação da identificação dos isolados foi gentilmente realizada pelo Laboratório de Micologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

4.6 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA

4.6.1 Extração de DNA Total

A extração de DNA total foi realizada utilizando-se colônias miceliais jovens (dez dias), para que fosse garantida a qualidade do DNA extraído, cultivadas em meio sólido (meio BDA), nas condições adequadas para cada isolado e incubadas em estufa a 25°C. Em seguida, coletou-se aproximadamente 1 cm² de micélio das culturas separadamente, evitando trazer parte do ágar, transferiu-se para tubos tipo “eppendorf” contendo 300µL de tampão CTAB e uma mistura de sílica em pó (sílica gel Merk / celite 2:1). O material foi macerado manualmente utilizando-se bastões de vidro por aproximadamente 15 minutos, até que fosse obtida uma massa cremosa e homogênea. Acrescentou-se 200µL de tampão CTAB agitando em um agitador magnético e incubou-se em banho-maria por 10 minutos à 65°C. Em seguida adicionou-se 500µL de clorofórmio obtendo-se duas fases, as quais foram misturadas cuidadosamente. Realizou-se, então, a centrifugação por 7 minutos a 12000 rpm e 15°C. O sobrenadante foi transferido para outro eppendorf, dois volumes de etanol 96% gelado foram acrescentados e a precipitação do DNA, realizada a -20°C “*overnight*”. Após a precipitação de DNA, foi procedida a centrifugação por 7 minutos a 12000 rpm e 15°C. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e o “*pellet*” lavado com 500µL de etanol 70%, submetido, novamente, a centrifugação durante 7 minutos a 12000 rpm e 15°C e os tubos vertidos até a secagem completa do precipitado à temperatura ambiente. Após isso, o DNA foi ressuspenso em 100µL de água ultrapura esterilizada e o DNA concentrado acondicionado no congelador.

4.6.2 Quantificação do DNA Total

A integridade do DNA extraído foi verificada em gel de agarose 0.8%, corado com brometo de etídio, utilizando-se 7µL de DNA para 3µL de tampão da amostra. Após a quantificação do DNA, esses foram diluídos de acordo com a necessidade do uso.

4.6.3 RAPD

4.6.3.1 Amplificação do DNA/RAPD

Para a amplificação do DNA foram utilizados seis *primers* (Tabela 3) e empregadas condições experimentais, previamente testadas para cada amostra, utilizando uma mistura contendo, além da amostra de DNA, os seguintes elementos: 1,5 unidades da enzima Taq DNA polimerase; 5 mM de cada dNTP; 3,0 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂); 0,4µM de *primer*; 20 mM de Tris-HCL pH 8,4; 5mM KCl e 10ng de DNA por 15µL de reação. Foi utilizado um controle negativo, sem DNA, para cada *primer* testado, utilizando 40 ciclos com um minuto a 92°C, um minuto e 30 segundos a 37°C e dois minutos a 72°C. Os ciclos foram precedidos de uma desnaturação inicial de quatro minutos a 92°C seguidos de uma extensão final de três minutos a 72°C.

TABELA 3 - SEQÜÊNCIA DOS *PRIMERS* UTILIZADOS NO RAPD (Invitrogen®)

PRIMER	KIT	SEQÜÊNCIA 3'→ 5'
9	OPA	ggg TAA CgC C
10	OPA	gTg ATC gCA g
13	OPA	CAG CAC CCA C
14	OPX	ACA ggT CCT g
16	OPA	AgC CAg CgA A
17	OPX	gAC ACg ACC

Fonte: Operon Technologies®

4.6.3.2 Análise de polimorfismo obtido por RAPD

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,6% (TBE 1X), com 20 cm de largura, 30 cm de comprimento e 0.8 cm de espessura, por aproximadamente três horas e 30 minutos, utilizando voltagem de 115V. O gel foi corado por 15 minutos com brometo de etídio, evidenciado e fotografado sob luz UV. Foi utilizado marcador de peso molecular ladder de 100pb.

Os dados de RAPD foram analisados feneticamente por meio do método de “Agrupamento” (UPGMA) utilizando coeficiente de similaridade de Jaccard

(MEYER, 1995). As matrizes e dendrogramas foram elaborados com o auxílio do programa NTSYS (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) (ROHLF, 2000) e consistência dos agrupamentos foram verificados pela análise *bootstrap*, descrito por FELSENSTEIN (1986), utilizando o *Software BOOD* (COELHO, 2005) e filogeneticamente por meio do método de Máxima Parcimônia, utilizando o programa *PAUP*4.0b10* (SWOFFORD, 1998).

No método UPGMA, as bandas foram consideradas como variáveis enquanto as linhagens como unidades. Foram utilizadas 10.000 amostragens com reposição dos dados dos marcadores. Apenas os agrupamentos que apresentaram P maior ou igual a 70% foram considerados consistentes. Para verificar estatisticamente a confiabilidade dos grupos formados pelos isolados, foi realizada uma AMOVA, utilizando o programa ARLEQUIM 2000 (SCHNEIDER et al., 2000).

4.6.4 Seqüenciamento da Região ITS1-5,8S-ITS2 do DNAr

4.6.4.1 PCR – Ribotipagem (Reação para Obtenção do Amplicon)

A PCR foi realizada utilizando-se os *primers* específicos V9G e LS266 (Tabela 4), universais para fungos, que amplificam um amplicon que incluiu a região ITS1-5,8S-ITS2 do DNAr. Foi utilizada uma reação de PCR com volume de 50µl contendo 10 mM tris-HCl, pH 8,3; 50mM KCl; 1,5 mM MgCl₂ 6H₂O; 200mM de cada desoxinucleotídeos trifosfatado; 50pmol de cada *primer*, 10-100ng de DNA total e 0,5U de taq DNA polimerase (*Invitrogen*[®]). Foram utilizados 30 ciclos (30 segundos de desnaturação a 94°C; 60 segundos de anelamento a 55°C; 60 segundos de síntese a 72°C), precedidos de 2 minutos para a desnaturação inicial a 92°C e 5 minutos de extensão final a 72°C.

Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose 1,6% (8µL para 2µL de corante), utilizando marcador de peso molecular “*Ladder*” 200pb. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit de purificação de bandas e DNA (GTX PCR DNA, “Pharmacia”).

4.6.4.2 Reação de Seqüenciamento

Foram utilizados 4 μ L de *mix bigdye terminator* (“Terminator Ready Reaction Mix” da “Perkin-Elmer Applied Biosystem”), 1 μ L (30 ng) de produto de PCR purificado (item 4.6.4.1), 1 μ L dos *primers* (25ng/ μ L) ITS1 e ITS4 (Tabela 4) e 8 μ L água ultrapura para completar 10 μ L, para cada reação. Foram utilizados 35 ciclos (30 segundos à 94°C, 60 segundos à 48°C e 6 minutos a 60°C) precedidos de uma desnaturação inicial de 60 segundos a 94°C.

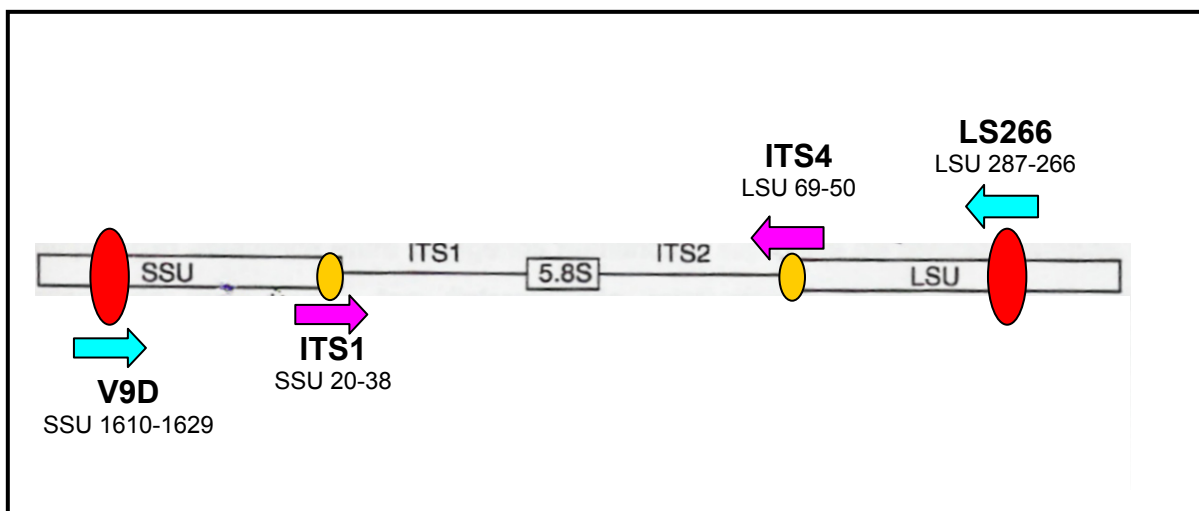
TABELA 4 - SEQÜÊNCIAS E POSIÇÕES ESPECÍFICAS DOS *PRIMERS* PARA A AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS1-5.8S-ITS2 DO DNAr

PRIMER	SEQÜÊNCIA 3'→ 5'	POSIÇÃO*	REFERÊNCIAS
ITS1	TCC gTA ggT gAA CCT gCg g	SSU1768-1787	WHITE et al.(1990)
ITS4	TCC TCC gCT TAT TgA TAT gC	LSU 69-50	WHITE et al.(1990)
V9D	TTA AgT CCC TgC CCT TTg TA	SSU 1610-1629	HOOG & GERRITS VAN DEN ENDE (1998)
LS266	gCA TTC CCA AAC AAC TCg ACT C	LSU 287-266	MASCLAUX et al.(1995)

* A posição do *primer* é relativa à *Saccharomyces cerevisiae*.

Na Figura 5, pode-se observar a posição dos *primers* dentro das subunidades maior e menor do DNAr e a representação esquemática do provável ponto de inserção dos fragmentos seqüenciados apresentados no anexo.

FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS SÍTIOS ESPECÍFICOS DE LIGAÇÃO DOS *PRIMERS* ITS1, ITS2, V9D E LS266 E SUAS LOCALIZAÇÕES DENTRO DO DNAr



Adaptação: HOOG & GERRITS VAN DEN ENDE (1998)

4.6.4.3 Precipitação e Seqüenciamento do DNA

Foram adicionados ao produto do seqüenciamento 1 μ L de acetato de amônio (AcNH₄) 7,5M, 10 μ L de água ultrapura e 65 μ L de etanol 96%. Após a homogeneização a mistura foi incubada por cinco minutos à temperatura ambiente. Procedeu-se então a centrifugação por 20 minutos a 14000 rpm e descartou-se o sobrenadante. Os *pellets* resultantes foram lavados com etanol 70%. Em seguida, foi realizada uma nova centrifugação por 15 minutos a 14000 rpm e procedeu-se a secagem a vácuo, no escuro. Após este tratamento, o seqüenciamento das amostras foi realizado em seqüenciador automático ABI 377.

4.6.4.4 Alinhamento das seqüências e construção da árvore filogenética

As seqüências obtidas foram alinhadas utilizando-se o programa CLUSTALW e posteriormente editadas manualmente utilizando-se programa BIOEDIT (HALL, 2005). Após o alinhamento e edição das seqüências contendo tais regiões, os nucleotídeos dessas foram comparados com o banco de dados de seqüências *GenBank* (NHI, 2004 ; Anexo 3) utilizando a ferramenta BLASTr-r. A construção das árvores filogenéticas enraizadas e de consenso foram realizados

utilizando-se os programas DNAPARS (*DNA-Parsimony Program*) e CONSENSE (*Consensus tree program*) versão 3.573c (1986-1993). Além desses, foi realizada uma análise Bayesiana utilizando o programa MrBayes (SWOFFORD, 1998), com quatro cadeias de Markov, taxa de amostragem de 1000 árvores, 20.000.000 gerações e Burnin de 100 árvores.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

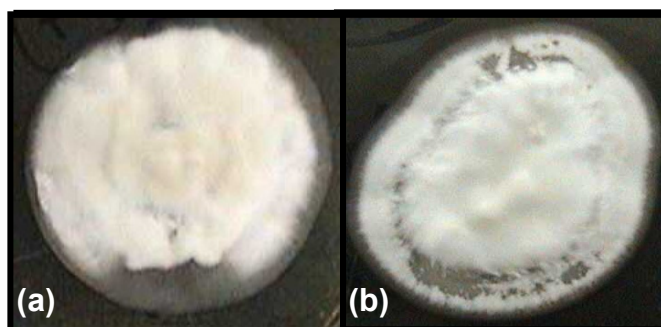
5.1 CULTIVO DOS ISOLADOS DE *H. capsulatum* E TESTE DE REVERSIBILIDADE

Por se tratar de um fungo dimórfico, a confirmação da identificação dos isolados foi realizada, inicialmente, a partir do teste de reversibilidade, método clássico utilizado na caracterização, *in vitro*, baseado na micromorfologia e macromorfologia de colônias cultivadas a 25°C e 37°C.

Baseando-se nesse método, os isolados identificados como *H. capsulatum* e a linhagem de *H. capsulatum* var. *duboisii*, em sua forma micelial, foram repicados e cultivados a temperatura ambiente e a temperatura de 37°C com o objetivo de verificar capacidade de desenvolvimento e reversibilidade, confirmando, dessa forma, a identificação.

Macroscopicamente, de acordo com o proposto nos trabalhos de PERROTTA et al., 2001; KERSULYTE et al., 1992; RIPPON, 1990; KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; TIAN & SHEARER, 2002, quando cultivados a 25°C por 15 dias, os isolados de *H. capsulatum* deste estudo e da linhagem de *H. capsulatum* var. *duboisii* (Figura 7b), se mostraram indistinguíveis em sua fase micelial (Figura 6), apresentando desenvolvimento filamentososo, com crescimento de culturas brancas, algodonosas, de desenvolvimento lento, com micélios aéreos, que tenderam a escurecer com o tempo, mostrando características morfológicas muito semelhantes.

FIGURA 6 - MACROSCOPIA DO ISOLADO DE *H. capsulatum* E LINHAGEM REFERÊNCIA DE *H. capsulatum* var. *duboisii*



Colônia isolada em ágar Souraud: (a) *H. capsulatum* var. *capsulatum* - fase micelial; (b) *H. capsulatum* var. *duboisii* - fase micelial.

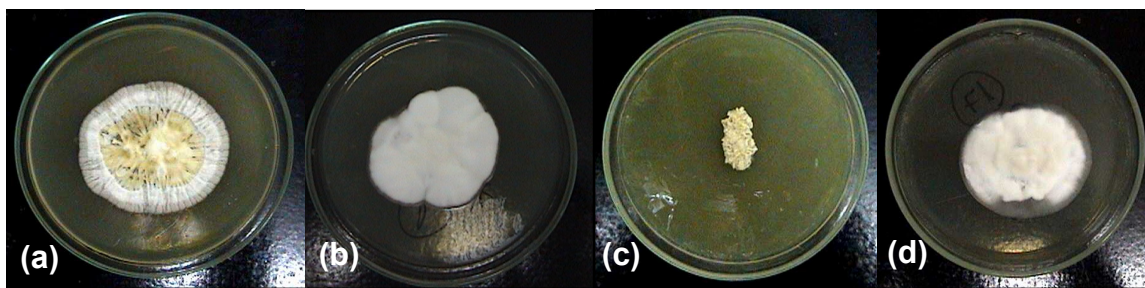
Quando cultivados a 37°C, grande parte dos isolados de *H. capsulatum* e a linhagem de *H. capsulatum* var. *duboisii*, não foram capazes de reverter a fase leveduriforme, mesmo em meios altamente enriquecidos (Figura 7a). Apenas os isolados descritos na Tabela 5, como exemplo o isolado 4 (Figuras 7b e 7c), demonstraram características dimórficas padrões da espécie, revertendo-se a 37°C como colônias leveduriformes, cremosas, úmidas, brilhantes e lisas, num período de 15 a 30 dias após a inoculação no meio (Figura 7a), assim como descrito por LIMA et al., 2001; HAMILTON, 1998; PERROTTA et al., 2001; KERSULYTE et al., 1992; RIPPON, 1990; POONWAN et al., 1995; WHEAT, 2001; SILVA-VERGARA et al., 2001; WOODS, 2002; WOODS et al., 2002; TIAN & SHEARER, 2002. No entanto, o isolado 2 (Figura 7d) se comportou de forma diferente, pois mesmo sendo um isolado primário, após sua reversão para fase micelial não foi mais capaz de se desenvolver como uma cultura leveduriforme.

Neste trabalho, não foi possível comprovar os relatos de PERROTTA et al., 2001; KERSULYTE et al., 1992; RIPPON, 1990; KWON-CHUNG & BENNETT, 1992 e TIAN & SHEARER, 2002 os quais propuseram que quando cultivados a 37°C, em meios de cultura enriquecidos ou quando em tecidos animais, o *H. capsulatum* var. *duboisii* pode ser encontrado como elemento leveduriforme, de forma ovalada, maior e de parede mais espessa do que o *H. capsulatum* var. *capsulatum*, medindo de 10 a 15µm, pois a linhagem de *H. capsulatum* var. *duboisii* não foi capaz de reverter a 37°C.

TABELA 5 - ISOLADOS QUE REALIZARAM CONIDIOGÊNESE A 25°C E REVERTERAM A 37°C

CÓDIGO	CONIDIOGÊNESE A 25°C	REVERSÃO A 37°C	INÍCIO DA REVERSÃO
3	Abundante	Total	16 dias
4	Abundante	Total	10 dias
5	Abundante	Total	12 dias
6	Abundante	Total	14 dias
7	Abundante	Total	15 dias
16	Em pequeno número	Parcial	20 dias
24	Em pequeno número	Parcial	22 dias
25	Em pequeno número	Parcial	18 dias
35	Em pequeno número	Parcial	25 dias

FIGURA 7 - DIFERENTES PADRÕES DE DESENVOLVIMENTO ENCONTRADOS ENTRE ISOLADOS DE *H. capsulatum*, QUANDO CULTIVADOS SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA

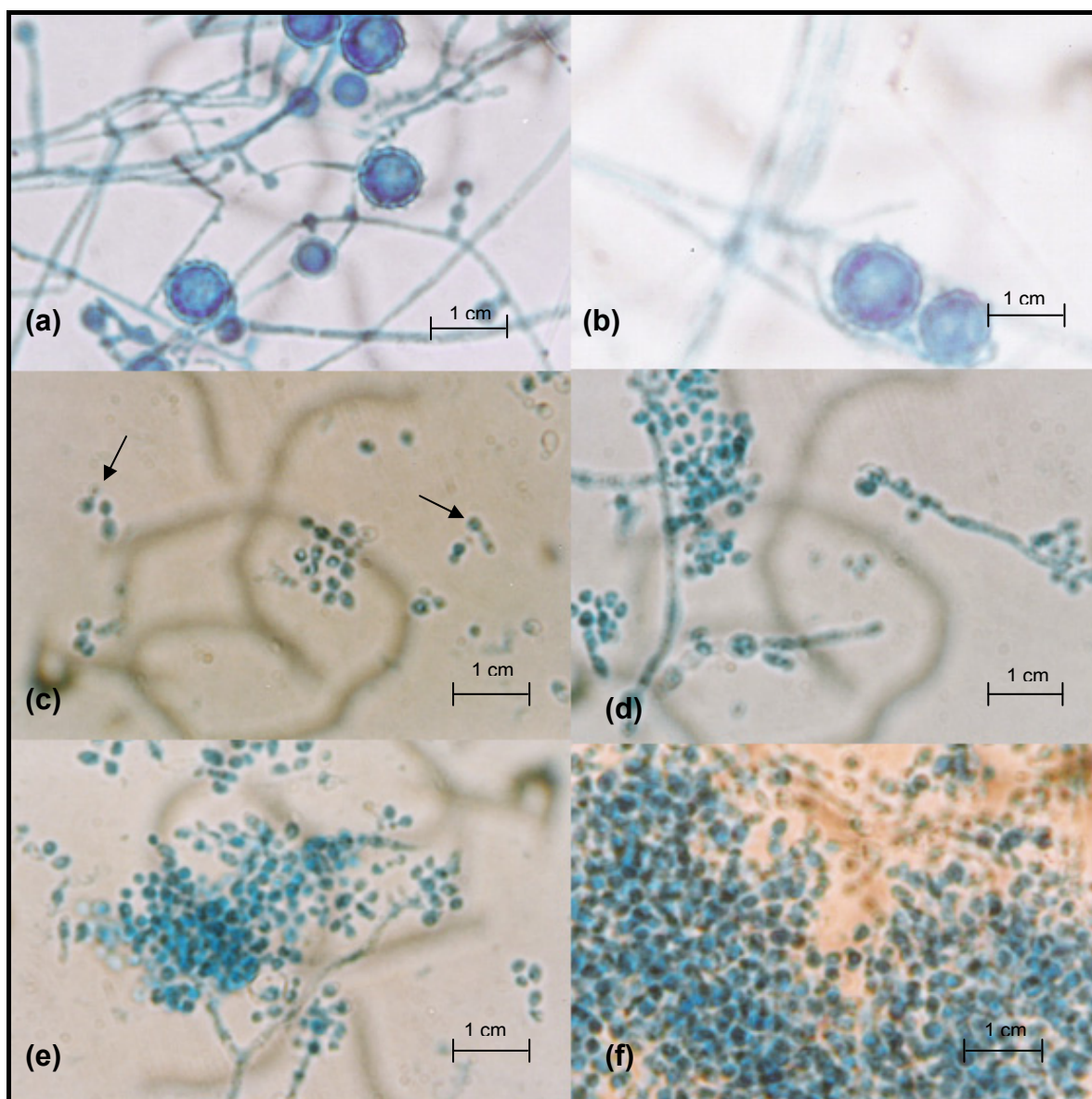


Colônias isoladas em ágar Sabouraud – (a) isolado 21 cultivado a 25°C e 37°C; (b) isolado 4 cultivado a 25°C; (c) isolado 4 cultivado a 37°C; (d) isolado 2 cultivado a 25°C e 37°C.

Na análise microscópica das colônias isoladas a temperatura ambiente, em microscópio ótico, pode-se observar o desenvolvimento de hifas hialinas, delicadas, ramificadas, septadas, sendo que apenas os isolados primários cultivados previamente em meios enriquecidos, foram capazes de desenvolver conidiogênese (Tabela 5), produzindo microconídios lisos e equinulados e macronídios tuberculados (Figuras 8a, 8b).

Quando a 37°C, da mesma forma que ocorreu na conidiogênese, também os isolados primários cultivados, previamente em meios enriquecidos, foram capazes de reverter num período de trinta dias, podendo ser encontrados, no decorrer desse tempo, em uma fase intermediária entre mecélio e levedura (Figuras 8c, 8d). Após isso, assim como foi descrito por KERN (1988); DRUTZ (1988); DRUTZ (1989); RIPPON (1989); SAROSI (1986); SZANISZLO (1985); ARMBRUSTER et al. (1996); BELLMAN et al. (1997); BODILY et al. (1996); DEODHARE & SAPP (1997); HAJJEH (1995); KILBY et al. (1998); RAZA et al. (1996); SULLIVAN et al. (1998), WHEAT (1994); WHEAT (2001); SILVA-VERGARA et al. (2001); KLITE & DIERCKS (1965), tais colônias mostraram-se, microscopicamente, como pequenas células leveduriformes, algumas com brotamentos, característica que raramente pode ser observada nos tecidos (Figuras 8e, 8f).

FIGURA 8 - MICROMORFOLOGIA DO ISOLADO 4 COM CONIDIOGÊNESE CARACTERÍSTICA DE *H. capsulatum*



Colônias isoladas em agar BHI: (a, b) conidiogênese de micélio a 25°C; (c, d, e) fase intermediária, leveduras com brotamento (indicadas pelas setas) e presença de hifas; (f) fase leveduriforme cultivada a 37°C. Coloração: Lactofenol Azul (M.O. 100X)

Tais resultados vieram de encontro com os relatos de HAMILTON (1998), PERROTTA et al. (2001), KERSULYTE et al. (1992), RIPPON (1990), POONWAN et al. (1998), AJELLO (1960), HALL et al. (1995), WHEAT (2001), SILVA-VERGARA et al. (2001), WOODS (2002), LIMA et al. (2001), WOODS et al. (2002), TIAN & SHEARER (2002), os quais concluíram que o tempo e os meios utilizados para o cultivo afetam a conidiogênese e a capacidade de reversão do *H. capsulatum*.

Dessa forma, a confirmação da identificação dos isolados foi diretamente influenciada, visto que o aspecto da conidiogênese e a capacidade de reversão são utilizados como critério de diferenciação do *H. capsulatum*, nas chaves de classificação, utilizando os métodos tradicionais.

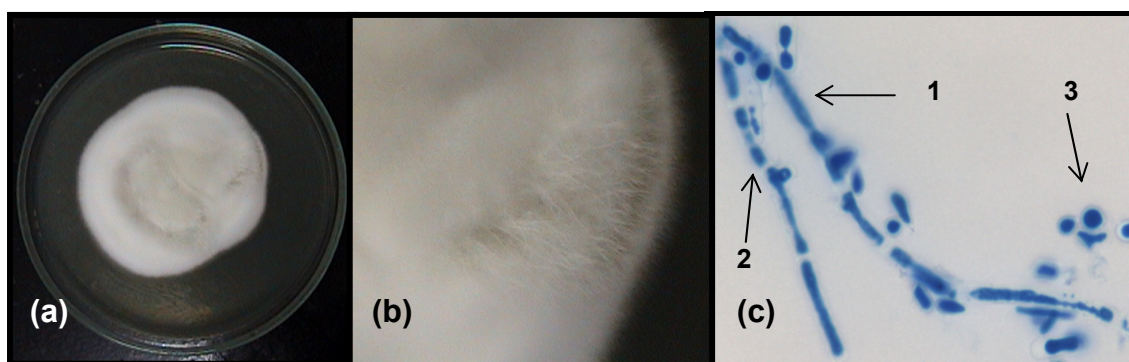
A dificuldade de reversão e da conidiogênese, tanto das colônias de *H. capsulatum* quanto de *H. capsulatum* var. *duboisii*, provavelmente ocorreu devido a dificuldade de cultivo própria da espécie, pelos métodos utilizados, e por se tratarem de linhagens já cultivadas por um longo período, afetando diretamente sua morfologia, conidiogênese e habilidade de dimorfismo (HAMILTON, 1998; PERROTTA et al., 2001; KERSULYTE et al., 1992; RIPPON, 1990; POONWAN et al., 1998; AJELLO, 1960; HALL et al., 1995; WHEAT, 2001; SILVA-VERGARA et al., 2001; WOODS, 2002; LIMA et al., 2001; WOODS et al., 2002; TIAN & SHEARER, 2002). As colônias que reverteram totalmente ou parcialmente da fase micelial para a leveduriforme e vice-versa se tratavam de culturas primárias isoladas recentemente de pacientes, motivo pelo qual ainda foram capazes de expressar seu dimorfismo *in vitro*.

Tal como foi descrito por HAMILTON (1998); PERROTTA et al. (2001); KERSULYTE et al. (1992); RIPPON (1990); POONWAN et al. (1998); AJELLO (1960); HALL et al. (1995); WHEAT (2001); SILVA-VERGARA et al. (2001); WOODS (2002); LIMA et al. (2001); WOODS et al. (2002); TIAN & SHEARER (2002) os meios de cultura utilizados tiveram grande influência no desenvolvimento das colônias, sendo de fundamental importância no processo de reversibilidade e conidiogênese. Quando em temperatura ambiente, os isolados foram cultivados em ágar batata e Sabouraud por se tratarem de meios pobres estimulando, dessa forma, a conidiogênese frente a uma condição de *stress*. No entanto, quando cultivados a 37°C, confirmando os estudos de LIMA et al. (2001), TIAN & SHEARER (2001) BATANGHARI et al. (1998), PATEL et al. (1998), TIMMERMAN & WOODS (2001), a reversão aconteceu apenas em um pequeno número de amostras quando estas foram cultivadas em meios de cultura enriquecidos, neste caso, meio BHI para o cultivo em placa de *Petri*, e Ágar-fubá, para confecção de microcultivo das leveduras. Tal exigência pode ser explicada baseando-se na literatura já existente (MAGRINI & GOLDMAN, 2001; WOODS, 2002; TIAN & SHEARER, 2002; TIAN &

SHEARER, 2001) que revelam o possível envolvimento do dimorfismo com a patogênese do *H. capsulatum* (TIAN & SHEARER, 2002) (EISSENBERG et al., 1988; WOLF et al., 1987; SCHNUR & NEWMAN, 1990; EISSENBERG & GOLDMAN, 1991; EISSENBERG et al., 1993) em particular no que diz respeito ao provável papel de genes reguladores fase-específicos (TIAN & SHEARER, 2001) cuja expressão e repressão são diretamente dependentes da presença de metabólicos essenciais, incluindo cálcio (BATANGHARI et al., 1998; PATEL et al., 1998) e ferro (TIMMERMAN & WOODS, 2001). No entanto, contradizendo os autores já citados, quando os isolados foram cultivados em Meio ML-Gema (MHB), mesmo sendo este altamente enriquecido, não houve o resultado esperado. As colônias não se desenvolveram satisfatoriamente sendo, o meio, facilmente contaminado, mesmo quando manipulado em câmara de Fluxo Laminar.

Já por meio desse teste convencional foi possível verificar que o isolado 12 se comportou morfológicamente diferente dos demais isolados identificados como *H. capsulatum* (PERROTTA et al., 2001; KERSULYTE et al., 1992; RIPPON, 1990; KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; TIAN & SHEARER, 2002). Macroscopicamente, apresentou crescimento mais rápido, exibindo uma colônia vistosa já com sete dias de cultivo, de aspecto flocoso mais expressivo do que o *H. capsulatum* (Figuras 9a e 9b). Microscopicamente, não foram observadas estruturas comumente encontradas no *H. capsulatum* em sua fase micelial, como microconídeos e macroconídeos tuberculados, mas apenas hifas hialinas, septadas, grande quantidade de clamidósporos e células de aspecto leveduriforme (Figura 9c). Quando cultivado a 37°C, tal isolado manteve-se como uma colônia micelial, não mostrando nenhuma interferência termodimórfica, contradizendo os trabalhos escritos por LIMA et al., 2001; HAMILTON, 1998; PERROTTA et al., 2001; KERSULYTE et al., 1992; RIPPON, 1990; POONWAN et al., 1995; WHEAT, 2001; SILVA-VERGARA et al., 2001; WOODS, 2002; WOODS et al., 2002; TIAN & SHEARER, 2002.

FIGURA 9 - MACROMORFOLOGIA E MICROMORFOLOGIA DO ISOLADO 12 CULTIVADO A 25°C e 37°C



Colônia isolada em ágar Sabouraud: (b) observar, em “clouse”, o aspecto flocoso mais expressivo; (c) observar na micromorfologia, hifas hialinas e septadas (1), clamidósporos (2) e células de aspecto leveduriforme (3). Aumento 1000X (MO).

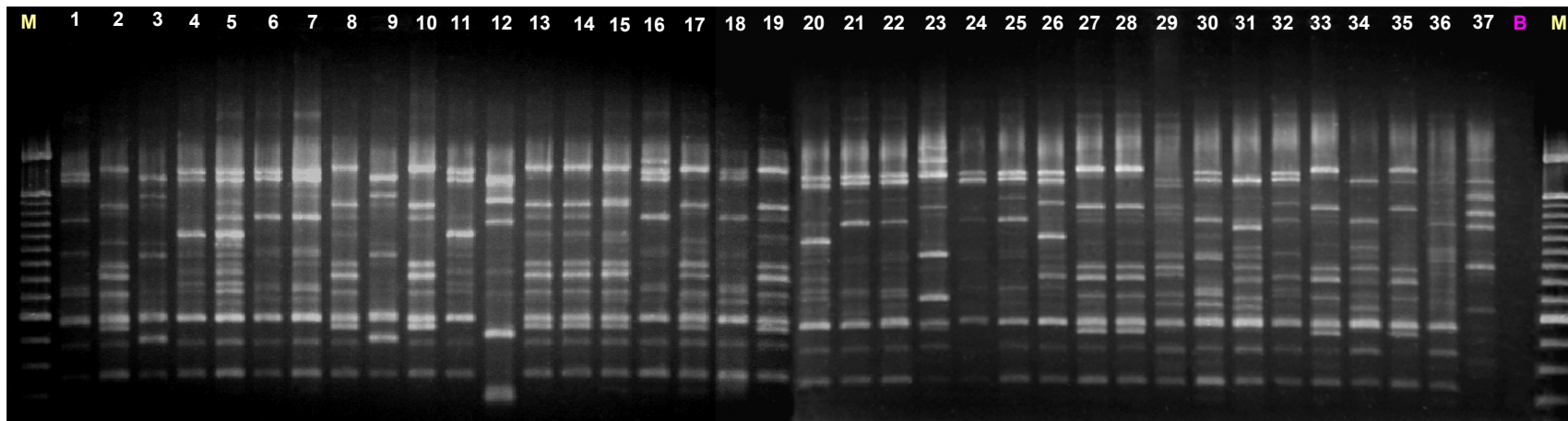
Visto que nem todos os isolados de *H. capsulatum* manteve seu dimorfismo e conidiogênese, o que dificultou sua identificação por meio dos métodos tradicionais e que a caracterização morfológica baseada na macromorfologia e micromorfologia, foram critérios que apresentaram limitação na identificação destes, no presente trabalho foram utilizados métodos moleculares a fim de confirmar a identificação de isolados denominados como *H. capsulatum*.

5.2 ANÁLISE MOLECULAR DE ISOLADOS MORFOLOGICAMENTE IDENTIFICADOS COMO *H. capsulatum*

5.2.1 Análise por Meio de Marcadores RAPD

Para a análise de RAPD, foram utilizados seis *primers* (Tabela 3), os quais geraram 85 bandas determinadas visualmente, das quais seis eram monomórficas para *Histoplasma*. O perfil de amplificação pode ser observado na Figura 10.

FIGURA 10 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DE RAPD OBTIDO DE *H. capsulatum* e *Exophiala jeanselmei* UTILIZANDO O PRIMER OPX17



Eletroforese em gel de agarose a 1,6%. Números 2 a 35: diferentes isolados de *H. capsulatum*. (1) linhagem referência de *H. capsulatum* var. *capsulatum*, (36) linhagem referência de *H. capsulatum* var. *duboisii*, (37) linhagem referência de *Exophiala jeanselmei*. **M**: marcador de peso molecular Ladder de 100pb. **B**: controle negativo.

De acordo com a análise de “agrupamento” (UPGMA), o perfil de amplificação gerou dois grupos mais quatro indivíduos com baixo grau de similaridade genética. Tanto o grupo I quanto o grupo II reuniram isolados de pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos dos quatro Estados Brasileiros (Tabela 2) estando a linhagem referência de *H. capsulatum* var. *capsulatum* no grupo I e o isolado 2, obtido de paciente imunocompetente, no grupo II. E os quatro indivíduos restantes incluíram o isolado 23, 12, a linhagem referência de *H. capsulatum* var. *duboisii* (linhagem 36) e a linhagem de *Exophiala* (linhagem 37).

Dentro dos grupos, foram verificados subgrupos com similaridades que variavam de 62% a 100% indicando um alto grau de polimorfismo entre os isolados (Figura 11). No entanto, não foi possível observar grupos, bem definidos, que pudessem relacionar tal polimorfismo com o quadro clínico da doença, preferência por sexo, idade do hospedeiro ou qualquer outro parâmetro. Foi possível perceber apenas uma relação, não tão explícita, que uniu isolados, de origens geográficas comuns, em subgrupos com coeficiente de similaridade acima de 80%, em ambos os grupos, sendo a confiabilidade dos agrupamentos demonstrada por meio do método “*bootstrap*” (FELSENSTEIN, 1986).

Ainda em relação ao primeiro dendrograma (Figura 11), pode-se verificar que apenas os agrupamentos referentes aos isolados 3 e 9, 27, 28, 33 e também o nó que une os dois principais grupos de *H. capsulatum* ao grupo externo e ao isolado 23 se mostraram confiáveis. Os demais nós tiveram um baixo valor de *bootstrap* sugerindo que, provavelmente, existissem indivíduos feneticamente intermediários aos grupos, que poderiam estar baixando a consistência de cada um deles.

Dessa forma, foram realizadas várias análises com o objetivo de verificar quais eram esses indivíduos intermediários e removê-los, obtendo-se um novo dendrograma (Figura 12).

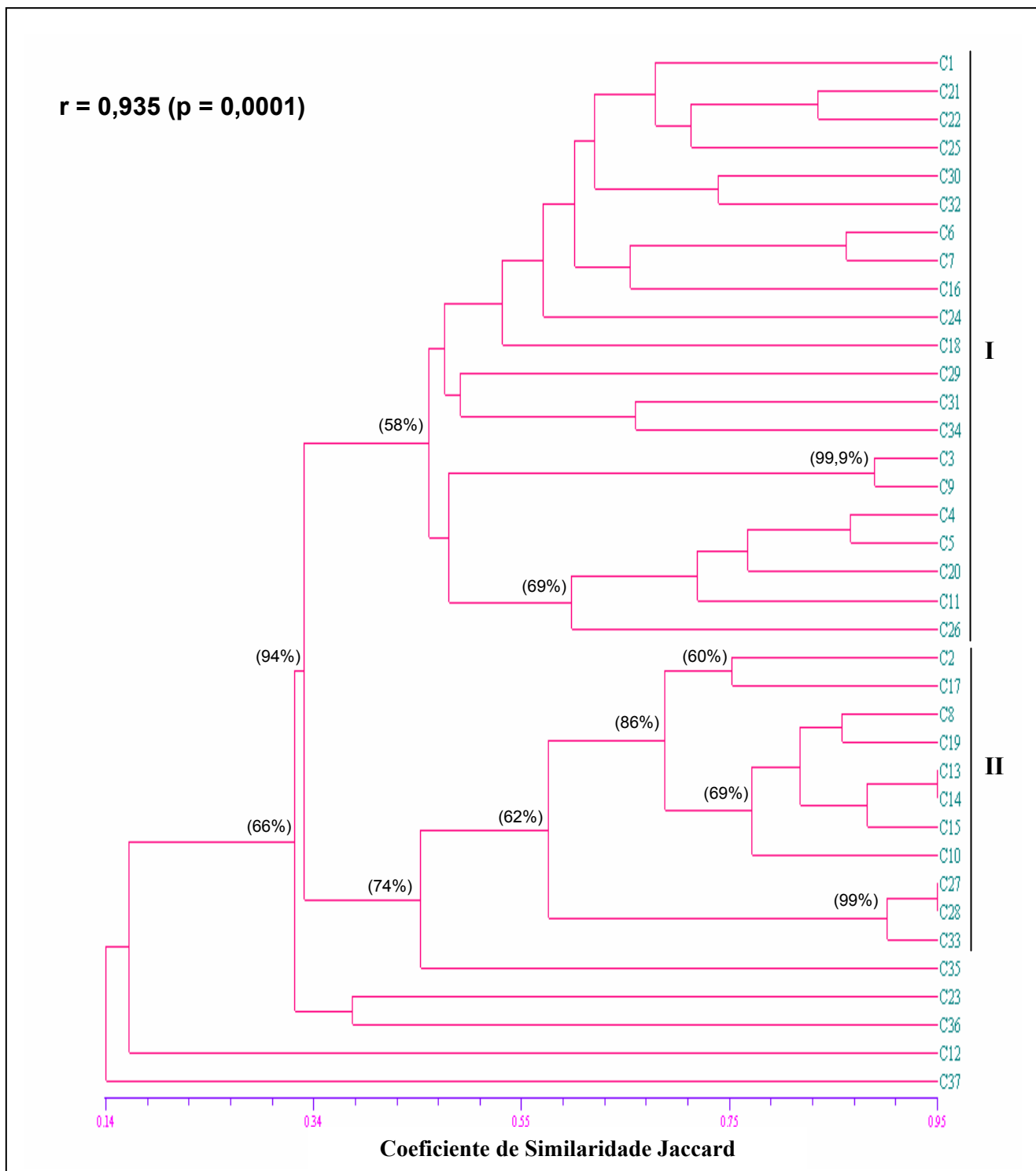
A partir dessas análises pode-se constatar que os indivíduos intermediários se tratavam das amostras 12, 23, 29. Com a exclusão desses, e também do grupo externo (36 e 37), os demais indivíduos se reuniram em

apenas dois grupos, que permaneceram similares aos anteriormente encontrados no primeiro dendrograma (Figura 11), excluindo-se apenas, o isolado 29 do grupo I. Pode-se verificar que os coeficientes de similaridade também permaneceram similares no segundo dendrograma, no entanto, os valores de *bootstraps* mostraram-se mais consistentes (Figura 12).

A análise do segundo dendrograma (Figura 12) sugeriu que apesar desse apresentar valores de *bootstraps* mais consistentes, da mesma forma que foi verificado no primeiro dendrograma, foram identificados subgrupos com similaridades que variavam de 62% a 100% indicando um alto grau de polimorfismo entre os isolados (Figura 12). Além disso, também não foi possível observar grupos, bem definidos, que pudessem relacionar tal polimorfismo com o quadro clínico da doença, preferência por sexo, idade do hospedeiro ou qualquer outro parâmetro, apenas uma pequena relação que reuniu isolados originários do mesmo Estado, em subgrupos com coeficiente de similaridade acima de 80%, em ambos os grupos. Tal como foi verificado no primeiro dendrograma, tais resultados foram reforçados pelos trabalhos de MUNIZ et al. (2001), REYES MONTES et al. (1999), VINCENT et al. (1986), KERSULYTE et al. (1992), CARTER et al. (1997), PERROTA et al. (2001), TAYLOR et al. (2000) , POONWAN et al. (1998), KARIMI et al. (2002) os quais propuseram o relacionamento de isolados de origens geográficas comuns e pela preferência por hospedeiros, utilizando RAPD. Possivelmente, os resultados desse trabalho mostraram-se contrários a literatura pelo fato deste haver utilizado isolados de uma área bem delimitada do Brasil, enquanto que os trabalhos citados utilizaram isolados de regiões definidas e distantes. Dessa forma, por meio da análise de agrupamento, obtida de dados de RAPD, pode-se sugerir que os isolados deste trabalho pertençam a um subgrupo maior que uniria os *H. capsulatum* do Brasil, isolados de pacientes humanos.

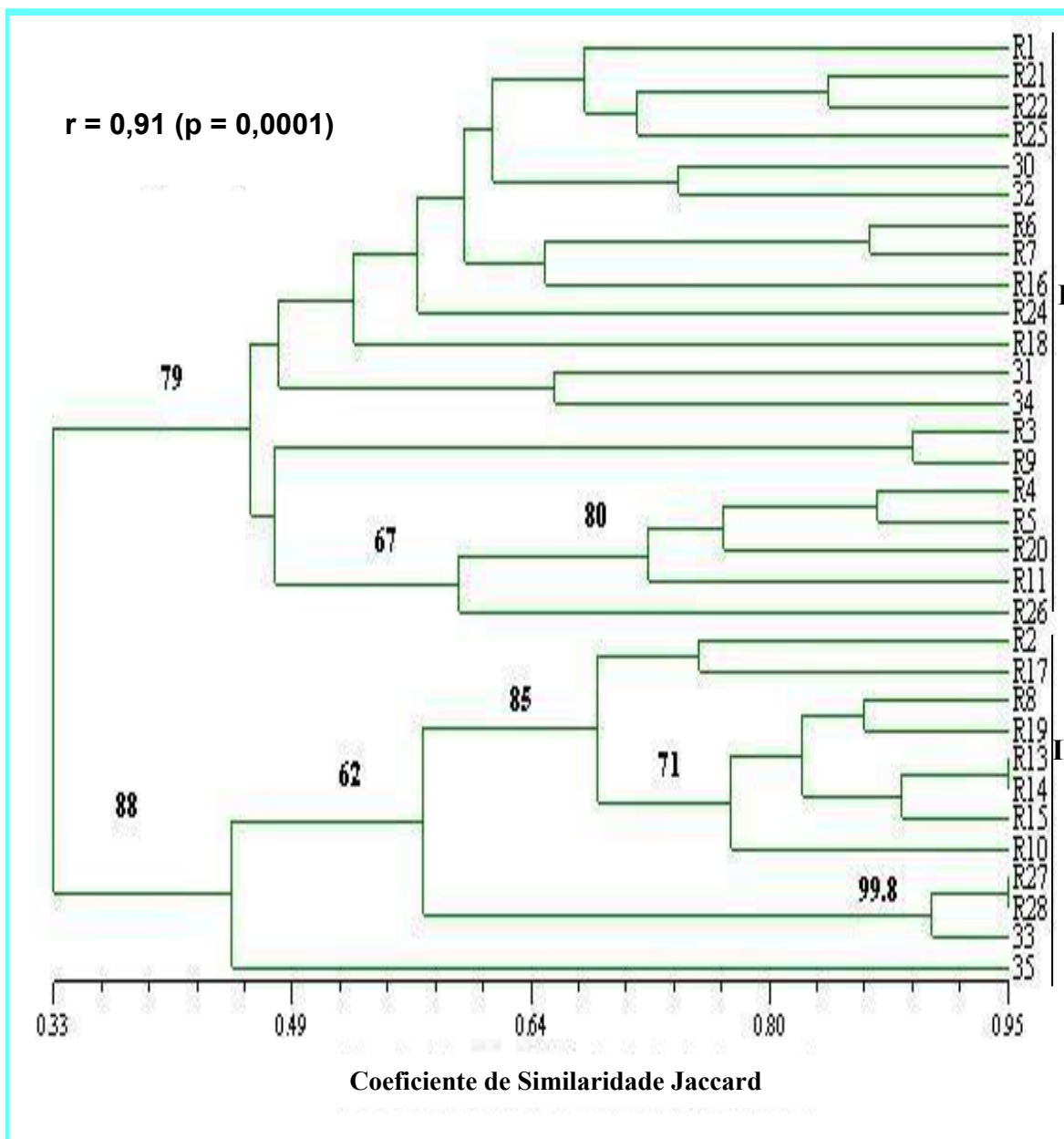
Para confirmar os dados obtidos nesta análise, excluindo-se as amostras 12, 23, 29, 36 e 37, foi realizada uma ANOVA (Tabela 6) a qual suportou, estatisticamente, as hipóteses de que os isolados restantes pertenciam a dois grupos distintos.

FIGURA 11 - DENDROGRAMA OBTIDO A PARTIR DA ANÁLISE DE AGRUPAMENTO (UPGMA) EM MARCADORES RAPD DOS ISOLADOS DE *H. capsulatum* (TABELAS 1 E 2)



Foram utilizados os *primers* OPX 11, 14, 17 e OPA 10, 13, 16, utilizando coeficiente de similaridade de Jaccard. Os valores de *bootstraps* estão descritos entre parênteses.

FIGURA 12 - DENDROGRAMA OBTIDO A PARTIR DA ANÁLISE DE UPGMA EM MARCADORES RAPD DAS LINHAGENS DAS TABELAS 1 E 2 EXCETO OS ISOLADOS 12, 23, 29, 36



Foram utilizados os *primers* OPX 11, 14, 17 e OPA 10, 13, 16, utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard. Os valores de *bootstrap* estão apresentados próximos aos nós correspondentes.

TABELA 6 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS MARCADORES RAPD (WEIR & COCKERHAM, 1984)

Fonte de variação	d.f.	Σ dos Quadrados	Componentes da variação	% da Variação
Entre populações	1	131.133	7.94192 Va	44.67
Dentro das populações	31	304.988	9.83833 Vb	55.33
Total	32	436.121	17.78025	

FST: 0.44667 (existe uma grande divergência entre os grupos)

p = 0.00000

Baseando-se no segundo dendrograma (Figura 12) aliado aos dados obtido na AMOVA, a distinção entre os dois grupos pode ser fortemente sugerida. Na Tabela 7 nota-se que 44,67% da variação foi observada entre os dois grupos, enquanto que 55,33% ocorreu dentro deles. Tais números se mostraram bastante confiáveis, visto o valor de $p=0.00000$. Além disso, o valor de $FST=0.44667$ sugeriu que existe grande divergência entre os dois grupos, salientando ainda mais os dados já verificados. Tal hipótese foi reforçada por meio da Tabela 7 que mostrou que a diferença média entre os indivíduos do grupo I e grupo II foi de 15,97%. A Tabela 7 também mostrou uma menor heterogeneidade entre os indivíduos do grupo II do que entre os do grupo I. Dessa forma, a separação dos isolados em dois grupos distintos ficou sustentada utilizando-se o método da AMOVA.

TABELA 7 - DIFERENÇA MÉDIA OBSERVADA DENTRO E ENTRE OS DOIS GRUPOS OBTIDOS COM MARCADORES RAPD COM A EXCLUSÃO DOS ISOLADOS 12, 23, 29, 36 e 37 (WEIR & COCKERHAM, 1984)

	Grupo I	Grupo II
Grupo I	21.39048	
Grupo II	15.97287	16.56061

Vermelho: Valores médios de diferença dentro dos grupos (55.33% de variação)

Azul: Valor médio corrigido de diferença entre os grupos (44.67% de variação)

Os dados de RAPD também foram analisados filogeneticamente com base na análise de Máxima Parcimônia, utilizando o programa *PAUP* (Figura 13). A análise de Máxima Parcimônia da matriz de presença e ausência das bandas de

RAPD produziu 500 árvores igualmente parcimoniosas. A aplicação de pesagem sucessiva baseada nos maiores valores de índice de consistência (IC) gerou uma única árvore enraizada (que relacionou os isolados evolutivamente, considerando a ancestralidade compartilhada entre eles) com valores de *bootstrap* de ramos que variaram de 53% a 100%. Tanto na parcimônia quanto no UPGMA foram utilizados os mesmos parâmetros de relacionamento e a mesma matriz. Os resultados obtidos foram similares e complementares para as duas análises.

A partir da análise de Máxima Parcimônia (Figura 13), pode-se observar a formação de dois grupos mais seis indivíduos. O grupo I reuniu a linhagem de *H. capsulatum* var. *duboisii* (linhagem 36), o isolado 12 e a linhagem de *Exophiala* (linhagem 37), formando o grupo externo. O grupo II reuniu a maioria dos isolados e se dividiu em sete subgrupos, sendo três deles (13b, 13c, 13d) pertencentes a um subgrupo maior (1). Os seis indivíduos restantes corresponderam aos isolados 25, 29, 30, 31, 32 e 34.

Ambas as análises (Figuras 11, 12 e 13) dos dados de RAPD mostraram-se congruentes. O método de UPGMA foi complementado pela Máxima Parcimônia, que sugeriu que tais isolados se mostraram evolutivamente relacionados, em diferentes graus.

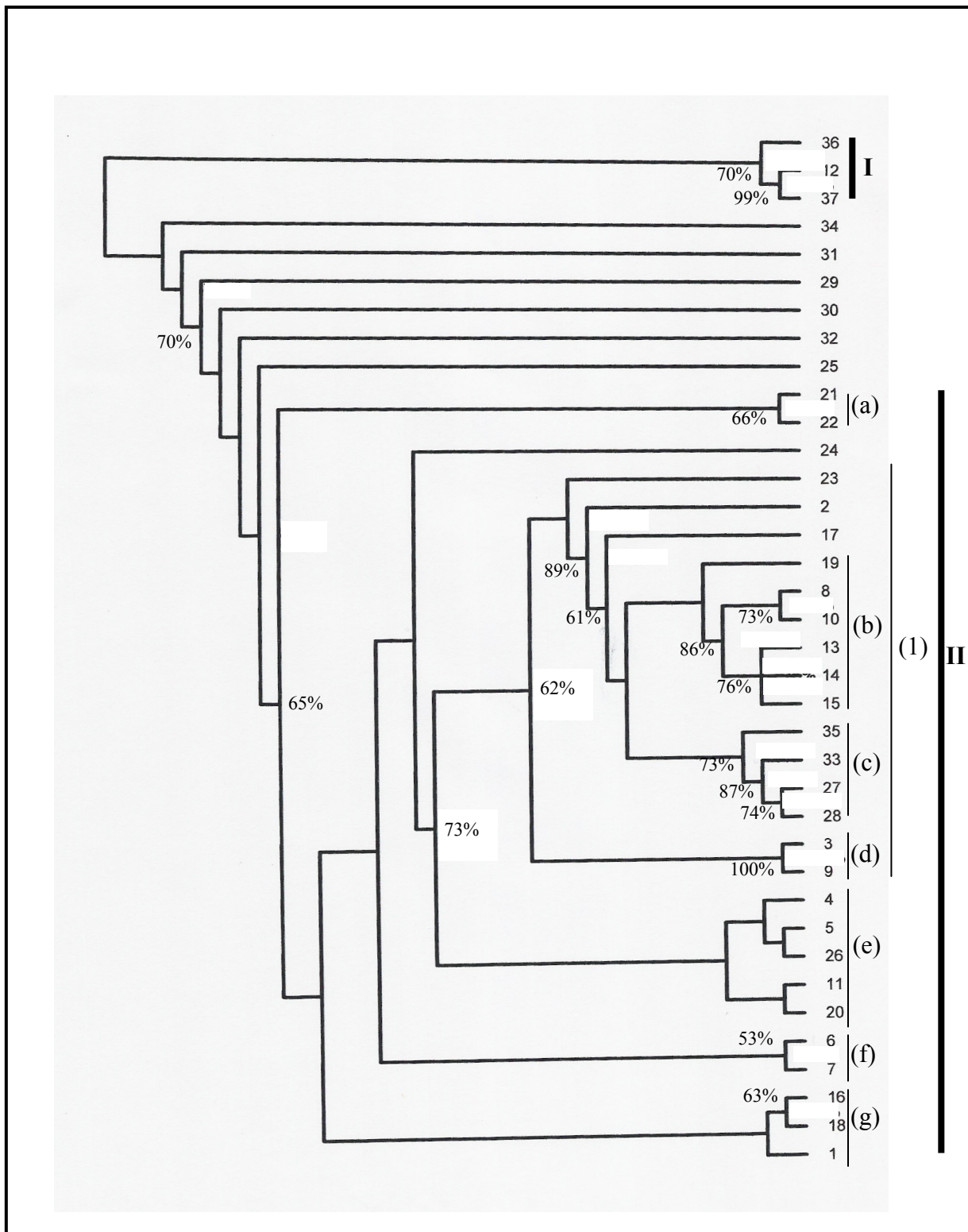
Apesar de não formarem grupos definidos, em ambas as análises pode-se verificar certa relação entre subgrupos, com alta similaridade genética (acima de 90%), no que diz respeito a origem geográfica. Na análise de Máxima Parcimônia, essa relação ficou mais evidente, visto que os subgrupos, com altos valores de coeficiente de similaridade relacionaram na maioria das vezes, indivíduos originários dos mesmos Estados, apesar de também não formarem grande grupos distintos em congruência com o UPGMA. Os trabalhos escritos MUNIZ et al. (2001); CARTER et al. (1997), REYES MONTES et al. (1999), KERSULYTE et al. (1992), PERROTA, et al. (2001), TAYLOR et al. (2000), VINCENT et al., 1986, POONWAN et al. (1998); KARIMI et al. (2002) reforçam tais resultados visto que sugerem que micro-habitats no ambiente poderiam agir como fonte de infecção para animais de populações locais e que existe uma relação regional entre os diversos isolados relacionados geneticamente. O relacionamento entre isolados e suas origens geográficas, provavelmente não se mostrou tão evidente na análise

em ambas as análises pelo fato dos isolados estudados na literatura pertencerem a regiões geográficas muito distintas, enquanto que os isolados deste trabalho pertenceram a uma região limitada do mesmo país. Desta forma, as amostras aqui estudadas poderiam pertencer a um subgrupo maior de isolados do Brasil obtidos de pacientes humanos, com grande variabilidade genética. A grande variabilidade genética observada pode ser explicada pelos trabalhos de VINCENT et al. (1986), KERSULYTE et al. (1992) e CARTER et al. (1997), que demonstraram que existe uma associação entre o genótipo e as diversas áreas geográficas em diferentes países e que linhagens da América do Sul apresentam uma maior diversidade genética entre si do que aquelas encontradas nos Estados Unidos. Para testar esta hipótese seria necessário realizar, tal como nos trabalhos citados, estudos mais aprofundados envolvendo um grupo maior de isolados, com amostras de diferentes países ou regiões distintas.

Tanto na análise de Máxima Parcimônia quanto na análise de agrupamento para RAPD, o isolado 12 se mostrou diferente dos demais isolados ditos de *H. capsulatum*, pois se agrupou à parte, no grupo externo. Já o isolado 2 mesmo tendo expressado, no teste de reversibilidade, características fenotípicas diferentes do padrão normal da variedade, agrupou-se, nessas análises moleculares, com os demais isolados de *H. capsulatum* var. *capsulatum* reforçando a hipótese de esse isolado pertencer, realmente, a esta variedade de *Histoplasma*.

Finalmente, em ambas as análises de RAPD não foi verificada uma correlação entre os diferentes quadros clínicos da doença, pois não foram observados grupos apenas de isolados de lesões localizadas ou histoplasmose disseminada e de pacientes imunocomprometidos ou não, contradizendo os resultados descritos por REYES MONTES et al., 1999; POONWAN et al., 1998; KARIMI et al., 2002; PERROTTA et al., 2001. Também não pode ser observada relação entre o sexo e idade do hospedeiro, pois tanto homens quanto mulheres, independente da idade foram infectados, na mesma proporção, por isolados únicos ou semelhantes não relacionados.

FIGURA 13 - ÁRVORE ENRAIZADA CONSENSO OBTIDA A PARTIR DA ANÁLISE DE MÁXIMA PARCIMÔNIA EM MARCADORES RAPD EM ISOLADOS DE *H. capsulatum* (TABELAS 1 E 2) UTILIZANDO OS PRIMERS OPX 11, 14, 17 E OPA 10, 13, 16



5.2.2 Análise das Seqüências das Regiões ITS1-5.8S- ITS2 do DNA Ribossomal

Baseando-se nas informações obtidas por meio dos marcadores RAPD, foram utilizadas seqüências ITS visando um maior entendimento dos resultados verificados. Para o seqüenciamento, utilizou-se a linhagem referência de *H. capsulatum* var. *capsulatum* (linhagem 1) e os isolados 2, 4, 17 e 21. Tal seleção foi baseada em características únicas de cada amostra: a linhagem 1 tratava-se de uma linhagem referência (ATCC) de *H. capsulatum* var. *capsulatum*; o isolado 2 tratava-se de uma amostra incapaz de reverter a fase leveduriforme, quando cultivada a 37°C, sendo que tal característica não pode ser explicada baseando-se nos trabalhos escritos por HAMILTON, 1998; PERROTTA et al., 2001; KERSULYTE et al., 1992; RIPPON, 1990; POONWAN et al., 1998; AJELLO, 1960; HALL et al., 1995; WHEAT, 2001; SILVA-VERGARA et al., 2001; WOODS 2002; LIMA et al., 2001; WOODS et al., 2002; TIAN & SHEARER, 2002. Segundo tais autores o tempo e as condições de cultivo afetam diretamente a capacidade de reversão do *Histoplasma capsulatum*. No entanto, o isolado 2 se tratava de uma cultura primária, que perdeu sua capacidade de dimorfismo logo após o seu isolamento e cultivo a 25°C, onde se desenvolveu na fase micelial e se tornou incapaz de reverter, *in vitro*, a 37°C, à forma de levedura, mesmo em meios enriquecidos. O isolado 4 foi selecionado pois apresentava características dimórficas padrões da espécie. O isolado 17 foi selecionado, pois apresentou o perfil eletroforético em gel de agarose 1,6% similar ao do isolado 2 e o isolado 21 ao da linhagem 1 (referência). Finalmente, os isolados de *E. parva* e *A. dermatidis* foram escolhidos como grupo externo, por se tratarem de fungos dimórficos da mesma família do *H. capsulatum* (*Onygenaceae*), o que facilitou o alinhamento parcial das regiões ITS sendo, esses indivíduos, de espécies diferentes, porém evolutivamente próximas (PETERSON & SIGLER, 1998; LECLERC et al., 1994).

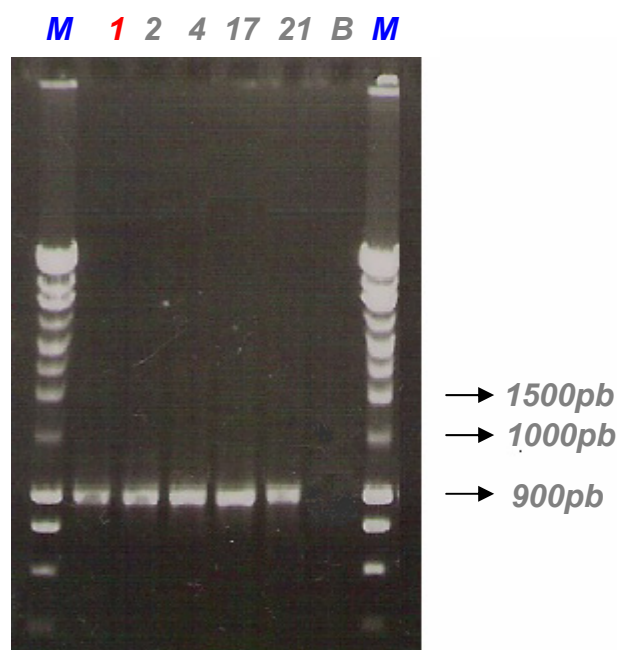
5.2.2.1 PCR-gene específico e seqüenciamento

Inicialmente, foram obtidos *amplicons* de aproximadamente 1000pb de todas as amostras seqüenciadas, utilizando-se os *primers* V9D e LS266 (Tabela 4). Tal resultado

está de acordo com o esperado para fungos Ascomicetos, que utilizando este par de *primers* obtiveram fragmentos de aproximadamente 900pb (VICENTE, 2000).

Após a purificação dos produtos da PCR, seqüências de aproximadamente 600pb envolvendo as regiões ITS1-5.8S-ITS2 foram obtidas utilizando-se os *primers* ITS1 e ITS4 (Tabela 4). O alinhamento de tais regiões pode ser visualizado no Anexo I.

FIGURA 14 - PERFIL ELETROFORÉTICO DA REAÇÃO DE PCR UTILIZANDO OS *PRIMERS* V9D e LS266



Isolados 2, 4, 17, 21 de *H. capsulatum* e linhagem referência de *H. capsulatum* var. *capsulatum* (linhagem 1) apresentando a amplificação de um fragmento de aproximadamente 1000pb, correspondendo à região ITS1-5.8S-ITS2 do DNAr. Marcador de peso molecular Ladder de 200PB (M). Controle negativo da reação sem DNA (B).

Procedeu-se então o seqüenciamento desta região. Após o alinhamento das seqüências ITS1-5.8S-ITS2 do DNAr, os nucleotídeos foram comparados com o banco de dados de seqüências *Genbank* NHI (2004)(Anexo IV), revelando resultados relevantes.

As seqüências de isolados de *H. capsulatum* do Brasil foram comparadas com linhagens de *H. capsulatum* procedentes de outros países e continentes, que englobaram isolados de humanos e também de animais, das três variedades. A análise dos dados de seqüenciamento foi realizada pelo método de Máxima

Parcimônia (Figura 15), obtendo-se uma árvore ultramétrica enraizada consenso, e pela análise Bayseana (Figura 16), que gerou uma árvore enraizada não ultramétrica (MEYER, 1995), na qual o comprimento de seus ramos representa a distância evolutiva entre as amostras.

A partir da análise de Máxima Parcimônia (Figura 15) pode-se observar três grupos principais. O grupo I foi escolhido como grupo externo, reunindo a linhagem de *Ajellomyces dematidis* (linhagem 13) e *Emosia parva* (linhagem 14), com *bootstrap* de 100%. O grupo II apresentou 12 indivíduos podendo ser dividido em três subgrupos 15a, 15b, 15c, mais três indivíduos. O subgrupo 15a reuniu os isolados 4 e 17, mais próximos filogeneticamente, ao isolados 21 e a linhagem referência de *H. capsulatum* var. *capsulatum* (isolado 1), todos com *bootstraps* de 100%. O subgrupo 15b reuniu o isolado 2 e uma linhagem de *H. capsulatum* var. *farciminosum* originária do Egito (linhagem 12), com *bootstrap* de 100%. O subgrupo 15c reuniu dois isolados de *H. capsulatum* originários do Japão (linhagens 1 e 2), mais próximos evolutivamente e com *bootstrap* de 100%, a linhagem de *H. capsulatum* var. *duboisii* originária da África do Sul (linhagem 6), com *bootstrap* de apenas 40%. Finalmente, o grupo III (Figura 15) reuniu cinco indivíduos, todos linhagens de *H. capsulatum* var. *duboisii*, quatro dos quais no subgrupo 15d, com nós menos robustos (linhagens 3, 4, 5 e 7), relacionado com *bootstrap* de 100% a uma linhagem dos Estados Unidos (linhagem 11). O subgrupo 15d reuniu uma linhagem proveniente do Japão (linhagem 3) e uma do Senegal (linhagem 7), mais próximas geneticamente, a duas linhagens também originárias do Japão (linhagens 4 e 5).

A partir da análise Bayseana (Figura 16) pode-se observar a formação de três grupos. Da mesma forma que na Máxima Parcimônia, o grupo I foi escolhido como grupo externo reunindo as linhagens de *A. dematidis* (linhagem 13) e *E. parva* (linhagem 14). O grupo II reuniu, em um relacionamento “não resolvido”, cinco linhagens de *H. capsulatum* var. *duboisii*, três das quais originárias do Japão (linhagens 3, 4 e 5), uma do Senegal (linhagem 7) e uma dos Estados Unidos (linhagem 11). O grupo III reuniu 12 indivíduos, cinco deles divididos em dois subgrupos 16a e 16b. O subgrupo 16a reuniu duas linhagens de *H. capsulatum* originárias do Japão (linhagens 1 e 2), com *bootstrap* de 89%, e o subgrupo 16b três dos cinco isolados de estudo seqüenciados (isolados 1, 17, 21), estando os isolados 1 e 21 mais próximos, com *bootstrap* de 59%, ambos relacionados ao isolado 17, com *bootstrap* de 76%. O grupo III (Figura 16) reuniu uma

linhagem de *H. capsulatum* var. *farciminosum* originária do Egito (linhagem 12); quatro linhagens de *H. capsulatum* var. *duboisii*, uma originária da África do Sul (linhagem 6), uma de Uganda (linhagem 8) e duas da Bélgica (linhagens 9 e 10). Além desses, o isolado 2, o isolado 4 e os subgrupos 16a e 16b, todos apresentando relacionamento “não resolvido”.

Da mesma forma que no RAPD, em ambas as análises do seqüenciamento de regiões ITS1-5.8S-ITS2, foram considerados parâmetros como origem geográfica, preferência por hospedeiros, sexo do hospedeiro e variedade do *Histoplasma*. Tanto na análise de Máxima Parcimônia (Figura 15) quanto na análise Bayseana (Figura 16), todos os isolados estudados se mostraram correlacionados geneticamente em diferentes graus e, concordando com os trabalhos escritos por CARTER et al., 1997; JIANG et al., 2000; TAMURA et al., 2002; SANO et al., 2001; KERSULITE et al., 1999, pode-se verificar, de forma mais expressiva, a origem geográfica dos isolados influenciando significativamente a estrutura populacional da espécie.

Reforçando as hipóteses levantadas com os estudos de RAPD, tanto na análise de Máxima Parcimônia (Figura 15) quanto na Bayseana (Figura 16), verificou-se a formação de grupos bem definidos, relacionados geograficamente, como pode ser observado no subgrupo 15a, onde todos isolados do Brasil estão reunidos; subgrupo 15d, formado em sua maioria por isolados do Japão (linhagens 3, 4 e 5); Figura 16 grupo II, formado em grande parte por linhagens do Japão (3, 4 e 5); subgrupo 16a, formado apenas por isolados do Japão (linhagens 1 e 2); subgrupo 16b, formado somente por isolados do Brasil; Figura 16 grupo III, onde estão as duas linhagens da Bélgica (linhagens 9 e 10); dentre outros.

Pode-se perceber também, na análise de Máxima Parcimônia, que os *H. capsulatum* foram divididos em dois grupos (Figura 15 grupo II e grupo III), sendo que todos os isolados de estudos formaram um subgrupo definido, de origem brasileira (subgrupo 15a), pertencente ao grupo II (Figura 15), reforçando a sugestão da relação existente entre os isolados de *H. capsulatum* e a localização geográfica dos micro-habitats. O isolado 2, no entanto, mostrou-se evolutivamente mais distante dos demais isolados do Brasil (Figura 15), pois se reuniu em 100% das árvores com uma linhagem de *H. capsulatum* var. *farciminosum* originária do

Egito (linhagem 12) (subgrupo 15b). A proximidade entre o isolado 2 e a linhagens de *H. capsulatum* var. *farciminosum* do Egito (linhagem 12), variedade essa que frequentemente ocorre em eqüinos, sugeriu que o isolado 2 pertença a uma nova variedade de *H. capsulatum*, evolutivamente mais próxima da variedade *H. capsulatum* var. *farciminosum*. Tal hipótese foi reforçada pelos trabalhos de SANO & MIYAJI (2003) e UEDA et al. (2003), que propuseram que o *H. capsulatum*, de modo geral, pode infectar diversos mamíferos e aves e isolaram tal variedade conhecida por infectar apenas eqüinos, de humanos e de cachorros que habitavam a mesma região, mostrando que a contaminação pode estar relacionada ao micro-habitat e não necessariamente ao hospedeiro.

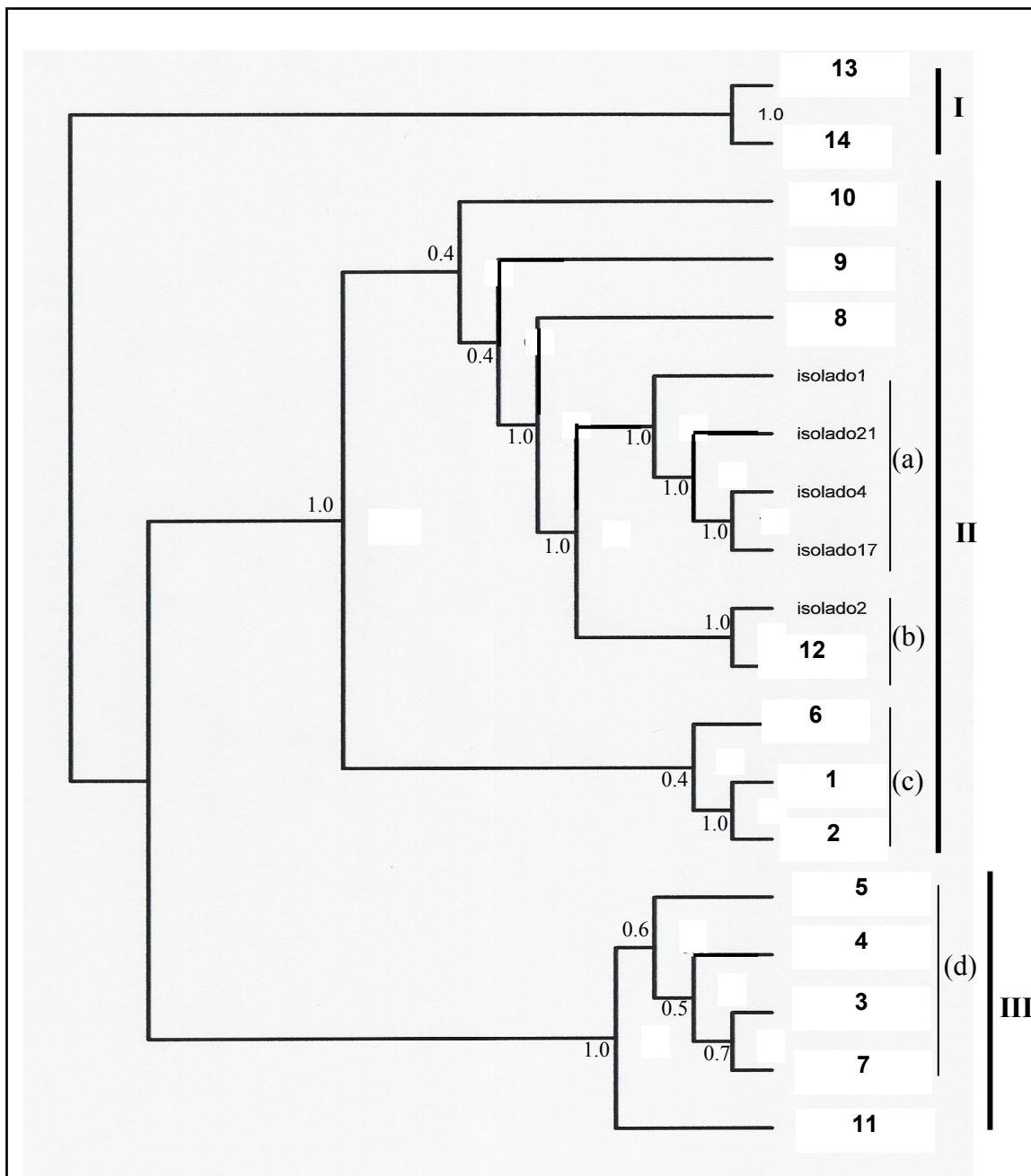
Tais resultados foram reforçados por meio da análise Bayseana (Figura 16), na qual os isolados 2 e 4 revelaram-se, apesar de próximos evolutivamente, mais distantes dos demais isolados do Brasil, que formaram um subgrupo bastante consistente (subgrupo 16b). O isolado 2, no entanto, mostrou-se ainda mais distante evolutivamente, sugerindo a hipótese desse pertencer a uma nova variedade do fungo.

Nos cladogramas obtidos neste estudo, pode-se perceber que isolados da mesma variedade, se mostravam próximos, contradizendo os trabalhos de TAMURA et al. 2002 e JIANG et al. 2000 que designaram as variedades do *H. capsulatum* como “artificiais”, não as relacionando filogeneticamente. Tais autores, no entanto, dividiram isolados das três variedades de acordo com sua origem geográfica, podendo dessa forma, explicar a existência de isolados de variedades diferentes, evolutivamente próximos, sugerindo que a infecção por esse fungo poderia estar relacionada aos micro-habitats, possivelmente, comuns.

Como se pode verificar, o isolado 2 mostrou-se diferente dos demais isolados de *H. capsulatum*. Tais resultados se mostraram relevantes apesar das análises de regiões ITS e de RAPD terem considerado variáveis diferentes, isto é, um maior número de linhagens referências, de procedências geográficas diferentes e mais definidas e um menor número de isolados para o seqüenciamento de regiões ITS, aumentado, dessa forma, a amplitude do grupo e as possibilidades de agrupamento.

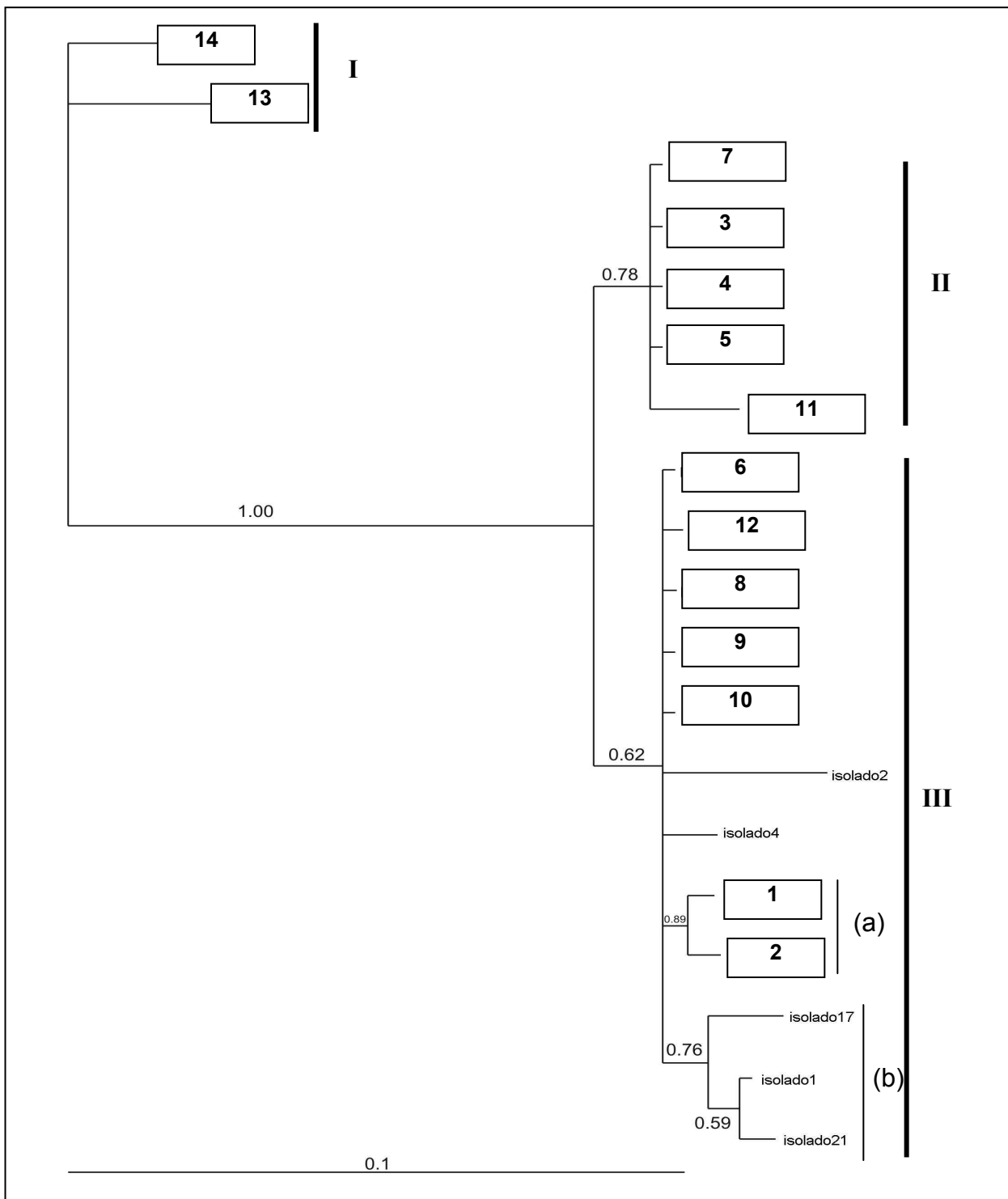
Tal como foi sugerido nos estudos com RAPD, para testar as hipóteses levantadas, seria necessário realizar estudos mais aprofundados, envolvendo um grupo maior de isolados, com amostras de diferentes países ou regiões bem distintas.

FIGURA 15 - ÁRVORE FILOGENÉTICA ENRAIZADA OBTIDA A PARTIR DO SEQUENCIAMENTO DE REGIÕES ITS – ANÁLISE DE MÁXIMA PARCIMÔNIA



1- *Ajellomyces capsulatus* originário do Japão; 2 - *Ajellomyces capsulatus* originário do Japão; 3 - *H. capsulatum* var. *duboisii* de origem desconhecida; 4 - *A. capsulatus* var. *duboisii* de origem desconhecida; 5 - *A. capsulatus* var. *duboisii* de origem desconhecida; 6 - *H. capsulatum* var. *duboisii* originário da África do Sul; 7 - *H. capsulatum* var. *duboisii* originário do Senegal; 8 - *A. capsulatus* var. *duboisii* originário da Uganda; 9 - *A. capsulatus* var. *duboisii* originário da Bélgica; 10 - *A. capsulatus* var. *duboisii* originário da Bélgica; 11 - *A. capsulatus* var. *duboisii* de origem desconhecida; 12 - *H. capsulatum* var. *farciminosum* originária do Egito; 13 - *Ajellomyces dermatitidis* de origem desconhecida; 14 - *Emmonsia parva* de origem desconhecida; isolados 1, 2, 4, 17, 21 listados nas Tabelas 1 e 2.

FIGURA 16 - ÁRVORE FILOGENÉTICA ENRAIZADA, NÃO ULTRAMÉTRICA, OBTIDA APARTIR DO SEQÜENCIAMENTO DE REGIÕES ITS – ANÁLISE BAYSEANA



Foram utilizadas na Figura 15 os mesmos códigos referentes às linhagens do *Genbank* NIH (2004) e isolados seqüenciados da Figura 14

6 CONCLUSÕES

A proximidade entre o isolado 2 e a linhagens de *H. capsulatum* var. *farciminosum* do Egito (linhagem 12), variedade essa que frequentemente ocorre em eqüinos, pode sugerir que o isolado 2 pertença a variedade *de H. capsulatum* var. *farciminosum*, com um “fluxo” no Brasil, ocorrendo em humanos.

Não foi possível relacionar os isolados estudados com os quadros clínicos da doença, preferência por sexo e idade do hospedeiro.

REFERÊNCIAS

- ABIDI, F. E.; ROH, H.; KEATH, E. Identification and characterization of a phase specific nuclear DNA binding protein from the dimorphic pathogenic fungus, *Histoplasma capsulatum*. **Infect. Immun.** v.66, p. 3867-3873, 1998.
- ADEKEYE, E.O.; EDWARDS, M.B.; WILLIAMS, H.K. Mandibular African histoplasmosis: imitation of neoplasia or giant-cell granuloma? **Bucal Surgery, Bucal Medicine, and Bucal Pathology**, v.65, p.81-84, 1988.
- AJELLO, L. Geographic distribution of *Histoplasma capsulatum*, In M.C. Sweany (eds.), Histoplasmosis. Charles C. Thomas, Springfield, p.88-98, 1960.
- AKINOSI J.O. African histoplasmosis presenting as a dental problem. **British Journal of Bucal Surgery**, v.8, p.58-63, 1970.
- ALBERTS, B.; LEWIS, J.; RALF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular Biology of the Cell**. 3rd ed. New York: Garland Publishing 1994.
- ALFENAS, C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G. C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, p.242, 1991.
- ARMBRUSTER, C.; GRIESS, J.; SETINEK-LISKA. Acute pulmonary histoplasmosis with liver and lung involvement outside the endemic area – differential diagnosis. **Wien. Klin. Wochenschr**, v.108, p.210-213, 1996.
- ATTILI, D.S., de HOOG, G.S., PIZZARANI-KLEINER, A.A. rDNA-RFLP and ITS1 sequencing of species of the genus *Fonsecaea*, agents of chromoblastomycosis. **Med Mycol.**,v.36, p.219-225, 1998.
- BASLER, R.S.W.; FRIEDMAN, J.L. Mucocutaneous histoplasmosis. **JAMA**, v.230, p.1434-1435, 1974.
- BATANGHARI, J.W.; DEEPE, G.S.; DICERA, E.; GOLDMAN, W.E. *Histoplasma* acquisition of calcium and expression of CBP1 during intracellular parasitism. **Mol. Microbiol.** v.27, p.531-539, 1998.
- BATANGHARI, J.W.; GOLDMAN, W.E. Calcium dependence and binding in cultures of *Histoplasma capsulatum*. **Infect. Immun.** v.65, p.5257-5261, 1997.
- BAVA, A.J.; ROBLES, A.M.; NEGRONI, R. BIANCHI, M. Estudio de 102 casos de histoplasmosis no asociada Al SIDA diagnosticados en el Hospital Muniz durante 1975-1994. **Revista Argentina de Micología**, v.19, p. 12-8, 1996.
- BELLMAN, B.; BERMAN, B.; SASKEN, H.; KIRSNER, R.S. Cutaneous disseminated histoplasmosis in SIDA patients in South Florida. **International journal of Dermatology**, v.36, p. 599-603, 1997.

BERG-DOUGLAS, E; AKOPYANTS NATALIA, S.; KERSULYTE-DANGERUTA. Fingerprinting Microbial Genomes Using the RAPD or AP-PCR Method. **Methods-in-Molecular-and-Cellular-Biology**, v.5(1), p.13-24,1994.

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

BIALEK, R.; FISCHER, J.; FEUCHT, A.; NAJVAR. , L. K.; DIETZ, K. .; KNOBLOCH, J.; GRAYBILL, J. R. Diagnosis and monitoring of murine histoplasmosis by nested PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.1506-1509, 2001.

BIALEK, R.; IBRICEVIC, A.; FOTHERGILL, A.; BEGERO, W.D. Small subunit ribosomal DNA sequence shows *Paracoccidioides brasiliensis* closely related to *Blastomyces dermatitidis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38(9), p.3190-3193, 2000.

BODILY, K.; PERFECT, J.R.; PROCOP, G.; WASHINGTON, M.K.; AFFRONTI, J. Small intestinal histoplasmosis: successful treatment with itraconazole in a immunocompetent host. **Gastrointest. Endosc.**, v.43, p.518-521, 1996.

BONNET, D.; NGUYEN, G.; PINA, J.J. de; MARTET, G.; MILTGEN, J.; CUGUILLIERE, A.; VERROT, D.; LONJON, T.; CIVATTE, M.; MORILLON, M.; de PINA, J.J. American pulmonary histoplasmosis: prospective study in 232 soldiers after a two-year assignment in French Guiana. **Medicine Tropicale**, v.62(1), p.33-38, 2002.

BORGES, A. S., FERREIRA, M. S. SILVESTRE, M. T. A., NISHIOKA, A. S., ROCHA, A. Histoplasmoze em pacientes imunodeprimidos: estudo de 18 casos observados em Uberlândia, MG. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.30, p.119-124, 1997.

BRUCE, H.R. Bats and their pathogens. **Selecciones Veterinarias**, v.9(2), p.134-136, 2001.

BURT, W. R. Identification of coprogen B and its break-down products from *Histoplasma capsulatum*. **Infect. Immun.** v.35, p.990-996, 1982.

CAMAIN, R.; BERTE, M.; KLEFSTAD-SILLNOVILLE, F. A sept nouveaux cas d'histoplasmosis observes en A.O.F. **Bulletin de la Societe Pathologie Exotique**, v.51, p.83-107, 1958.

CAMPBELL, C.C.; BERLINER, M.D. Virulence difference in mice of type A and B *Histoplasma capsulatum* yeasts grown in continuous light and total darkness. **Infect. Immun.**, v.8, p.677-678, 1973.

CARR, J., SHEARER, G.: Genome size, complexity and ploidy of the pathogenic fungus, *Histoplasma capsulatum*. **J. Bacteriol.**, v.180, p.6687-6703, 1998.

CARTER, D.A.; BURT, A.; TAYLOR, J.W.; KOENIG, G.L. DECHAIRO, B.M.; WHITE, T.J. A set of electrophoretic molecular markers for strain typing and population genetics studies of *Histoplasma capsulatum*. **Electrophoresis**, v.18, p.1047-1053, 1997.

CARTER, D.A.; TAYLOR, J.W.; DECHAIRO, B.; BURT, A.; KOENIG, G.L.; WHITE, T.J. Amplified single-nucleotide polymorphisms and a (GA)_n microsatellite marker reveal genetic differentiation between populations of *Histoplasma capsulatum* from the Américas. **Fungal Genetics and Biology**, v.34(1), p.37-48, 2001.

CARUSO, M., SACCO, M., MEDOFF, G. S., MARESCA, B.: Heat shock 70 gene is differentially expressed in *Histoplasma capsulatum* strains with different levels of thermotolerance and pathogenicity. **Mol. Microbiol.** v.1, p.151-158, 1987.

CATANEI, A.; KERVRAN, P. **Archives de L'Institut Pasteur D'Algérie**, v.23, p.260, 1945.

CLAYTON, R.A.; SUTTON, G.; HINKLE, P.S.; BULT, C.; FIELDS, C. Intraespecific variation in small-subunit DNAr sequences in *GenBank*: why single may not adequately represent prokaryotic taxa. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.45, p.595-599, 1995.

COCKSHOTT, W.P.; LUCAS, A.O. *Histoplasmosis duboisii*. **QJM: Monthly journal of the Association of Physicians**, v.130, p.223-238, 1964.

COELHO, A.S.G. **Bood – Versão 3.04. Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distância/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap**. Goiânia: UFG, 2005.

COHEN, P. R.; GROSSMAN, M. E.; SILVERS, D. N. Disseminated histoplasmosis and human immunodeficiency virus infection. **International Journal of Dermatology**, v.30, p.614, 1991.

COLONNA-ROMANO, S.; PORTA, A.; FRANCO, A.; KOBAYASHI, G. S. CALLEBAUT, I.; MARZULLO, L.; MORESCA, B.: Identification and isolation by ddRT-PCR of genes differentially expressed by *Histoplasma capsulatum* during macrophage infection. **Microb. Pathog.**, v.25, p.55-66, 1998.

COUPPIÉ, Pierre MD; CLYTI, Emmanuel MD; NACHER, Mathieu MD, MSc; AZNAR, Christine PhD; SAINTE-MARIE, Dominique MD; CARME, Bernard MD; PRADINAUD, Roger MD. Acquired immunodeficiency syndrome-related bucal and / or cutaneous histoplasmosis: a descriptive and comparative study of 21 cases in French Guina. **International Journal of Dermatology**, v.41, p.571-576, 2002.

DEEPE, G. S., Jr., BULLOCK, W. E.: Histoplasmosis: a granulomatous inflammatory response. In: *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. 2nd edition (J. I. Gallin, I. M., Goldstein, R. Snyderman, eds.), pp. 943-948. Raven Press, New York 1992.

- DEODHARE, S.; SAPP, M. Adrenal histoplasmosis: diagnosis by fine-needle aspiration biopsy. **Source Diagnostic Cytopathol.**, v.17, p.42-44, 1997.
- DROUHET, E.; VILASCO, J. **Bulletin de la societe Pathologie Exotique**, v.51, p.76, 1958.
- DRUTZ, DJ, editor: Systemic fungal infections: diagnosis and treatment. I. **Med Clin North Am.**, v.3, 1988.
- DRUTZ, DJ, editor: Systemic fungal infections: diagnosis and treatment. II. **Med Clin North Am.**, v.4, 1989.
- DUCAN, T. J.A unique form of *Histoplasma*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.40, p. 364-5, 1947.
- DURKIN, M., KOHLER, S., SCHNIZLEIN-BICK, C., LEMONTE, A., CONNOLLY, P., GOLDBERG, J., GARRINGER, T., WHEAT, L. J.: Chronic infection and reactivation in a pulmonary challenge model of histoplasmosis. **J. infect. Dis.**, v.183, p.1822-1824, 2001.
- EISSENBERG, L.G.; GOLDMAN, W.E. *Histoplasma* variation and adaptive strategies for parasitism: New perspectives on histoplasmosis. **Clin. Microbiol. Rev.** v.4, p.441-421, 1991.
- EISSENBERG, L.G.; GOLDMAN, W.E.; SCHLESINGER, P.H. *Histoplasma capsulatum* modulates the acidification of phagolysosomes. **J. Exp. Med.** v.177, p.1605-1611, 1993.
- EISSENBERG, L.G.; SCHLESINGER, P.H.; GOLDMAN, W.E. Phagosome-lysosome fusion in P388D1 macrophages infected with *Histoplasma capsulatum*. **J. Leuk. Biol.** v.43, p.483-491, 1988.
- EISSENBERG, L.G.; WEST, J.L.; WOODS, J.P.; GOLDMAN, W.E. Infection of P388D1 macrophages and respiratory epithelial cells by *Histoplasma capsulatum*: selection of avirulent variants and their potential role in persistent histoplasmosis. **Infect. Immun.** v.59, p.1639-1646, 1991.
- ERLICH, H. A. **PCR technology: Principles and application for DNA amplification**. New York; STOCKTON, p.246, 1989.
- FELSENSTEIN, J. **PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c**. DNAPARS - DNA Parsimony Program. Seattle Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington. 1986 – 1993.
- FEMAN, S. S., TILFORD, R. H. Ocular findings in patientes with histoplasmosis. **Journal of American Medical Association**, v.253, p.2534-2537, 1985.
- FERNANDEZ , M.I.G. de; NEGRONE, R.; ARECHAVALA, A.; de FERNANDEZ, M.I.G. Tibial abscess caused by *Histoplasma capsulatum*. **Medicina Buenos Aires**, v.31(2), p.191-192, 2001.

FERREIRA, H.B., **Biologia molecular básica**. Arnaldo Zaha. 3ª ed. Porto Alegre, 2001.

FERREIRA, M. E. Aplicação de Marcadores Moleculares no mapeamento genético de plantas. In: **III Curso de Marcadores Moleculares**, EMBRAPA/CENARGEN – Brasília, F, 1994.

FUNGARO, M. H. P. PCR na Micologia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 14, p. 12-16, 2000.

FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. Aplicações da PCR em ecologia molecular. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.) **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. Cap. 8, p.205-227.

GASS, M., KOBAYASHI, G. S.: Histoplasmosis. An illustrative case with unusual vaginal and joint involvement. **Arch. Dermatol.**, v.100, p.724-727, 1969.

GENBANK NHI - International Nucleotide Sequence Database Collaboration. **Nucleic Acids Research**, v.32(1), p.23-26, 2004.

GOODWIN, P. H.; ANNIS, S. L. Rapid identification of genetic variation and pathotype of *Leptosphaeria maculans* by random amplified polymorphic DNA assay. **Applied Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2482-2486, 1991.

GUTHRIE, P. A. I.; MAGILL, C. W.; FREDERIKSEN, R. A; ODVODY, G. N. Random amplified polymorphic DNA markers: a system for identifying and differentiating isolates of *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, v. 82 p. 832-835, 1992.

HAIJEH, R. A. Disseminated histoplasmosis in persons infected with human immunodeficiency virus. **Clin. Infect. Dis.**, v.21, p. S108-S110, 1995.

HALL, G.S.; PRATT-RIPPIN, K.; WASHINGTON, J. A. Evaluation of a chemiluminescent probe assay for identification of *Histoplasma capsulatum* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p.899-906, 1995.

HALL, T.A. **BioEdit 4.8**. Raleigh, 1997-2001. 1 arquivo (11,5M); Disponível em <<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>> BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Acesso em março de 2005.

HAMILTON, A. J. Serodiagnosis of histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and penicilliosis marneffeii: current status and future trends. **Medical Mycology**, v.36, p.351-364, 1998.

HAY, R. J. Histoplasmosis. **Semin Dermatol**, v.12, p.310, 1993.

HAYDEN, H. L.; PEGG, K. G.; ATKEN, E. A. B.; IEWIN, J. A. G. Genetic relationships as assessed by molecular markers and cross-infection among strains of *Colletotrichum gloeosporoides*. **Australian Journal of Botanic**, v.42, p.9-18, 1994.

HAYNES, K. A.; WESTERNENG, T. J.; FELL, J. W.; MOENS, W. Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA. **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v.33, p.319-325, 1995.

HEBART, H.; LÖFFLER, J.; MEISNER, C.; SEREY, F.; SCHMIDT, D.; BÖHME, A.; MARTIN, H.; ENGEL, A.; BUNJES, D.; KERN, W. V.; SCHUMACHER, U.; KANZ, L.; EINSELE, H. Early detection of *Aspergillus* infection after allogeneic stem cell transplantation by polymerase chain reaction screening. **J. Infect. Dis.**, v.181, p. 1713-1719, 2000.

HENNIG, W. **Grundzüge einer theorie der phylogenetischen systematik**. Deutscher zentralverlag, Berlin, 1950.

HENNIG, W. **Phylogenetic systematics**. University of Illinois Press, Chicago, 1966.

HOOG, G. S de; BEGUIN. H.; BATENBURG-VAN DE VEGTE, W.H. *Phaeotheca triangulais*, a new meristematic black yeast from a humidifier. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.71, p.289-295, 1997.

HOOG, G. S. de. Significance of fungal evolution for the understanding of their pathogenicity illustrated with agents of phaeohyphomycosis. **Mycoses**, v.40, p. 5-8, Supplement 2, 1997.

HOOG, G. S. de; BOWMAN, B.; GRASER, Y.; HAASE, G.; ELFARI, M.; GARRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; MELZER-KRICK, B.; UNTEREINER, W. A. A molecular phylogeny and taxonomy of medically important fungi. **Medical Mycology**, v. 36, p. 52-56, Supplement 1, 1998.

HOOG, G.S. de; GUARRO, J. **Atlas of clinical fungi**. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures. Universitat Rovira i Virgili Reus, Spain. p.125-126, 1995.

HOOG, G.S. de; GUERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G.; UIJTHOF, J.M.J.; UNTEREINER, W.A. Nutritional physiology of type isolates of currently accepted species of *Exophiala* and *Phacocacomycetes*. **Antonie van den Ende**, v.68, p.43-49, 1995b.

HORRÉ, R.; HOOG, G. S. de. Primary cerebral infections by melanized fungi, a review. **Studies in Mycology**, v.43, p.176-193, 1999.

HOWARD, D.H. RAFIE, R.; TIWARI, A.; FAULL. K.F. Hydroxamate siderophores of *Histoplasma capsulatum*. **Infect. Immun.** v.68, p.2338-2343, 2000.

HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F. **MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees**. Bioinformatics Application Note, 17, p.754-755, 1980.

IGNATOV, A.; KEATH, E.J. Gel shift assay of nuclear extracts from *Histoplasma capsulatum* demonstrates the presence of several DNA binding proteins. **Infection & Immunity**, v.70(4), p.2238-2241, 2002.

IWEN, P.C.; HENRY, T.; HINRICHS, S.H. ITS sequence identification of novel mould pathogens. Pathology and Microbiology, University of Nebraska Medical Center, 986495 Nebraska Medical Center, Omaha, NE 68198-6495, USA, Enviado para publicação em 1999b.

IWEN, P.C.; HENRY, T.; HINRICHS, S.H. Sequence analysis of the internal transcribed spacer regions of *Histoplasma capsulatum*, Pathology and Microbiology, University of Nebraska Medical Center, 986495 Nebraska Medical Center, Omaha, NE 68198-6495, USA. Enviado para publicação em 1999a.

IWEN, P.C.; HINRICHS, S.H.; RUPP, M.E. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. **Medical Mycology**, v.40(1), p.87-109, 2002.

JIANG, B.; BARTLETT, M.S.; ALLEN, S.D.; SMITH, J.W.; WHEAT, L.J.; CONNOLLY, P.A. LEE, C. H.: Typing of *Histoplasma capsulatum* isolates based on nucleotide sequence variation in the internal transcribed spacer regions of r RNA genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38(1), p.241-245, 2000.

JIMENEZ, R.A.; URAN, M.E.; BEDOUT, C. de; ARANGO, M.; TOBON, A.M.; CANO, L.E.; RESTREPO, A.; de BEDOUT, C. Acute histoplasmosis outbreak in a family group: identification of infection source. **Biomedica**, v.22(2), p.155-159, 2002.

KARIMI, K.; WHEAT, L.J.; CONNOLLY, P.; CLOUD, G.; HAJJEH, R.; WHEAT, E.; ALVES, K.; LACAZ, C. da S.; KEATH, E.; da S. LACAZ, C. Differences in histoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome in the United States and Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v.186(11), p.1655-1660, 2002.

KASUGA, T.; TAYLOR, J.W.; WHITE, T.J.: Phylogenetic relationship of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungal *Histoplasma capsulatum* Darling. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.653-663, 1999.

KASUGA, T.; WHITE, T.J. ; TAYLOR, J.W. Ajellomyces ITS. Roche Molecular Systems, 1145 Atlantic Ave, Alameda, CA 94501, USA. Enviado para publicação em 2000.

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

KASUGA, T.; WHITE, J.; TAYLOR, J.W. Phylogeography of *Histoplasma capsulatum*. **American society for Microbiology**, 101st General Meeting, Orlando, FL. Abstract F-133, 2001.

KEATH, E.J., KOBAYASHI, G.S., MEDOFF, G.: Typing of *Histoplasma capsulatum* by restriction fragment length polymorphism in a nuclear gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p.2104-2107, 1992.

KEATH, E.J., SPITZER, E.D.; PAINTER, A.A.; TRAVIS, S.J.; KOBAYASHI, G.S.; MEDOFF, G. DNA probe for the identification of *Histoplasma capsulatum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, p.2369-2372, 1989.

KERN, M. **Medical Micology**, 3 ed. F. A. Davis Company, Philadelphia, Pennsylvania, 1988.

KERSULYTE, D.; WOODS, J.P.; KEATH, E.J.; GOLDMAN, W.E.; BERG, D.E.: Diversity among clinical of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers. **Journal of Bacteriology**, v.174, p.7075-7079, 1992.

KILBY, L.M.; MARQUES, M.B.; JAYE, D.L.; TABEREAUX, P.B.; REDDY, V.B.; WAITES, K.B. The yield of bone marrow biopsy and culture compared with blood culture in the evaluation of HIV-infected patients for mycobacterial and fungal infections. **Am. J. Med.**, v.104, p. 123-128, 1998.

KLIMPEL, K.R. GOLDMAN. W.E. Isolation and characterization of spontaneous avirulent variants of *Histoplasma capsulatum*. **Infect. Immun.** v.55, p.528-533, 1987.

KLITE, P.D.; DIERCKS, F.H. *Histoplasma capsulatum* in fecal contents na organs of bats in the canal zone. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.14, p.433-439, 1965.

KUGLER, S.; SCHURTZ-SEBGHATI, T.; GROPE EISENBERG, L.; GOLDMAN, W.E. Phenotypic variation and intracelular parasitism by *Histoplasma capsulatum*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **97**, p.8794-8798, 2000^a

KUGLER, S.; YOUNG, B.; MILLER, V.L. GOLDMAN, W.E. Monitoring phase-specific gene expression in *Histoplasma capsulatum* with telomeric GFP fusion plasmids. **Cell. Microbiol.** v.2, p. 537-547, 2000b.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. **Medical Mycology**. 1^a ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1992.

LACAZ, C. S., PORTO, E. MARTINS, J. E. C. Histoplasmose Clássica. In: Lacaz C. S., Porto, E., Martins, J. E. C. (eds) *Micologia médica – Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. 8^a edição Sarvier, São Paulo, p.327-341, 1991.

LANE, T.E.; WU-HSIEH, B.A.; HOWARD, D.H. Iron limitation and the gamma interferon-mediated anti-*histoplasma* state of mirine macrophages. **Infect. Immun.** v.59, p.2274-2278, 1991.

LARENA, I.; SALAZAR, O.; GONZÁLEZ, V.; JULIÁN, M. C.; RUBIO, V. Design of a *primer* for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 75 , p.187-194, 1999.

LATINI, O.A. Encuesta Nacional de Micosis Broncopulmonares. **Revista Argentina de Tuberculosis y Enfermedades Broncopulmonares y Salud Pública**, v.XLVI, p. 27-41, 1985.

LECLERC, M.C.; PHILIPPE, H.; GUEHO, E. Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. **Journal of Medical & Veterinary Mycology**, v.32(5), p.331-341, (1994).

LIMA, R.F. de; BORBA, C. de M.; de LIMA, R.F. Viability, morphological characteristics and dimorphic ability of fungi preserve by different methods. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.18(4), p.191-196, 2001.

LIMAYE, A.P.; CONNOLLY, P.A.; SAGAR, M.; FRITSCHKE, T.R.; COOKSON, B.T.; WHEAT, L.J.; STAMM, W.E. Transmission of *Histoplasma capsulatum* by organ transplantation. **New England Journal of Medicine**, v.343(16), p.1163-1166, 2000.

LIYANAGE, H. D.; McMILLAN Jr, R. T.; KISTLER, H. C. Two genetically distinct populations of *Colletotrichum goeosporioides* from citrus. **Phytopathology**, v. 82, p. 1371-1376, 1992.

LOH, F.C.; YEO, G.F.; TAN, W.C.; KUMARASINGHE, G. Histoplasmosis presenting as hyperplastic gingival lesion. **Journal of bucal Pathology and Medicine**, v.18, p.533-563, 1989.

MAGRINI, V., GOLDMAN, W. E.: Molecular mycology: a genetic toolbox for *Histoplasma capsulatum*. **Trends Microbiol.**, v.9, p.541-546, 2001.

MANULIS, S.; KOGAN, N.; REUVEN, M.; BEN-YEPHET, Y. Use of the RAPD technique for identification of *Fusarium oxysporu* f. sp. Dianthi from carnation. **Phytopathology**, St Paul, v. 84, p. 98-101, 1993.

MASCLAUX, F.; GUÉRO, E.; HOOG, G.S. de. Phylogenetic relationships of human pathogenic *Cladosporium (xylohypha)* species inferred from partial LSU rDNA sequences. **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v.33, p.327-338, 1995.

MCEWEN, J.G.; TAYLOR, J.W.; CARTER, D.; XU, J.; FELIPE, M.S.S.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T.G.; KASUGA, T.; WHITE, T.; BUI, T.; SOARES, C.M.A. Molecular typing of pathogenic fungi. **Medical Mycology**, v.38 (Supplement 1), p.189-197, 2000.

MCKINSEY, D. S.; SPIEGEL, R. A.; HUTWAGNER, L. Prospective study of histoplasmosis in patients infected with human immunodeficiency virus: Incidence, risk factors, and pathophysiology. **Clin Infect Dis.**, v. 24 p. 1195-1203, 1997.

MEDOFF, G., KOBAYASHI, G. S., PAINTER, A., TRAVIS, S.: Morphogenesis and pathogenicity of *Histoplasma capsulatum*. **Infect. Immun.**, v.55, p.1355-1358, 1987.

MEYER, D. Árvores evolutivas humanas: Uma discussão sobre inferência filogenética. **Série Monografias**, n.3, 1995.

MICHENER, C.D.; SOKAL, R.R. A quantitative approach to a problem in classifications. **Evolution**, v.11, p.130-162, 1957.

MIGNOGNA, M.D.; FEDELE, S.; LO RUSSO, L.; RUOPPO, E.; LO MUZIO, L. A case of bucal localized histoplasmosis in a immunocompetent patient. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v.20, p.753-755, 2001.

MILLER, R.L.; GOULD, A.R.; SKOLNICK, J.L.; EPSTEIN, W.M. Localized bucal histoplasmosis. **Bucal Surgery**, v.53, p.367-374, 1982.

MOLNAR, O.; PRILLINGER, H.; LOPANDIC, K.; WEIGANG, F.; STAUDACHER, E. Analysis of coenzyme Q systems monosaccharide patterns of purified in the genus *kluyveromyces*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.70, p.68-78, 1996.

MUNIZ, M.M.; PIZZINI, C.V.; PERALTA, J.M.; REISS, E.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M. 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. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39(12), p.4487-4494, 2001.

NEGRONI, R. **Histoplasmosis**. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (eds). **Tratado de Infectologia**, São Paulo, Ateneu, cap. 1, p. 120-129, 1996.

NEGRONI, R.; TABORDA, A.; BENETUCCI, J. Manifestaciones cutaneo mucosas de la histoplasmosis en pacientes com SIDA. **Revista Argentina de Micologia**, v. 71, n. 2, p. 71-78, 1990.

NEWMAN. S.L.; GOOTEE, L.; BRUNNER, G.; DEEPE, G.S., JR. Chloroquine induces human macrophage killing of *Histoplasma capsulatum* by limiting the availability of intracellular iron and is therapeutic in a murine model of histoplasmosis. **J. Clin. Invest.** v.93, p. 1422-1429, 1994.

ODA, D.; MACDOUGALL, L.; FRITSCH, T.; WORTHINGTON, P.; MCDUGALL, L. Bucal histoplasmosis as a presenting disease in acquired immunodeficiency syndrome. **Bucal Surgery, Bucal Medicine, and Bucal Pathology**, v.70, p.631-636, 1990.

PADHYE, A.A., PATHAK, A.A.; KATKAE, V.J.; HAZARE, V.K.; KAUFMAN, L. Bucal histoplasmosis in India: a case report and an overview of cases reported during 1968-1992. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.32, p.93-103, 1994

PAPHITOU, N.I.; BARNETT, B.J. Solitary parietal lobe histoplasmosis mimicking a brain tumour. **Scandinavian journal of Infectious Diseases**, v.34(3), p.229-232, 2002.

PATEL, J.B.; BATANGHARI, J.W.; GOLDMAN, W.E. Probing the yeast phase-specific expression of the *CBP1* gene in *Histoplasma capsulatum*. **J. Bacteriol.** v.180, p.1786-1792, 1998.

PERROTTA, D.; ABRANTES, R.; CANTEROS, C.; RODERO, L.; DAVEL G. : Molecular characterization of isolates of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* by RAPD-PCR in Argentina. **Revista Argentina de Microbiologia**, v.33(3), p.160-166, 2001.

PETERSON, SW.; SIGLER L. Molecular genetic variation in *Emmonsia crescens* and *Emmonsia parva*, etiologic agents of adiaspiromycosis, and their phylogenetic relationship to *Blastomyces dermatitidis* (*Ajellomyces dermatitidis*) and other systemic fungal pathogens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36(10), p.2918-2925, (1998).

PISANTY, S. Histoplasmosis as a periapical pathology: a case report. **Journal of Bucal Medicine**, v.34, p.116-118, 1979.

POLIS, M. A.; KOVACS, J. A. **Fungal infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome**. In: DE VITA JR.,V.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. **Aids – Etiology, Diagnosis, Treatment and Prevention**. Philadelphia J. B. Lippincott Company. 3^a ed, 1992, p. 167-180.

POONWAN, N.; IMAI, T.; MEKHA, N.; YAZAWA, K.; MIKAMI, Y.; ANDO, A.; NAGATA, Y. Genetic analysis of *Histoplasma capsulatum* strains isolated from clinical specimens in Thailand by a PCR-Based Random Amplified Polymorphic DNA Method. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36(10), p.3073-3076, 1998.

PORTA, A.; COLONNA-ROMANO, S.; CALLEBAUT, I.; FRANCO, A.; MARZULLO, L.; KOBAYASHI, G. S.; MORESCA, B. An homologue of the human 100- kDa protein (p100) is differentially expressed by *Histoplasma capsulatum* during infection of murine macrophages. **Biochemical & Biophysical Research Communications**, v. 254(3), p. 605-613, 1999.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.1. p.17-20, 1985.

RAMDIAL, P. K.; MOSAM, A.; DLOVA, N. C.; SATAR, N. B.; ABOOBAKER, J.; SINGH, S. M. Disseminated cutaneous histoplasmosis in patients infected with human immunodeficiency virus. **Journal of Cutaneous Pathology**, v.29, p. 215-225, 2002.

RAZA, J.; HARRIS, M.T.; BAUER, J.J. Gastrointestinal histoplasmosis in a patient with acquired immune deficiency syndrome. **Mt. Sinai J. Med.**, v.63, p.136-140, 1996.

REDDY, P.; GORELICK, D.F.; BRASHER, C.A.; LARSH, H. Progressive disseminated histoplasmosis as seen in adults. **American journal of Medicine**, v.48, p.629-636, 1970.

REID, T.M; SCHAFFER, M.P. Direct detection of *Histoplasma capsulatum* in soil suspensions by two-stage PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v.13(4), p. 269-273, 1999.

RETALLACK, D.M. HEINECKE, E.L; GIBBONS, R.; DEEPE, G.S., JR.; WOODS, J.P. The *URA5* gene is necessary for *Histoplasma capsulatum* growth during infection of mouse and human cells. **Infect. Immun.** v.67, p.624-629, 1999.

RETALLACK, D.M., DEEPE, G.S. WOODS, J.P.: Applying in vivo expression technology (IVET) to the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. **Microb. Pathog.**, v.28, p.169-182, 2000.

REYES MONTES, M.R.; BOBADILLA DEL VALLE, M.; MARTINEZ RIVERA, M.A.; RODRIGUEZ ARELLANES, G.; MARAVILLA, E.; SIFUENTES OSORNIO, J.; TAYLOR, M.L. Relatedness analyses of *Histoplasma capsulatum* isolates from Mexican patients with SIDA-associated histoplasmosis by using histoplasmin electrophoretic profiles and randomly amplified polymorphic DNA patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37(5), p.1404-1408, 1999.

RIBEIRO, M.C. Microbiologia prática: roteiro e manual: bactérias e fungos/ SOARES, M.M.; SOARES, M.M.S.R. São Paulo: ed. Ateneu, 2002.

RIPPON, J. W. (1988) **Medical Micology. The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes**. W. B. Saunders Company, 3^a ed, p. 381-432, Philadelphia, 1989.

RIPPON, J.W. Tratado de Micologia Médica, Hongos y Actinomicetos Patógenos. 3^a ed Interamericana MacGraw Hill. Buenos Aires, 1990.

RODRIGUEZ, G.; ORDONEZ, N.; MOTTA, A. *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* within cutaneous nerves in patients with disseminated histoplasmosis and SIDA. **British Journal of Dermatology**, v.144(1), p.205-207, 2001.

ROHLF, F.J. **NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system – Version 2.1**. New York, Applied Biostatistic Inc., 44p., 2000.

RUBIN, H.; FURCOLOW, M.L.; YATES, J.L.; BRASHER, C.A. The course and prognosis of histoplasmosis. **Am J. Med.**, v.27, p.278-288, 1959.

RUBINSTEIN, P.; NEGRONI, R. Micosis Broncopulmonares del adulto y el Niño. 2^a ed, Edicione Beta S.R.L., Buenos Aires, 1981.

SAIKI, R. K.; SACARF, S.; FALOONA, F. A.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A. ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and retriCTION site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, v.230, p.1350-1354, 1985.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A Laboratory manual**. 2^a ed. CSH Press, 1989.

SAMUELS, G. J.; SEIFERT, K. A. The impact of molecular characters on systematics of filamentous ascomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.33, p.37-67, 1995.

SANO, A.; MIYAJI, M. Canine histoplasmosis in Japan. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v.44(4), p.239-243, 2003.

SANO, A.; UEDA, Y.; INOMATA, T.; TAMURA, M.; IKEDA, T.; KAMEI, K.; KIUCHI, A.; MIKAMI, Y.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. Two cases of canine histoplasmosis in Japan. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v.42(4), p.229-235, 2001.

SANYAL, M.; BASU, N.; ROYA, T.; THAMMAYYA, A. Primary bucal histoplasmosis in India. **Sabouraudia**, v.11, p.115-118, 1973.

SAROSI, G.; JOHNSON, P. Disseminated histoplasmosis in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clinical Infectious Diseases*. v.14, p. 60, 1992.

SAROSI, G.A.; DAVIES S.F., editors: *Fungal diseases of the lung*, Orlando, Flórida, 1986, Grune & Stratton, Inc.

SCHÄFER, G.; WÖSTEMEYER, J. Random primer dependent PCR differentiates aggressive from non-aggressive isolates of the oilseed rape pathogen *Phoma lingam* (*Leptosphaeria maculans*). **Journal of Phytopathology**, v.136, p. 124-136, 1992.

SCHAFER, M.P.; DEAN, G.E. Cloning and sequence analysis of an H(+)-ATPase-encoding gene from the human dimorphic pathogen *Histoplasma capsulatum*. **Gene**. v.136, p.295-300, 1993.

SCHEINERT; BEHRENS; KAHLE *Optimizing DNA amplification protocols*, 1995.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin ver. 2000: A software for population genetic data analysis**. **Genetics and biometry laboratory**. University of Geneva. Geneva, Switzerland, 2000.

SCHNUR, R.A.; NEWMAN, S.L. The respiratory burst response to *Histoplasma capsulatum* by human neutrophils. Evidence for intracellular trapping of superoxide anion. **J. Immunol.** v.144, p. 4765-4772, 1990.

SEIFERT, K. A.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. A. Critique of DNA sequence analysis in the taxonomy of filamentous *Ascomycetes* and *ascomycetous anamorphs*. **Canadian Journal of Botany**, v.73 (suppl 1), p. 5760-5767, 1995.

SILVA-VERGARA, M.L.; MARTINEZ, R.; MALTA, M.H.B.; MAFFEI, C.M.L.; RAMIREZ, L.E. *Histoplasma capsulatum* isolated from *Didelphis albiventris* (marsupialia: Didelphidae) in the state of Minas Gerais, Brazil. **Revista Iberoamericana de Micologia.**, v.18(4), p.180-182, 2001.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy**. W. H. Freeman and Company, San Francisco, p.573, 1973.

SWOFFORD, D.L. **PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony** (and other Methods) – Version 4, Sunderland, Massachusetts, 1998.

SOUZA FILHO, F. J.; LOPES, M.; ALMEIDA, O. P. SCULLY, C. Mucocutaneous histoplasmosis in SIDA. **British Journal of Dermatology**, v.133, p.472-474, 1995.

SPITZER, E.D. KEATH, E.J.; TRAVIS, S.J.; PAINTER, A.A.; KOBAYASHI, G.S.; MEDOFF, G. Temperature-sensitive variants of *Histoplasma capsulatum* isolated from patients with acquired immunodeficiency syndrome. **J. Infect. Dis.**, v.162, p.258-261, 1990.

SPITZER, E.D., LASKER, B. A., TRAVIS, S. J., KOBAYASHI, G. S., MEDOFF, G. Use of mitochondrial and ribosomal DNA polymorphism to classify clinical and soil isolates of *Histoplasma capsulatum*. **Infect. Immun.**, v. 57, p.1409-1412, 1989.

STEELE, P. E., CARLE, G. F., KOBAYASHI, G. S., MEDOFF, G.: Electrophoretic analysis of *Histoplasma capsulatum* chromosomal DNA. **Mol. Cell. Biol.** v.9, p.983-987, 1989.

STRASSER, J.E.; NEWMAN, S.L.; CIRAOLA, G.M.; MORRIS, R.E.; HOWELL, M.L.; DEAN, G.E. Regulation of the macrophage vacuolar ATPase and phagosome-lysosome fusion by *Histoplasma capsulatum*. **J. Immunol.** v.162, p.6148-6154, 1999.

SULLIVAN, A.A.; BERNSON, S.M.; EWART, A.H., HOGAN, P.G.; WHITBY, R.M.; BOYLE, R.S. Cerebral histoplasmosis in an Australian patient with systemic lupus erythematosus. **Med. J. Australia.** v.169, p.201-202, 1998.

SZANISZLO, PJ, editor: Fungal dimorphism: with emphasis on fungi pathogenic for humans, New York, Plenum Press, 1985.

TAMURA, M.; KASUGA, T.; WATANABE, K.; KATSU, M.; MIKAMI, Y.; NISHIMURA, K. Phylogenetic characterization of *Histoplasma capsulatum* strains based on ITS region sequences, including two new strains from Thai and Chinese patients in Japan. **Japanese Journal of Medical Mycology.** v.43(1), p.11-19, 2002.

TARAZONA, A.R.S.; FLORES, J.L.M.; RIVADENEYRA, D.G.; GARCIA, J.C. Histoplasmosis gástrica simulando uma úlcera gástrica maligna - Reportes de casos clínicos. **Rev. Gastroenterol. Perú**, v.23, n.3, Lima: july/set, 2003

TAYLOR, M.L.; CHAVEZ-TAPIA, C.B.; REYES-MONTES, M.R. Molecular typing of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in Mexico. **Fungal Genetics and Biology**, v.30(3), p. 207-212, 2000.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIA, K.F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v.24, p.4876-4882, 1997.

TIAGO, P. de T.; dos Santos, J.I.; STEINDEL, M. Histoplasmosis in the region of the hard palate simulating a lesion caused by leishmania. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, p.225-229, 1998.

TIAN, X.; SHEARER, G. Jr.: Cloning and analysis of mold-specific genes in the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. **Gene**, v.275(1), p.107-114, 2001.

TIAN, X.; SHEARER, G. Jr.: The mold-specific *MS8* gene is required for normal hyphal formation in the dimorphic fungus, *Histoplasma capsulatum*. **Eukaryotic Cell.**, v.1(2), p. 249-256, 2002.

TIECKE, R.W.; BARON, H.J.; CASEY, D.E. Localized bucal histoplasmosis. **Journal of Bucal Surgery**, v.16, p.441-447, 1963.

TIMMERMAN, M.M., WOODS, J.P.; Potential role for extracellular glutathione-dependent ferric reductase in utilization of environmental and host ferric compounds by *Histoplasma capsulatum*. **Infect. Immun.** v. 69, p.7678, 2001.

TOTH, B.B.; FRAME, R.R. Bucal histoplasmosis: diagnostic complication and treatment. **Bucal Surgery**, v.55, p.597-600, 1983.

UEDA, Y.; SANO, A.; TAMURA, M.; INOMATA, T.; KAMEI, K.; YOKOYAMA, K.; KISHI, F.; ITO, J.; MIKAMI, Y.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K. Diagnosis of histoplasmosis by detection of the internal transcribed spacer region of fungal rRNA gene from a paraffin-embedded skin sample from a dog in Japan. **Veterinary Microbiology**, v.94(3), p.219-224, 2003.

UIJTHOF, J. M. J.; HOOG, G. S. de. PCR – Ribotyping of type isolates os currently accepted *Exophiala* and *Phaeococcamyces* species. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.68, p.35-42, 1995.

UIJTHOF, J. M. J.; HOOG, G. S. de; COCK, A. W. A. M. de; TAKEO, K.; NISHIMURA, K. Pathogenicity of strains of the black yeast *Exophiala (Wangiella)* dermatitidis: an evolution based on polymerase chain reaction. **Mycoses**, v.37, p.235-242, 1994.

VAN GELDEREN DE KOMAID, A.; DURAN, E.L.; MADERO, A.M.; CARIZO, V. Histoplasmosis in northwestern Argentina. Epidemiological survey of Chuscha and La Higuera in the province of Tucuman. **Eur. J. Epidemiol.**, v.8, p.206-210, 1992.

VASCONCELOS, M. J. V. *et al.*, Differentiation of *Colletotrichum truncatum* isolates by random amplified polymorphic DNA. **Fitopatol. Bras.**, v. 19, p. 520-3, 1994.

VINCENT, R. D., GOEWERT, R., GOLDMAN, W. E., KOBAYASHI, G. S., LAMBOWITZ, A. M., MEDOFF, G.: Classification of *Histoplasma capsulatum* isolates by restriction fragment length polymorphism. **Journal of Bacteriology**, v.165, p.813-818, 1986.

VICENTE, V.A. **Isolamento e caracterização de fungos da cromoblastomicose**. ESALQ/USP (Tese Doutorado), Piracicaba, 181p., 2000.

- WATSON, J. D.; GILMAN, M.; WITKOSWSKI, J.; ZOLLER, M. **Recombinant DNA**. 2nd ed. NeW York: Freeman and Company. 1992.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, p.7213-7218, 1990.
- WHEAT, J. L. Histoplasmosis in the acquired immunodeficiency syndrome. **Curr Topics Med Mycol**, v.7, p.7, 1996.
- WHEAT, J. L.; CONNOLLY-STRINGFIELD, P. A.; BAKER, R. L. *et al.*, Disseminated histoplasmosis in the acquired immune deficiency syndrome. Clinical findings, diagnosis and treatment, and review of the literature. **Medicine**, v. 69, n. 6, p. 361-374, 1990.
- WHEAT, J.L. Laboratory diagnosis of histoplasmosis: update 2000. **Seminars in Respiratory infections**, v.16, p.131-140, 2001.
- WHEAT, J.L.; CONNOLLY-STRINGFIELD, P.; BLAIR, R.; CONNOLL, Y.T.; GARRINGER, T.; KATZ, BP. Histoplasmosis relapse in patientes with SIDA: detection using *Histoplasma capsulatum* var. *iety capsulatum* antigens levels. **Ann. Intern. Med.**, v.115, p.936-941, 1991
- WHEAT, L.J. Histoplasmosis: recognition and treatment. **Clin. Infect. Dis.**, v.19, p.S19-S27, 1994.
- WHITE Jr., J. F.; MORROW, A. C. Endophyte-host associations in forage grasses. XII. A fungal endophyte of *Trichachne insularis* belonging to *Pseudocercospora*. **Mycologia**, Lawrence, v.82, p.218-226, 1990.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGLEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary *primers* are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, p. 6531-6535, 1990.
- WOLF, J.E.; KERCHBERGER, V.; KOBAYASHI, G.S.; LITTLE, J.R. Modulation of the macrophage oxidative burst by *Histoplasma capsulatum*. **J. Immunol.** v.138, p.582-586, 1987.
- WOODS, J.P.: *Histoplasma capsulatum*: Molecular genetics, pathogenesis and responsiveness to environment. **Fungal Genetic Biology**, v.35, p.81-97, 2002.
- WOODS, J.P.; CALDERONE, R.A. (ed.); CIHLAR, R.L. Dimorphism in human pathogens. **Fungal pathogenesis: principles and clinical applications**, p.99-113, 2002.
- WOODS, J.P.; HEINECKE, E.L.; LUECKE, J.W.; MALDONADO, E.; NG, J.Z.; RETALLACK, D.M.; TIMMERMAN, M.M.: Pathogenesis of *Histoplasma capsulatum*. **Semin. Respir. Infect.**, v.16, p.91-101, 2001.

WOODS, J.P.; KERSULYTE, D.; GOLDMAN, W. E.; BERG-DOUGLAS, E. Fast DNA isolation from *Histoplasma capsulatum*: Methodology for arbitrary primer polymerase chain reaction-based epidemiological and clinical studies. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31(2), p.463-464, 1993.

XUE, B.; GOODMAN, P.H.; ANNIS, S.L. Pathotype identification of *Leptosphaeria maculans* with PCR and oligonucleotide primers from ribosomal internal transcribed spacers sequences. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v.41, p.179-188, 1992.

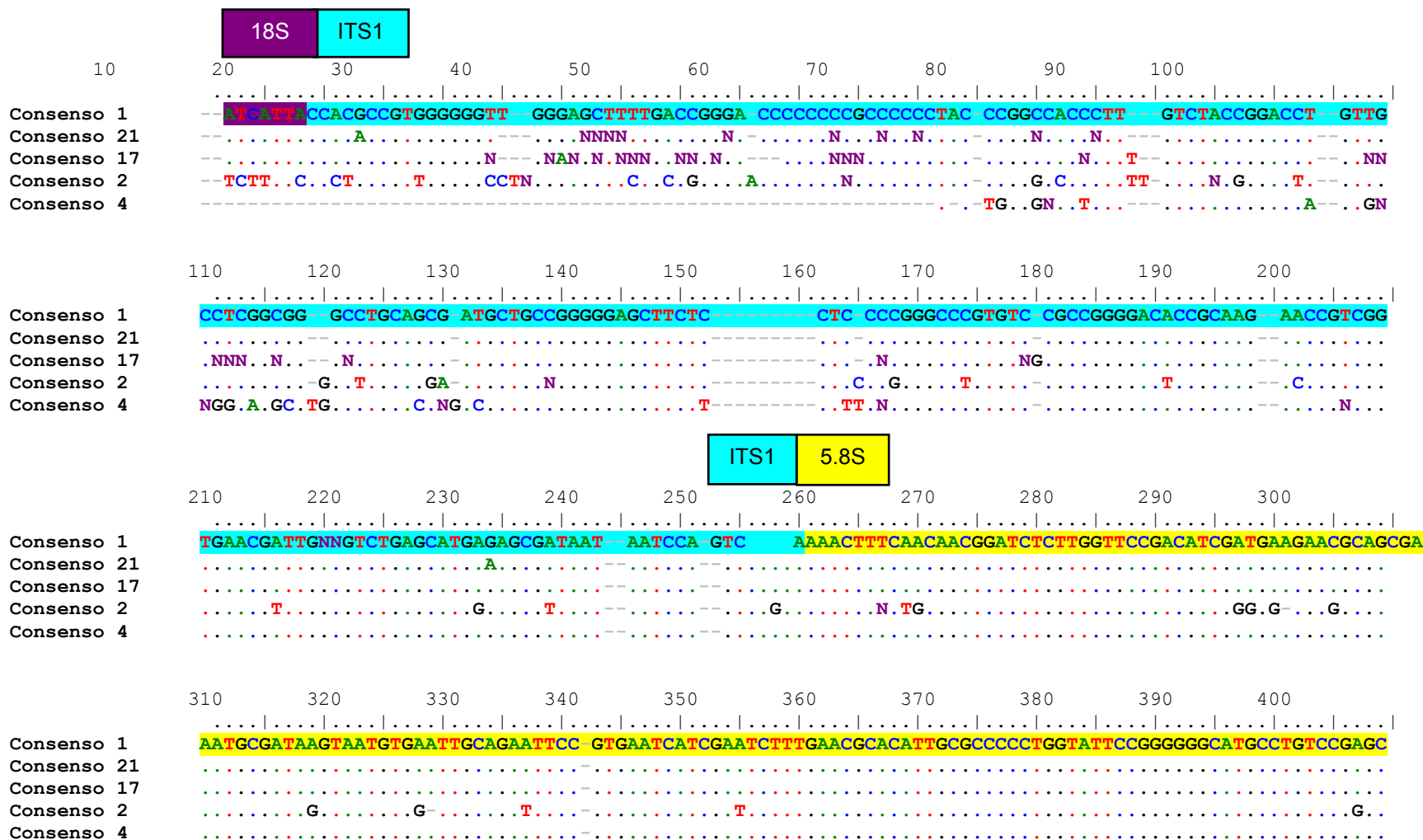
ZIEGLER, E.E. Histoplasmosis of Darling: review and case report with autopsy. **Annals of Internal Medicine**. v.24, p.1073-1084, 1946.

ANEXOS

ANEXO I - SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS OBTIDAS NO GENBANK

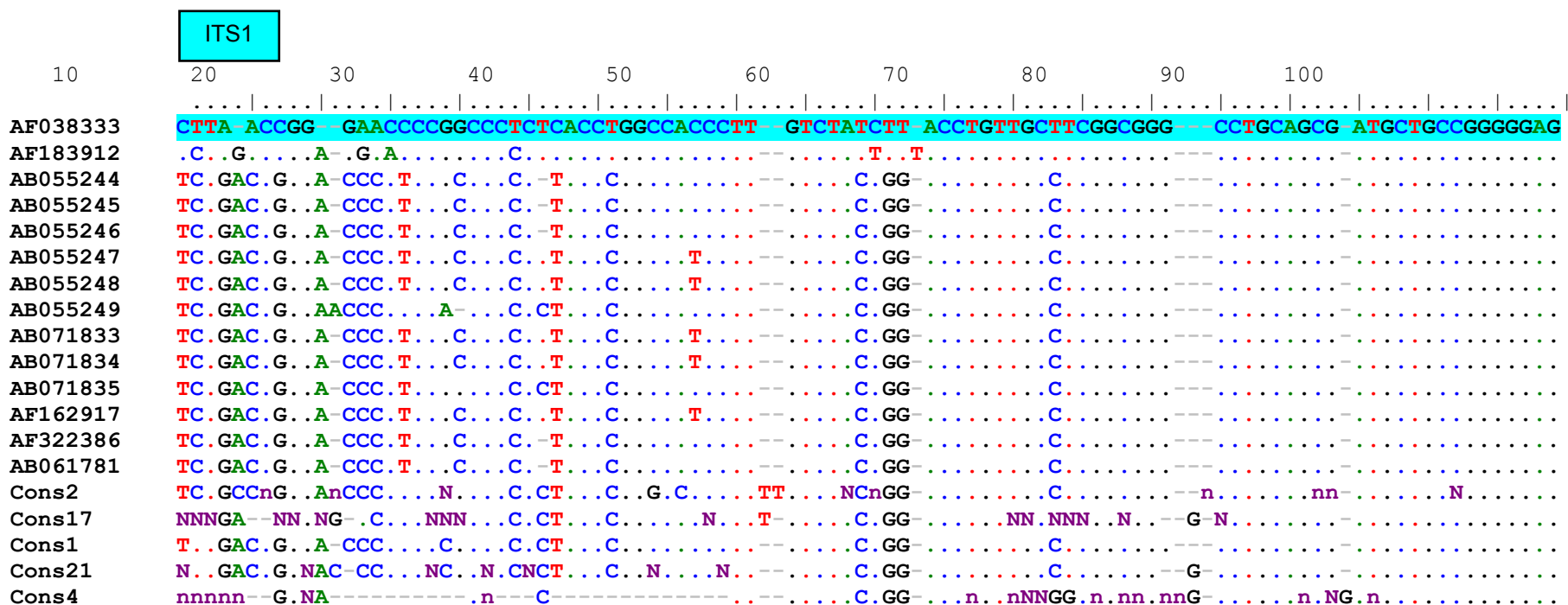
Código	Linhagem	Origem	Isolado	Código <i>GenBank</i>	Ref.
1	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Japão	IFM49109	AB055244	TAMURA, 2002
2	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Japão	IFM47750	AB055245	TAMURA, 2002
3	<i>Histoplasma capsulatum</i> <i>var. duboisii</i>	Desc.	IFM5415	AB055248	TAMURA, 2002
4	<i>Ajellomyces capsulatus</i> <i>var. duboisii</i>	Desc.	H87	AB071833	TAMURA, 2002
5	<i>Ajellomyces capsulatus</i> <i>var. duboisii</i>	Desc.	IFM41332	AB071834	TAMURA, 2002
6	<i>Histoplasma capsulatum</i> <i>var. duboisii</i>	África do Sul	H143	AB055246	TAMURA, 2002
7	<i>Histoplasma capsulatum</i> <i>var. duboisii</i>	Senegal	H147	AB055247	TAMURA, 2002
8	<i>Ajellomyces capsulatus</i> <i>var. duboisii</i>	Uganda	IFM50954	AB071835	TAMURA, 2002
9	<i>Ajellomyces capsulatus</i> <i>var. duboisii</i>	Bélgica	H88	AB061781	TAMURA, 2002
10	<i>Ajellomyces capsulatus</i> <i>var. duboisii</i>	Bélgica	H88	AF322386	KASUGA, 2000
11	<i>Ajellomyces capsulatus</i> <i>var. duboisii</i>	desc.	-	AF162917	IWEN, 1999a
12	<i>Histoplasma capsulatum</i> <i>var. farciminosum</i>	Egito	H95	Ab055249	TAMURA, 2002
13	<i>Ajellomyces dermatitidis</i>	Desc.	-	AF183912	IWAN, 1999b
14	<i>Emmonsia parva</i>	Desc.	-	AF038333	PETERSON, 1998

ANEXO II - Alinhamento das regiões ITS, 5.8S e ITS do DNA ribossômico dos isolados de *H. capsulatum*. Programa de alinhamento utilizado “Clustal S W” (THOMPSON et al., 1997).





ANEXO III -Alinhamento das regiões ITS, 5.8S e ITS do DNA ribossômico dos isolados de *H. capsulatum* deste estudo e seqüências pré-existentes no bando de dados (*GenBank*). Programa de alinhamento utilizado “Clustal W 1.8” (THOMPSON et al.,1997).



ITS1	5.8S
------	------

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200

AF038333 TCT GTC CCCGGG CTCGTGCC CGCCGAGGACACCACAAGAACCTCTGGTGAACGATTGACGCTGAA ATGATAACTATAAT CAGTTAAAA

AF183912 .T.TCA G.T T. A. G-AA

AB055244 CT.TTC C. T. G. G. GTC G. GC G.G.G AATC C.

AB055245 CT.TTC C. T. G. GT GTC G. GC G.G.G AATC C.

AB055246 CT.CTC C. T. G. G. GTC G. GC G.G.G AATC C.

AB055247 CT.CTT T. G. G. GTC G. GC A.G.G.G AATC

AB055248 CT.CTT T. G. G. GTC G. GC A.G.G.G AATC

AB055249 CT.CTC C. T. G. G. GTC G. GC G.G.G AATC C.

AB071833 CT.CTT T. G. G. GTC G. GC A.G.G.G AATC

AB071834 CT.CTT T. G. G. GTC G. GC A.G.G.G AATC

AB071835 CT.CTC C. T. G. G. GTC G. GC G.G.G AATC C.

AF162917 CT.CTT T. G. G. GTC G. GC A.G.G.G AATC

AF322386 CT.CTC C. T. G. G. GTC G. GC G.G.G AATC C.

AB061781 CT.CTC C. T. G. G. GTC G. GC G.G.G AATC C.

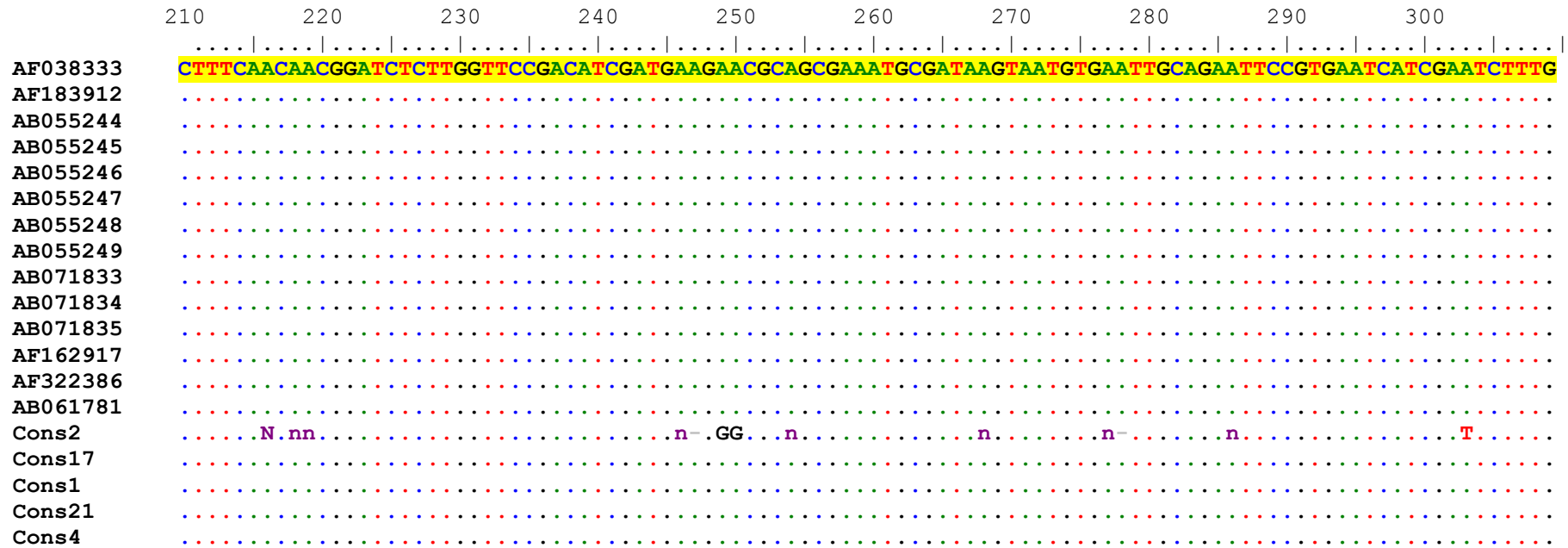
Cons2 CT.CTC C. T. G. n.G. C.GTC n.G. GC nG.G.GT AATC C.n.

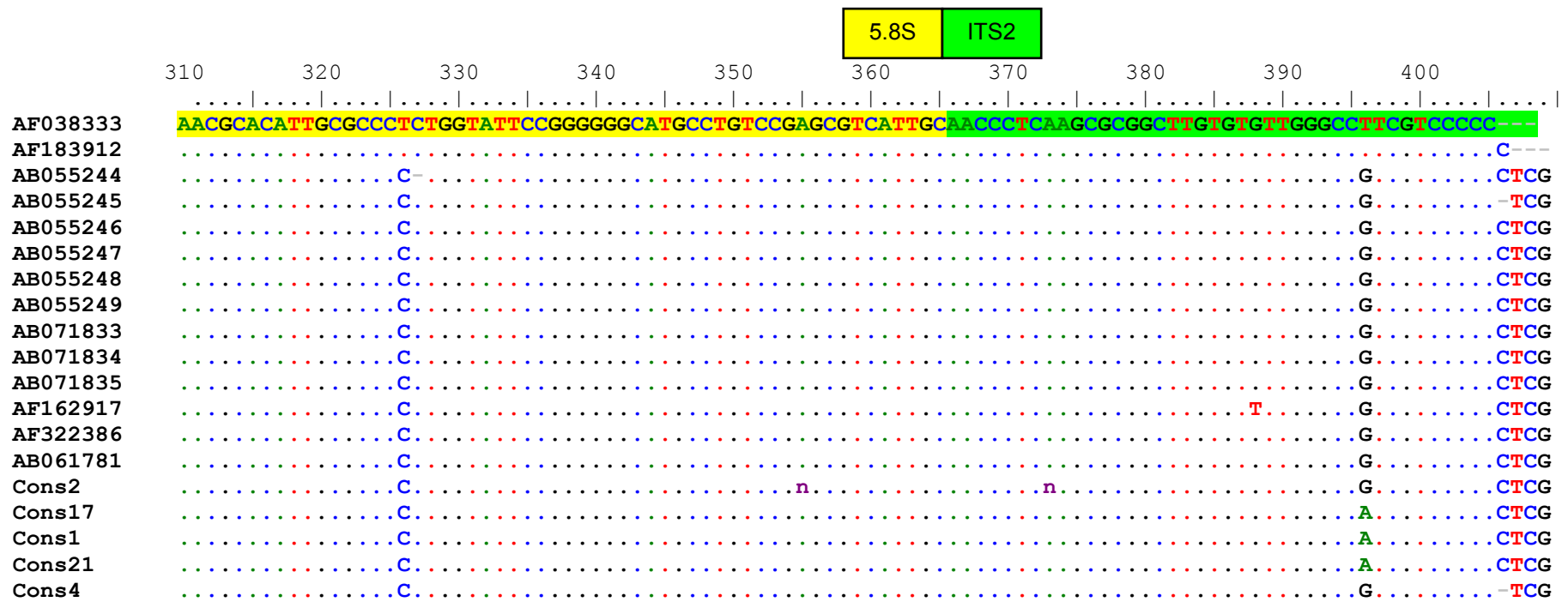
Cons17 CT.CTC N. C. TNG. G. G. GTC G. GC G.G.G AATC C.

Cons1 CT.CTC C. T. G. G. GTC NN. GC G.G.G AATC C.

Cons21 CT.CTC C. T. G. G. GTC GC A.G.G AATC C.

Cons4 CT.CTn TT.N. C. T. G. G. GNC. G. GC G.G.G AATC C.





ITS2

410 420 430 440 450 460 470 480 490

AF038333 ---G-TGGACGTGCCG-GAAATGCAGC-GGCGGGCTCGTGTCCGGTG-CCCGAGCGTATGGGGCTTT-GTCACCCGCT-CTAGAGGCC

AF183912 ---T---

AB055244 ACC.GCG..G.....T.....T.....A.....C.....G.....

AB055245 ACC.GCG.....T.....A.....C.....G.....

AB055246 ACC.GCG.....T.....T.....A.....C.....G.....

AB055247 ACC.GCG.....T.....T.....A.....C.....G.....

AB055248 ACC.GCG.....T.....T.....A.....C.....G.....

AB055249 ACC.GCG.....T.....T.....A.....C.....G.....

AB071833 ACC.GCG.....T.....T.....A.....C.....G.....

AB071834 ACC.GCG.....T.....T.....A.....C.....G.....

AB071835 ACC.GCG.....T.....T.....A.....C.....G.....

AF162917 ACC.GCG..T...C.....TT.....T.....A.....TGC.....AT.....C.....G..A.....

AF322386 ACC.GCG.....T.....T.....A.....C.....G.....

AB061781 ACC.GCG.....T.....T.....A.....C.....G.....

Cons2 ACC.GCG.....n.....T..CG..T.....A.....n.....C.n.....nn.....

Cons17 ACC.GCG.....T.....T.....A.....N.....C.....GA.A.G.....

Cons1 ACC.GCG.....T.....T.....A.....NC.....G.....

Cons21 ACC.GCG.....NT.....T.....A.....T.C.....N.....G.....

Cons4 ACC.GCG.....T.....T.....A.....C.....G.....

ANEXO IV - Artigo “Variabilidade genética em isolados de *Histoplasma capsulatum* do Brasil”.

VARIABILIDADE GENÉTICA EM ISOLADOS DE *Histoplasma capsulatum* DO BRASIL

ELAINE CRISTINA MARTINS IMANO¹, VÂNIA APARECIDA VICENTE² *, CHIRLEI GLIENKE-BLANCO³, RICARDO L. R. DE SOUZA⁴, ROSANGELA LAMERA PINHEIRO⁵, WALTER A. BOEGER⁶, FLÁVIO QUEIROZ TELLES⁷, ZOILO PIRES DE CAMARGO⁸.

Departamento de Patologia Básica – Setor de Ciências Biológicas – UFPR^{1, 2}, Laboratório de Micologia - Setor de Ciências de Saúde – UFPR^{5, 7}, Departamento de Genética – Setor de Ciências Biológicas – UFPR^{3, 4}, Departamento de Zoologia – Setor de Ciências Biológicas – UFPR⁶, Escola Paulista de Medicina, Departamento de Biologia Celular, UNIFESP⁸.

Autor correspondente: vicente@ufpr.br - Universidade Federal do Paraná, Centro

Politécnico, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Patologia Básica, Jardim das Américas, caixa postal: 19031, CEP: 81531-900, Curitiba – PR.

Resumo

A histoplasmose é uma infecção fúngica de caráter oportunista, com evolução aguda ou crônica capaz de acometer aves, homem e outros mamíferos e seu agente etiológico é o *Histoplasma capsulatum*. Métodos de identificação de isolados de *H. capsulatum* utilizando características morfológicas e teste de reversibilidade são influenciados diretamente pelo tempo e técnicas de cultivo o que pode dificultar a identificação precisa do agente. Dentro deste contexto este trabalho objetivou a caracterização de isolados clínicos de *H. capsulatum* por meio de técnicas moleculares, utilizando marcadores RAPD e seqüenciamento de regiões ITS do DNAr visando à elucidação taxonômica, estudo da variabilidade genética e um melhor entendimento da relação de isolados *H. capsulatum*, de diferentes procedências, com seus hospedeiros. Foram avaliados 34 isolados de *H. capsulatum* oriundos de pacientes de três estados brasileiros e linhagens referências de *H. capsulatum* var. *capsulatum*, de *H. capsulatum* var. *duboisii* e de *Exophiala jeanselmei* como grupo externo, totalizando 37 amostras. Marcadores RAPD e seqüências ITS utilizados mostraram resultados congruentes, revelando polimorfismo entre os isolados e relação quanto à procedência. Isolados primários com dificuldade de reversão foram distribuídos nos diferentes grupos formados por RAPD e, a partir do seqüenciamento de regiões ITS verificou-se a ocorrência de similaridade genética entre isolados procedentes do Brasil e linhagens de *H. capsulatum* var. *farciminosum*.

Palavras chaves: *Histoplasma capsulatum*, variabilidade genética, RAPD, seqüências ITS.

Summary

Histoplasmosis is an opportunistic fungal infection characterized by acute or chronic evolution that is capable of affecting birds, humans and other mammals whose etiological agent is *Histoplasma capsulatum*. Methods for the identification of isolates of *H. capsulatum* using morphological characteristics and reversibility tests are

directly influenced by the time and the culture techniques, possibly hampering the precise identification of the agent. In this context, the objective of the present study was the characterization of clinical isolates of *H. capsulatum* through molecular techniques, using RAPD markers and sequencing the ITS region of the rDNA, to elucidate the taxonomic position, to assess the genetic variability, and to understand the relationships between the isolates of *H. capsulatum* from different sources and their hosts. Thirty-four isolates of *H. capsulatum* obtained from patients of three Brazilian states, were combined with reference lineages of *H. capsulatum* var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii*, and *Exophiala jeanselmei* that were used as the outgroup, for a total of 37 samples. RAPD markers and ITS sequences showed congruent results, revealing polymorphism among the isolates with respect to their origin. Primary isolates that had difficulty in reversing were distributed among the different groups from the RAPD analysis. Also, the sequencing of the ITS region showed a genetic similarity between isolates from Brazil and the strains of *H. capsulatum* var. *farciminosum*.

Keywords: *Histoplasma capsulatum*, genetic variability, RAPD, ITS sequences.

Introdução

A histoplasmose é uma infecção fúngica, de caráter oportunista, com evolução aguda ou crônica, capaz de acometer aves, homem e outros mamíferos, causada pelo fungo *H. capsulatum* [17, 21, 28] caracterizada por manifestações subclínicas com resolução residual pulmonar e dependendo da exposição durante o contágio, da variedade do agente e ou das características imunológicas do hospedeiro, a patogênese pode manifestar-se com clínica pulmonar aguda de variável gravidade [17, 20].

Os métodos utilizados para o cultivo do *H. capsulatum* afetam diretamente sua morfologia, esporulação e habilidade de dimorfismo [12, 14, 18, 20, 28, 32, 35, 36] o que dificulta sua identificação [2, 11]. Sendo assim, a caracterização morfológica das colônias não deve ser usada como um critério único na identificação do agente etiológico desta enfermidade. Dentro desse contexto, métodos moleculares são de fundamental importância. O uso de marcadores RAPD pode fornecer subsídios na confirmação da identificação destes agentes além de possibilitar estudo da variabilidade genética de isolados de diferentes procedências [2, 9, 11, 12, 17, 18, 23, 31, 20]. Como instrumento auxiliar na confirmação dos dados obtidos por RAPD, o uso de seqüências ITS do DNAr permite também a identificação das relações filogenéticas e tem representado um grande avanço no estudo desses fungos [8, 10, 13, 19, 22, 25, 26, 30, 33].

Dessa forma, seqüências ITS e marcadores RAPD foram utilizados visando à elucidação taxonômica, estudo da variabilidade genética e um melhor entendimento da relação de isolados *H. capsulatum* de diferentes procedências com seus hospedeiros, além de possibilitar inferências sobre a evolução e epidemiologia da doença.

Materiais e Métodos

Culturas: Foram utilizados 37 fungos, incluindo isolados de pacientes de diferentes procedências e linhagens referência, listados nas tabelas 1 e 2.

Extração e Quantificação do DNA Total: Amostras de micélio do fungo crescidas por 10 dias a 25°C foram processadas segundo a metodologia preconizada [1].

RAPD: Os *primers* OPA9 (5'-GGGTAACGCC-3'), OPA 10 (5'-GTGATCGCAG-3'), OP13 (5'-CAGCACCCAC-3'), OPX 14 (5'-ACAGGTCCTG-3'), POA16 (5'-AGCCAGCGAA-3') e OPX 17 (5'-GACACGACC-3') [37] foram utilizados em reações de 15µl contendo 1,5 unidades da enzima Taq DNA polimerase (*Invitrogen*[®]); 25mM para cada dNTP; 3,0 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂); 0,4µM de *primer*, 20 mM de Tris-HCL pH 8,4; 5mM KCL e

10ng de DNA; submetidas a 40 ciclos de um minuto a 92°C, um minuto e 30 segundos a 37°C e dois minutos a 72°C, com desnaturação inicial de quatro minutos a 92°C e extensão final de três minutos a 72°C.

A análise do polimorfismo obtido por RAPD foi verificada feneticamente por meio do método de “Agrupamento” (UPGMA) [16] utilizando coeficiente de similaridade de Jaccard por meio do programa NTSYS versão 2.1 (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) [24] e a consistência dos agrupamentos foi verificada pelo *bootstrap* [4], utilizando o *Software BOOD* [3] e filogeneticamente por meio do método de Máxima Parcimônia [16], utilizando o programa *PAUP**4.0b10 [29] e pesagem seletiva. No método UPGMA, as bandas foram consideradas como variáveis enquanto as linhagens como unidades. Foram utilizadas 10.000 amostragens com reposição dos dados dos marcadores. Apenas os agrupamentos que apresentaram P maior ou igual a 70% foram considerados consistentes. Para testar a significância dos grupos formados no método de “Agrupamento” foi realizada uma ANOVA utilizando o programa ARLEQUIM 2000 [27].

Seqüenciamento da Região ITS1-5.8S-ITS2 do DNAr: Para obtenção dos *amplicons* foram utilizados os *primers* V9G (3'-TTACgTCCCTgCCCTTTgTA-5') [7] e LS266 (3'-TTACgTCCCTgCCCTTTgTA-5') [15] em um volume de 50µL contendo 10 mM tris-HCL, pH 8,3; 50mM KCl; 1,5 mM MgCl₂ 6H₂O; 200mM de cada desoxinucleotídios trifosfatado; 50pmol de cada primer, 10-100ng de DNA total e 0,5U de taq DNA polimerase (*Invitrogen*[®]), submetidos a 30 ciclos (30 segundos de desnaturação a 94°C; um minuto de anelamento a 55°C; um minuto de síntese a 72°C), precedidos de dois minutos para a desnaturação inicial a 92°C e cinco minutos de extensão final a 72°C e os produtos da PCR foram purificados utilizando o kit de purificação de bandas e DNA (GTX PCR DNA, “Pharmacia”). Para o seqüenciamento foram utilizados 4µL do *mix bigdye terminator* (“Terminator Ready Reaction Mix” da “Perkin-Elmer Applied Biosystem”), 1µL (30 ng) de

produto de PCR purificado, 1 μ L (25ng/ μ L) do *primer* (ITS1: 3'-gTA ggT gAA CCT gCg g-5' [34] ou ITS4: 3'-TCC TCC gCT TAT TgA TAT gC-5' [34]) e 8 μ L água ultra pura a completar 10 μ L, para cada reação, utilizando 35 ciclos (30 segundos a 94°C, um minuto a 48°C e seis minutos a 60°C) precedidos de uma desnaturação inicial de um minuto a 94°C. O seqüenciamento foi realizado em seqüenciador automático ABI 377 (Applied Biosystem).

O alinhamento foi obtido utilizando o programa CLUSTALW e editadas manualmente com o programa BIOEDIT [6]. As seqüências obtidas foram comparadas com o banco de dados de seqüências do *Genbank* [5] utilizando a ferramenta BLASTr-r. Foi realizada uma análise de Máxima Parcimônia utilizando-se os programas DNAPARS (*DNA-Parsimony Program*) e CONSENSE (*Consensus tree program*) versão 3.573c [4] e uma análise Bayesiana utilizando o programa MrBayes [29], com quatro cadeias de Markov, taxa de amostragem de 1000 árvores, 20.000.000 gerações e burnin de 100 árvores.

Resultados

RAPD: Os seis *primers* utilizados geraram 85 bandas determinadas visualmente, sendo 7,1% monomórficas. O dendrograma obtido pelo método UPGMA, mostrou três grupos mais quatro indivíduos com baixo grau de similaridade genética (Figura 1A). No entanto, a maioria dos agrupamentos teve um baixo valor de *bootstrap* sugerindo que, provavelmente, os isolados 12, 23 e 29 existissem feneticamente intermediários aos grupos. Dessa forma, obteve-se um novo dendrograma (Figura 1B), apenas com os isolados de *H. capsulatum* var. *capsulatum* e sem os isolados 12, 23, 29. Com a exclusão desses, e também do grupo externo (linhagens 36 e 37), os demais isolados se reuniram em três grupos com valores de *bootstrap* mais consistentes (Figura 1B), que foram sustentados utilizando o método da AMOVA.

Os dados de RAPD também foram analisados filogeneticamente com base na análise de Máxima Parcimônia (Figura 2) que produziu 500 árvores igualmente parcimoniosas. A aplicação de pesagem seletiva baseada nos maiores valores de índice de consistência (IC) gerou uma única árvore enraizada com valores de *bootstrap* de ramos que variaram de 53% a 100%. Esta análise mostrou a formação de três grupos mais quatro indivíduos.

Seqüências ITS1-5.8S- ITS2 do DNAr: Para o seqüenciamento foram utilizadas a linhagem referência 1; o isolado 2, incapaz de expressar seu dimorfismo, o qual se tratava de uma cultura primária que perdeu sua capacidade de reversão, mesmo em meios enriquecidos; o isolado 4, que mostrou características dimórficas padrões da espécie; o isolado 17, que apresentou perfil de amplificação do RAPD similar ao isolado 2; e o isolado 21, que apresentou um perfil de amplificação do RAPD semelhante à linhagem referência de *H. capsulatum* var. *capsulatum*. Além desses foram utilizadas seqüências do *genbank* (tabela 3) que abrangeram linhagem de diversos países e regiões distintas.

A partir da análise de Máxima Parcimônia [16] pode-se observar a formação de três grupos (Figura 3A). O grupo 3AI reuniu a linhagem de *Ajellomyces dematitidis* (linhagem 13) e *Emmonsia parva* (linhagem 14), formando o grupo externo. O grupo 3AII reuniu cinco linhagens de *H. capsulatum* var. *duboisii* e o grupo 3AIII, 12 indivíduos podendo ser dividido em três subgrupos (3AIIIa, 3AIIIb, 3AIIIc), mais três indivíduos. Na análise Bayseana (Figura 3B) pode-se observar a formação, também, de três grupos. O grupo 3BI formou o grupo externo com as linhagens de *A. dematitidis* e *E. parva*. O grupo 3BII reuniu cinco linhagens de *H. capsulatum* var. *duboisii* e o grupo 3BIII reuniu 12 indivíduos também divididos em três subgrupos (3BI, 3BII,3BIII).

Discussão

Em relação às análises dos resultados obtidos a partir dos marcadores RAPD utilizando o método UPGMA, a AMOVA sugeriu a distinção entre os três grupos formados, pois 44,67% da variação foi observada entre eles, enquanto que 55,33% ocorreu dentro deles. Tais números se mostraram confiáveis, visto o valor de $p < 0.00001$. Além disso, o valor FST de 0.44667 sugeriu que existe grande divergência entre os grupos, reforçando os dados verificados no UPGMA. Não foi possível observar grupos que pudessem relacionar fortemente quadros clínicos da doença, preferência por sexo e idade do hospedeiro. Foi verificada, nessa análise, apenas a relação entre isolados originários do mesmo Estado, em subgrupos com coeficiente de similaridade acima de 90% (figura 1A e 1B). A análise de Máxima parcimônia para RAPD, sustentou-se essa relação, visto que os subgrupos, com altos valores de coeficiente de similaridade (figura 2), relacionaram na maioria das vezes, indivíduos originários dos mesmos Estados, apesar de também não formarem grupos distintos em congruência com o UPGMA. Tais resultados concordaram com a literatura [2, 9, 12, 17, 18, 20, 23, 31] que sugeriu que micro-habitats poderiam agir como fonte de infecção para animais de populações locais e que existe uma relação regional entre os diversos isolados relacionados geneticamente. A grande variabilidade genética encontrada sugere uma associação entre genótipo e áreas geográficas somente para regiões bem distintas, fato anteriormente relatado para diferentes países [2, 12]. Além disso, estes autores revelaram que linhagens da América do Sul apresentavam uma maior diversidade genética do que aquelas encontradas nos Estados Unidos. De acordo com as análises realizadas, provavelmente não foi possível estabelecer uma relação evidente entre os isolados e origem geográfica, pelo fato dos isolados, deste trabalho, pertencerem a regiões próximas, dentro do mesmo país. A análise de Máxima Parcimônia para RAPD reforçou os dados obtidos por UPGMA (Figuras 1A e 1B), pois sugeriu também que o isolado 12 era

muito diferente dos demais se agrupando, à parte, no grupo externo. Os resultados obtidos utilizando marcadores RAPD foram similares e complementares para as duas análises e os dados obtidos mostraram-se congruentes.

Pela análise de Máxima Parcimônia de seqüências ITS dos isolados 1, 2, 4, 17 e 21 (figuras 3A), pode-se perceber que os diferentes isolados *H. capsulatum* foram divididos em três grupos (3AI, 3AII, 3AIII), quando comparados com seqüências referências (*genbank*) onde os isolados em estudos formaram um subgrupo definido, de origem brasileira (subgrupo 3AIIIa), reforçando a sugestão da relação existente entre os isolados de *H. capsulatum* e a localização geográfica dos micro-habitats. O isolado 2, no entanto, mostrou-se mais distante dos demais isolados do Brasil, pois se reuniu em 100% das árvores, com a linhagem de *H. capsulatum* var. *farciminosum* originária do Egito (linhagem 12) (subgrupo 3AIIIb). A proximidade entre o isolado 2 e a linhagens de *H. capsulatum* var. *farciminosum* do Egito (linhagem 12), variedade essa que frequentemente ocorre em eqüinos, pode sugerir que o isolado 2 pertença a variedade de *H. capsulatum* var. *farciminosum* com um “fluxo” no Brasil ocorrendo em humanos. Tal hipótese pode ser reforçada pelos autores 28 e 34, que desconsideraram a relação de preferência por hospedeiro propondo que o *H. capsulatum*, de modo geral, pode infectar diversos mamíferos e aves, estando, a contaminação, mais relacionada ao micro-habitat do que necessariamente ao hospedeiro. Tais resultados foram reforçados por meio da análise Bayseana (figura 3B), na qual os isolados 2 e 4 revelaram-se, apesar de próximos evolutivamente, mais distantes dos demais isolados do Brasil, que formaram um subgrupo bastante consistente (subgrupo 3BIIIa). O isolado 2, no entanto, mostrou-se ainda mais distante evolutivamente sugerindo que possa pertencer a uma nova variedade do fungo. Tais resultados se mostraram relevantes apesar das análises de regiões ITS e de RAPD terem considerado variáveis diferentes, isto é, um maior número de linhagens referências,

de procedências geográficas diferentes e mais definidas e um menor número de isolados para o seqüenciamento de regiões ITS, aumentado, dessa forma, a amplitude do grupo e as possibilidades de agrupamento.

Dados encontrados pelos autores [8, 30] corroboram com os resultados obtidos, separando os isolados *H. capsulatum* das três variedades, em diferentes classes designadas de acordo com a origem geográfica do microrganismo. Tal hipótese pode vir a explicar a existência de isolados de variedade diferentes, evolutivamente próximos, sugerindo que esses poderiam estar relacionados aos micro-habitats de origem, possivelmente, comum.

Referências

1. Attili, D.S.; De Hoog, G.S., Pizzarani-Kleiner, A.A. rDNA-RFLP and ITS1 sequencing of species of the genus *Fonsecaea*, agents of chromoblastomycosis. **Med Mycol.**, v.36, p.219-225, 1998.
2. Carter, D.A.; Burt, A.; Taylor, J.W.; Koenig, G.L.; Dechairo, B.M.; White, T.J. A set of electrophoretic molecular markers for strain typing and population genetics studies of *Histoplasma capsulatum*. **Electrophoresis**, v.18, p.1047-1053, 1997.
3. Coelho, A.S.G. **Bood – Versão 3.04. Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distância/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap**. Goiânia: UFG, 2005.
4. Felsenstein, J. **PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c**. DNAPARS - DNA Parsimony Program. Seattle Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington. 1986 – 1993.
5. Genbank NHI - [International Nucleotide Sequence Database Collaboration](#). [Nucleic Acids Research](#), v.32(1), p.23-26, 2004.

6. Hall, T.A. **BioEdit 4.8**. Raleigh, 1997-2001. 1 arquivo (11,5M); Disponível em <
<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>> BioEdit: a user-friendly biological
sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Acesso em
março de 2005.
7. Hoog, G.S. de; Guerrits Van Den Ende, A.H.G.; Uijthof, J.M.J.; Untereiner, W.A.
Nutritional physiology of type isolates of currently accepted species of *Exophiala* and
Phacocacomyces. **Antonie van den Ende**, v.68, p.43-49, 1995b.
8. Jiang, B.; Bartlett, M.S.; Allen, S.D.; Smith, J.W.; Wheat, L.J.; Connolly, P.A. Lee, C. H.:
Typing of *Histoplasma capsulatum* isolates based on nucleotide sequence variation in
the internal transcribed spacer regions of r RNA genes. **Journal of Clinical
Microbiology**, v. 38(1), p.241-245, 2000.
9. Karimi, K.; Wheat, L.J.; Connolly, P.; Cloud, G.; Hajjeh, R.; Wheat, E.; Alves, K.; Lacaz,
C. da S.; Keath, E.; da S. Lacaz, C. Differences in histoplasmosis in patients with
acquired immunodeficiency syndrome in the United States and Brazil. **Journal of
Infectious Diseases**, v. 186(11), p.1655-1660, 2002.
10. Kasuga, T.; Taylor, J.W.; White, T.J.: Phylogenetic relationship of varieties and
geographical groups of the human pathogenic fungal *Histoplasma capsulatum* Darling.
Journal of Clinical Microbiology, v.37, p.653-663, 1999.
11. Keath, E.J., Kobayashi, G.S., Medoff, G.: Typing of *Histoplasma capsulatum* by
restriction fragment length polymorphism in a nuclear gene. **Journal of Clinical
Microbiology**, v.30, p.2104-2107, 1992.
12. Kersulyte, D.; Woods, J.P.; Keath, E.J.; Goldman, W.E.; Berg, D.E.: Diversity among
clinical of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary
primers. **Journal of Bacteriology**, v.174, p.7075-7079, 1992.

13. Leclerc, M.C.; Philippe, H.; Gueho, E. Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. **Journal of Medical & Veterinary Mycology**, v.32(5), p.331-341, (1994).
14. Lima, R.F. de; Borba, C. de M.; de Lima, R.F. Viability, morphological characteristics and dimorphic ability of fungi preserve by different methods. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.18(4), p.191-196, 2001.
15. Masclaux, F.; Guéro, E.; Hoog, G.S. de. Phylogenetic relationships of human pathogenic *Cladosporium (xylohypha)* species infened from partial LSU rDNA sequences. **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v.33, p.327-338, 1995.
16. Meyer, D. Árvores evolutivas humanas: Uma discussão sobre inferência filogenética. **Série Monografias**, n.3, 1995.
17. Muniz, M.M.; Pizzini, C.V.; Peralta, J.M.; Reiss, E.; Zancopé-Oliveira, R.M. 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. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39(12), p.4487-4494, 2001.
18. Perrotta, D.; Abrantes, R.; Canteros, C.; Rodero, L.; Davel G. Molecular characterization of isolates of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* by RAPD-PCR in Argentina. **Revista Argentina de Microbiologia**, v.33(3), p.160-166, 2001.
19. Peterson, SW.; Sigler L. Molecular genetic variation in *Emmonsia crescens* and *Emmonsia parva*, etiologic agents of adiaspiromycosis, and their phylogenetic relationship to *Blastomyces dermatitidis* (*Ajellomyces dermatitidis*) and other systemic fungal pathogens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36(10), p.2918-2925, (1998).

20. Poonwan, N.; Imai, T.; Mekha, N.; Yazawa, K.; Mikami, Y.; Ando, A.; Nagata, Y. Genetic analysis of *Histoplasma capsulatum* strains isolated from clinical specimens in Thailand by a PCR-Based Random Amplified Polymorphic DNA Method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36(10), p.3073-3076, 1998.
21. Ramdial, P. K.; Mosam, A.; Dlova, N. C.; Satar, N. B.; Aboobaker, J.; Singh, S. M. Disseminated cutaneous histoplasmosis in patients infected with human immunodeficiency virus. **Journal of Cutaneous Pathology**, v.29, p. 215-225, 2002.
22. Reid, T.M; Schafer, M.P. Direct detection of *Histoplasma capsulatum* in soil suspensions by two-stage PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v.13(4), p. 269-273, 1999.
23. Reyes-Montes, M.R.; Bobadilla Del Valle, M.; Martinez Rivera, M.A.; Rodriguez Arellanes, G.; Maravilla, E.; Sifuentes Osomio, J.; Taylor, M.L. Relatedness analyses of *Histoplasma capsulatum* isolates from Mexican patients with SIDA-associated histoplasmosis by using histoplasmin electrophoretic profiles and randomly amplified polymorphic DNA patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, v .37(5), p.1404-1408, 1999.
24. Rohlf, F.J. **NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system – Version 2.1**. New York, Applied Biostatistic Inc., 44 p., 2000.
25. Sano, A.; Miyaji, M. Canine histoplasmosis in Japan. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v.44(4), p.239-243, 2003.
26. Sano, A.; Ueda, Y.; Inomata, T.; Tamura, M.; Ikeda, T.; Kamei, K.; Kiuchi, A.; Mikami, Y.; Nishimura, K.; Miyaji, M. Two cases of canine histoplasmosis in Japan. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v. 42(4), p.229-235, 2001.

27. Schneider, S.; Roessli, D.; Excoffier, L. **Arlequin ver. 2000: A software for population genetic data analysis. Genetics and biometry laboratory.** University of Geneva. Geneva, Switzerland, 2000.
28. Silva-Vergara, M.L.; Martinez, R.; Malta, M.H.B.; Maffei, C.M.L.; Ramirez, L.E. *Histoplasma capsulatum* isolated from *Didelphis albiventris* (marsupialia: Didelphidae) in the state of Minas Gerais, Brazil. **Revista Iberoamericana de Micologia.**, v.18(4), p.180-182, 2001.
29. Swofford, D.L. **PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony** (and other Methods) – Version 4, Sunderland, Massachusetts, 1998.
30. Tamura, M.; Kasuga, T.; Watanabe, K.; Katsu, M.; Mikami, Y.; Nishimura, K. Phylogenetic characterization of *Histoplasma capsulatum* strains based on ITS region sequences, including two new strains from Thai e Chinese patients in Japan. **Japanese Journal of Medical Mycology.** v.43(1), p.11-19, 2002.
31. Taylor, M.L.; Chavez-Tapia, C.B.; Reyes-Montes, M.R. Molecular typing of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in Mexico. **Fungal Genetics and Biology,** v. 30(3), p. 207-212, 2000.
32. Tian, X.; Shearer, G. Jr.: The mold-specific *MS8* gene is required for normal hyphal formation in the dimorphic fungus, *Histoplasma capsulatum*. **Eukaryotic Cell.**, v.1(2), p. 249-256, 2002.
33. Ueda, Y.; Sano, A.; Tamura, M.; Inomata, T.; Kamei, K.; Yokoyama, K.; Kishi, F.; Ito, J.; Mikami, Y.; Miyaji, M.; Nishimura, K. Diagnosis of histoplasmosis by detection of the internal transcribed spacer region of fungal rRNA gene from a paraffin-embedded skin sample from a dog in Japan. **Veterinary Microbiology,** v.94(3), p.219-224, 2003.

34. White Jr., J. F.; Morrow, A. C. Endophyte-host associations in forage grasses. XII. A fungal endophyte of *Trichachne insularis* belonging to *Pseudocercospora*. **Mycologia**, Lawrence, v.82, p.218-226, 1990.
35. Woods, J.P.: *Histoplasma capsulatum*: Molecular genetics, pathogenesis and responsiveness to environment. **Fungal Genetic Biology**, v.35, p.81-97, 2002.
36. Woods, J.P.; Calderone, R.A. (ed.); Cihlar, R.L. Dimorphism in human pathogens. **Fungal pathogenesis: principles and clinical applications**, p.99-113, 2002.
37. VICENTE, V.A. **Isolamento e caracterização de fungos da cromoblastomicose**. ESALQ/USP (Tese Doutorado), Piracicaba, 181p., 2000.

TABELA 1 - LINHAGENS-REFERÊNCIA UTILIZADAS NESTE ESTUDO

Código	Linhagem	Origem	Procedência
(1) Golnara ^(a)	<i>H. capsulatum</i>	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – FioCruz	Rio de Janeiro
(36) ^(b)	<i>H. duboisi</i>	Universidade Federal do Paraná	Curitiba-Pr
(37) ^(b)	<i>Exophiala jeanselmei</i>	Universidade Federal do Paraná	Curitiba-Pr

Linhagens cedidas pelos pesquisadores: ^(a) Dra. Rosely M. Zancopé-Oliveira – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – FioCruz, Rio de Janeiro/RJ; ^(b) Dr. Flávio Queiroz Telles – Hospital de Clínicas – Curitiba/PR.

TABELA 2 - ISOLADOS UTILIZADOS NESTE ESTUDO

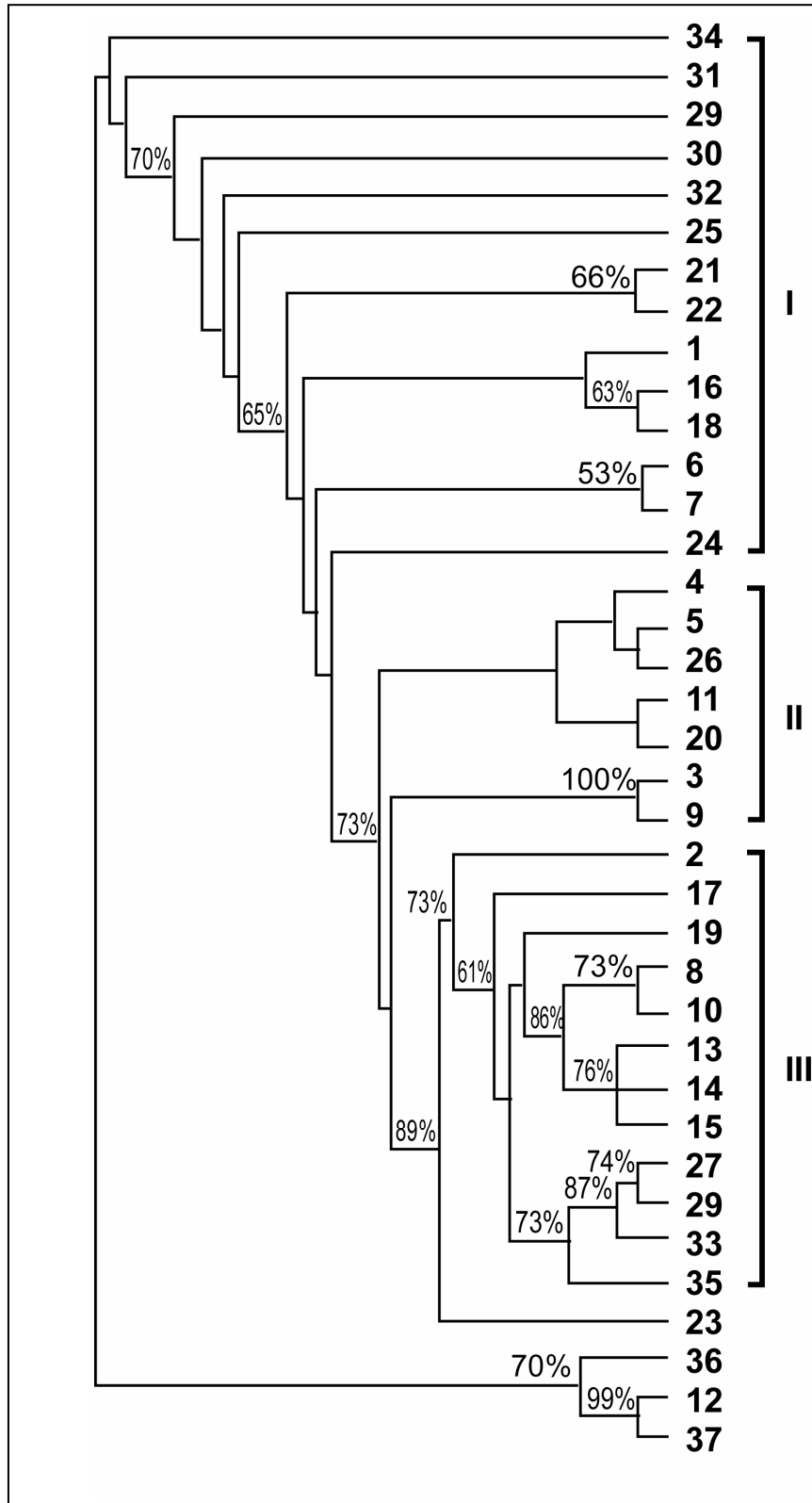
Código	Isolado	Quadro clínico	Isolamento	Origem
(2) ^(a)	190 R	Tuberculose/Imunocompetente		Curitiba – Pr
(3) ^(a)	Hca 20	Pancitopenia/Imunocompetente	Medula óssea	Curitiba – Pr
(4) ^(a)	Hca 23	UTI pediátrica-DVE/Imunocompetente	Líquor	Curitiba – Pr
(5) ^(a)	Hca 24	Neuroinfecção/Imunocompetente	Líquor	Curitiba – Pr
(6) ^(a)	Hca25 I	Febre - HIV +	Medula	Curitiba – Pr
(7) ^(a)	Hca25 II	Febre - HIV +	Sangue	Curitiba – Pr
(8) ^(d)	Hc 19	HIV +	Pústula de mão	Ubatuba – SP
(9) ^(d)	Hc 20	HIV +	medula óssea	Ubatuba – SP
(10) ^(d)	Hc 21	Imunocompetente	Biópsia de pele	Ubatuba – SP
(11) ^(e)	Hc 49	HIV +	Lavado brônquico	Rio de Janeiro
(12) ^(b)	Hc 55	HIV +	Medula	Espírito Santo
(13) ^(b)	Hc 56	HIV +	Medula	Espírito Santo
(14) ^(b)	Hc 59	HIV +	Medula	Espírito Santo
(15) ^(b)	Hc 61	HIV +	Medula	Espírito Santo
(16) ^(b)	Hc 62	HIV +	Medula	Espírito Santo
(17) ^(e)	Hc 197	Imunocompetente	Desconhecido	Rio de Janeiro
(18) ^(e)	Hc 212	Meningite/ Imunocompetente	Líquor	Rio de Janeiro
(19) ^(b)	Hc 249	HIV +	Medula óssea	Espírito Santo
(20) ^(b)	Hc 250	Imunocompetente	Pulmão	Espírito Santo
(21) ^(e)	Hc 268	Meningite/Imunocompetente	Líquor	Rio de Janeiro
(22) ^(e)	Hc 340	HIV +	Líquor	Rio de Janeiro
(23) ^(e)	Hc 361	Lesão nos glúteos/ Imunocompetente	Raspado de Lesão	Rio de Janeiro
(24) ^(e)	Hc 406	Paraparesia/Imunocompetente	Líquor	Rio de Janeiro
(25) ^(e)	Hc 584	HIV +	Sangue	Rio de Janeiro
(26) ^(e)	Hc 712	HIV +	Pneumopatia	Rio de Janeiro
(27) ^(c)	Hc 713	Imunocompetente	Biópsia de duodeno	Ribeirão Preto/SP
(28) ^(c)	Hc 774	Imunocompetente	Pulmão	Ribeirão Preto/SP
(29) ^(c)	Hc 890	HIV +	Lesão de palato	Ribeirão Preto/SP
(30) ^(e)	6406	Imunocompetente	Desconhecido	Rio de Janeiro
(31) ^(b)	Hc D.P.	Imunocompetente	Desconhecido	Espírito Santo
(32) ^(d)	HcEPM	Imunocompetente	Pulmão	Ubatuba – SP
(33) ^(b)	Hc Alex	Imunocompetente	Pulmão	Espírito Santo
(34) ^(e)	Chesc	Imunocompetente	Desconhecido	Rio de Janeiro
(35) ^(b)	Hc R.P.	Imunocompetente	Desconhecido	Espírito Santo

Linhas cedidas pelos pesquisadores: ^(a) Dr. Flávio Queiroz Telles – Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR.; ^(b) Dr. Gercyr Baptista – UFES (Universidade Federal do Espírito Santo), Espírito Santo; ^(c) Dra. Claudia Maffei – Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto, São Paulo; ^(d) Dra. Olga F. Gompertz – Universidade Federal de São Paulo (Escola Paulista de Medicina), São Paulo; ^(e) Dra. Rosely M. Zancopé-Oliveira – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – FioCruz, RJ.

TABELA 3 - SEQÜÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS OBTIDAS NO GENBANK

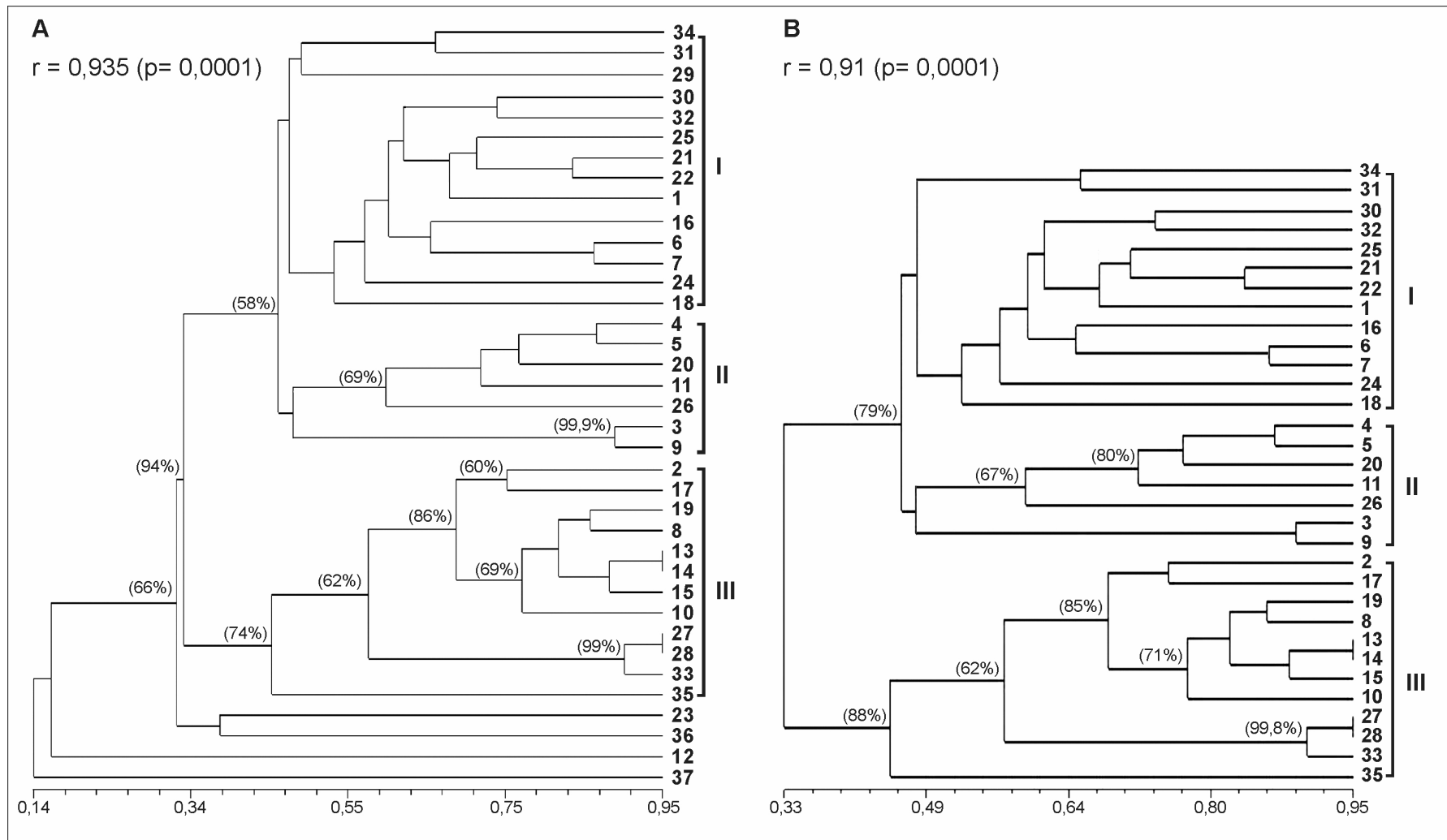
no.	Linhagem	Origem	Isolado	GenBank	Ref.
1	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Japão	IFM49109	AB055244	TAMURA, 2002
2	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	Japão	IFM47750	AB055245	TAMURA, 2002
3	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>duboisii</i>	Desc.	IFM5415	AB055248	TAMURA, 2002
4	<i>Ajellomyces capsulatus</i> var. <i>duboisii</i>	Desc.	H87	AB071833	TAMURA, 2002
5	<i>Ajellomyces capsulatus</i> var. <i>duboisii</i>	Desc.	IFM41332	AB071834	TAMURA, 2002
6	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>duboisii</i>	África do Sul	H143	AB055246	TAMURA, 2002
7	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>duboisii</i>	Senegal	H147	AB055247	TAMURA, 2002
8	<i>Ajellomyces capsulatus</i> var. <i>duboisii</i>	Uganda	IFM50954	AB071835	TAMURA, 2002
9	<i>Ajellomyces capsulatus</i> var. <i>duboisii</i>	Bélgica	H88	AB061781	TAMURA, 2002
10	<i>Ajellomyces capsulatus</i> var. <i>duboisii</i>	Bélgica	H88	AF322386	KASUGA, 2000
11	<i>Ajellomyces capsulatus</i> var. <i>duboisii</i>	desc.	-	AF162917	IWEN, 1999a
12	<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>farciminosum</i>	Egito	H95	Ab055249	TAMURA, 2002
13	<i>Ajellomyces dermatitidis</i>	Desc.	-	AF183912	IWAN, 1999b
14	<i>Emmonsia parva</i>	Desc.	-	AF038333	PETERSON, 1998

FIGURA 2 - DENDROGRAMA DOS ISOLADOS DE *H. capsulatum* BASEADO EM MÁXIMA PARCIMÔNIA (TABELAS 1 E 2)



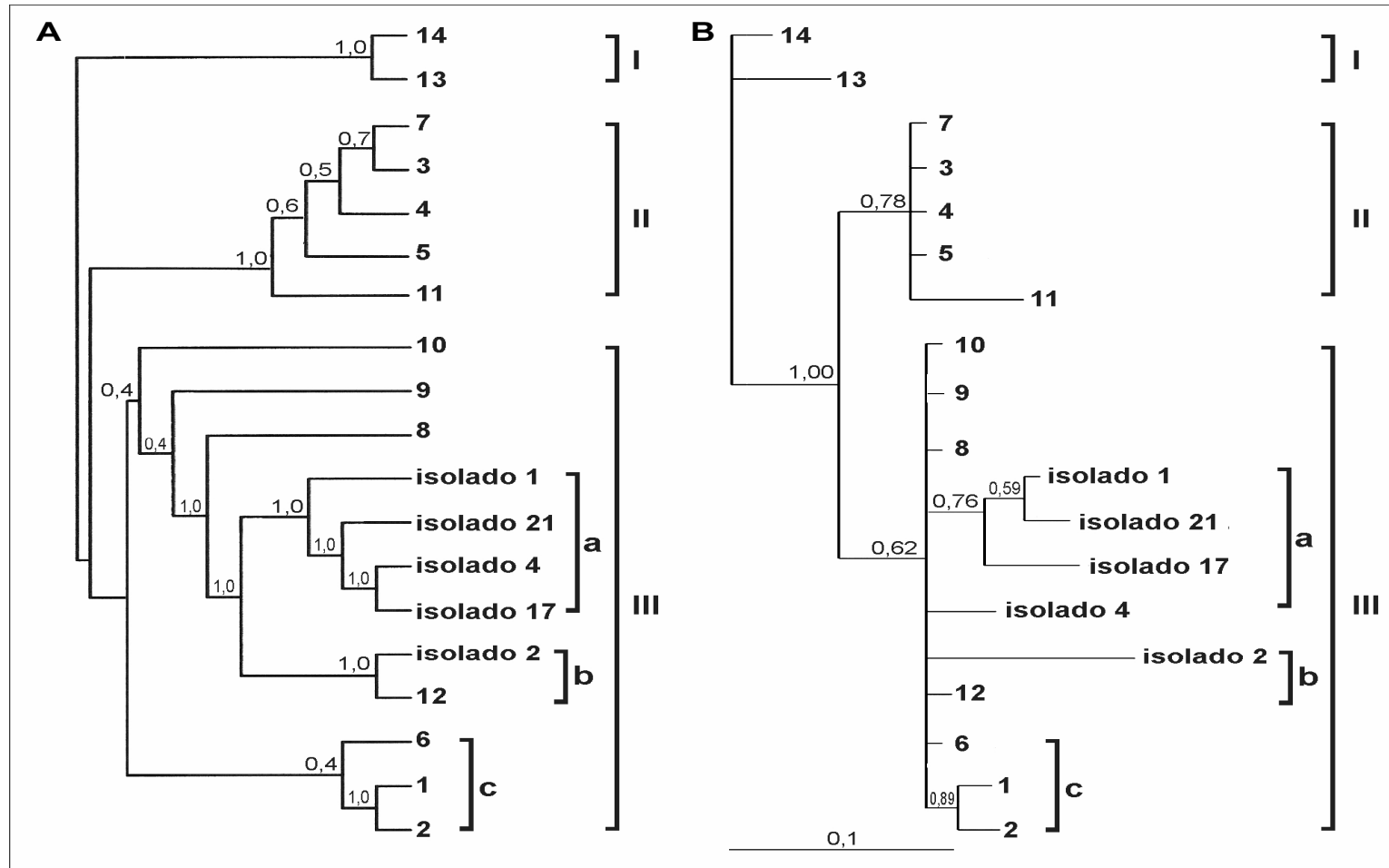
Foram utilizados os *primers* OPX 11, 14, 17 e OPA 10, 13, 16, utilizando coeficiente de similaridade de Jaccard. Os valores de *bootstraps* estão descritos.

FIGURA 1 - DENDROGRAMA DOS ISOLADOS DE *H. capsulatum* BASEADO EM MARCADORES RAPD (TABELAS 1 E 2)



Foram utilizados os *primers* OPX 11, 14, 17 e OPA 10, 13, 16, utilizando coeficiente de similaridade de Jaccard. Os valores de *bootstraps* estão descritos entre parênteses.

FIGURA 3 - DENDROGRAMAS DOS ISOLADOS DE *H. capsulatum* BASEADOS EM SEQÜÊNCIAS ITS – (A) ANÁLISE DE MÁXIMA PARCIMÔNIA, (B) ANÁLISE BAYSEANA (TABELA 3)



1- *Ajellomyces capsulatus* originário do Japão; 2 - *Ajellomyces capsulatus* originário do Japão; 3 - *H. capsulatum* var. *duboisii* de origem desconhecida; 4 - *A. capsulatus* var. *duboisii* de origem desconhecida; 5 - *A. capsulatus* var. *duboisii* de origem desconhecida; 6 - *H. capsulatum* var. *duboisii* originário da África do Sul; 7 - *H. capsulatum* var. *duboisii* originário do Senegal; 8 - *A. capsulatus* var. *duboisii* originário da Uganda; 9 - *A. capsulatus* var. *duboisii* originário da Bélgica; 10 - *A. capsulatus* var. *duboisii* originário da Bélgica; 11 - *A. capsulatus* var. *duboisii* de origem desconhecida; 12 - *H. capsulatum* var. *farciminosum* originária do Egito; 13 - *Ajellomyces dermatitidis* de origem desconhecida; 14 - *Emmonsia parva* de origem desconhecida; isolados 1, 2, 4, 17, 21 listados nas Tabelas 1 e 2.