

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CURSO DE BIOMEDICINA

LUANA LECHENAKOSKI DE OLIVEIRA

OCORRÊNCIA DO FUNGO *Histoplasma capsulatum* EM TRÊS CAVIDADES
NATURAIS BRASILEIRAS

CURITIBA

2016

LUANA LECHENAKOSKI DE OLIVEIRA

OCORRÊNCIA DO FUNGO *Histoplasma capsulatum* EM TRÊS CAVIDADES
NATURAIS BRASILEIRAS

Monografia apresentada à disciplina TCC-II como requisito
para a conclusão do curso de Biomedicina, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

CURITIBA

2016

Aos meus pais, Andreia e Claudio.

Aos meus avós.

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Vania Aparecida Vicente, pela amizade, orientação e oportunidade de participar do grupo de pesquisa.

Ao Mestre Jason Lee Furuie, que me acompanhou desde o início das minhas atividades no laboratório, contribuindo imensamente para minha formação acadêmica.

À Doutora Angela Bozza de Almeida, pela grande parceria neste trabalho e pelo grande conhecimento que me transmitiu.

Aos meus pais, pelo amor, incentivo e confiança desde sempre.

Aos meus avós e tia Thelma de Oliveira, que fizeram o impossível para que eu tivesse a melhor educação, permitindo as conquistas que tive até hoje.

Aos grandes amigos de Biomedicina, pelos inúmeros momentos de felicidade que me proporcionaram durante o curso, além da grande força que me deram em todos os momentos.

À Luiza Kato de Almeida (*in memoriam*), que inspirou perseverança e coragem em todos nós, e motivou minha continuidade na Biomedicina.

Ao querido João Pedro Lucca Furtado, que não mediu esforços para me fazer continuar nesta difícil jornada.

Às grandes amigas do Colégio Marista Santa Maria, pela força e apoio que me deram durante toda a vida.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, pela grande colaboração e apoio durante o desenvolvimento de minhas atividades no laboratório.

Que nada nos defina. Que nada nos sujeite. Que a liberdade seja a nossa própria substância.

Simone de Beauvoir

RESUMO

A histoplasmose, cujo agente etiológico denomina-se *Histoplasma capsulatum*, é uma micose sistêmica transmitida através da inalação de esporos deste fungo, que tem como habitats ideais solos contaminados por excrementos de aves e morcegos. Por este motivo, locais como cavidades naturais que abrigam colônias de morcegos ou aves tornam-se ambientes propícios para seu estabelecimento, oferecendo um risco para turistas ou pesquisadores que visitam estes locais. A infecção é assintomática na maioria dos casos, entretanto, dependendo da concentração de esporos inalada e da imunidade do paciente a doença pode causar sérias complicações pulmonares, podendo ainda estender-se para outros órgãos. Ainda neste contexto, a histoplasmose apresenta uma sintomatologia muito semelhante a outras doenças, dificultando seu diagnóstico, o qual é realizado por técnicas pouco precisas e que demandam muito tempo. Desta maneira, métodos moleculares têm sido utilizados para uma identificação mais precisa e rápida deste patógeno. O presente trabalho teve como objetivo investigar a ocorrência do fungo *H. capsulatum* em amostras de diferentes substratos e condições ambientais provenientes das cavidades naturais denominadas Salitre, Bacaetava e Terra Boa, através da técnica de PCR espécie-específica. Esta envolve a utilização de *primers* HC-1 e HC-2 que identificam a região interna ao ITS do DNA de *H. capsulatum*. Foram analisadas 43 amostras, dentre elas: matéria orgânica, sedimento e guano, onde cada cavidade natural foi dividida em quatro zonas: externa, entrada, penumbra e afótica. Do total de 43 amostras analisadas, 9 foram positivas para a presença de *H. capsulatum* após a amplificação com os *primers* espécie-específicos, sendo que as amostras positivas de sedimento contabilizaram 5 neste grupo. A presença de *H. capsulatum* foi detectada em todas as zonas das cavidades naturais, em maior quantidade nas áreas de entrada, onde 4 amostras foram positivas nesta zona. Desta maneira, a técnica de PCR espécie-específica pode ser útil na investigação de amostras ambientais, auxiliando na identificação deste patógeno em ambientes como cavidades naturais. Isto poderá facilitar a execução de planos que orientem a visitação turística deste ambiente de maneira segura, além de alertar sobre os riscos de exposição ao *H. capsulatum*.

Palavras-chave: *Histoplasma capsulatum*. PCR. Cavidades naturais.

ABSTRACT

Histoplasmosis is a systemic mycoses transmitted by inhalation of fungal propagules of the fungus *H. capsulatum*, which grows in environments with bat and bird droppings. For this reason, locations such as caves are potential places for bat or bird colonies; therefore, these sites become ideal for their settlement, offering a risk for tourists or researchers who visit these caves. Infection is asymptomatic in most of the cases, however, depending on the amount of propagules inhaled and the immunity of the patient, this disease can cause serious lung damage, that can also spread to other organs. Moreover, histoplasmosis causes symptoms that can be very easily confused with other conditions, making it more difficult to diagnose. The diagnosis involves techniques that demand too much time. Thereby, molecular methods have been presented as quicker and more precise techniques for identification of this pathogen. The aim of this work was to investigate the occurrence of *H.capsulatum* in samples from different substrates and environmental conditions from the caves named Salitre, Bacaetava e Terra Boa, using PCR species-specific. This technique involves the primers HC-1 e HC-2, which can identify the internal ITS region of the *H. capsulatum* DNA. A total of 43 samples were analyzed, among them: organic substrates, sediment and guano; where each cave was divided in 4 zones: external, entrance, twilight and aphotic. Among all samples analyzed, 9 were positive for the presence of *H.capsulatum* after amplification with the species-specific primers, where the sediment samples were the majority, totalizing 5 samples. The presence of *H.capsulatum* was detected in all zones of the caves, concentrating on the entrance zone, where 4 samples were positive. Therefore, the PCR species-specific technique can be useful in the investigation of environmental samples, aiding the identification of this pathogen in environments like caves, making it easier to provide a safe visitation to tourists, highlighting the risks of exposure to *H.capsulatum*.

Key-words: *Histoplasma capsulatum*. PCR. Caves.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1-** REPRESENTAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO DAS CAVERNAS SELECIONADAS PARA A INVESTIGAÇÃO DE *H. capsulatum*.....15
- FIGURA 2-** KIT DE EXTRAÇÃO E.Z.N.A. SOIL DNA – OMEGA BIOTEK®.....17
- FIGURA 3-** PERFIL DAS AMOSTRAS SUBMETIDAS À REAÇÃO DE PCR ESPÉCIE-ESPECÍFICA DA GRUTA DE BACAETAVA.....22
- FIGURA 4-** PERFIL DAS AMOSTRAS SUBMETIDAS À REAÇÃO DE PCR ESPÉCIE-ESPECÍFICA DA GRUTA DO SALITRE.....23
- FIGURA 5-** PERFIL DAS AMOSTRAS SUBMETIDAS À REAÇÃO DE PCR ESPÉCIE-ESPECÍFICA DA GRUTA DE TERRA BOA.....24

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- CAVERNAS SELECIONADAS PARA O ESTUDO COM SUAS RESPECTIVAS COORDENADAS GEOGRÁFICAS E MUNICÍPIOS DE REFERÊNCIA.....	16
TABELA 2 - AMOSTRAS PROVENIENTES DE BACAETAVA.....	21
TABELA 3 - AMOSTRAS PROVENIENTES DO SALITRE.....	22
TABELA 4 - AMOSTRAS PROVENIENTES DE TERRA BOA.....	24

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

AIDS - *Acquired Immunodeficiency Syndrome* – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

dNTP- *Deoxyribonucleotide Triphosphate* – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

FC- Fixação em Complemento

HE – Hematoxilina-Eosina

ID- Imunodifusão

IFN- γ - Interferon Gama

ITS- *Internal Transcribed Spacer* – Espaçador Interno Transcrito

mg - miligrama

mg/kg – miligramas por quilo

μ L- Microlitro

MgCl – Cloreto de Magnésio

LabMicro – Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular

PCR - *Polymerase Chain Reaction* – Reação em cadeia da polimerase

PAS - Ácido Periódico de Schiff

® Marca Registrada

V- Volts

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO FUNGO <i>Histoplasma capsulatum</i>	3
2.2 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO FUNGO <i>Histoplasma capsulatum</i> NO BRASIL E NO MUNDO	4
2.3 HISTOPLASMOSE – PRINCIPAIS ASPECTOS PATOGÊNICOS E TRATAMENTO	6
2.4 DIAGNÓSTICO	9
2.5 CAVERNAS, VIAGENS E EXPEDIÇÕES: O RISCO DE INFECÇÃO PELO <i>Histoplasma capsulatum</i>	11
2.6 ISOLAMENTO DE FUNGOS A PARTIR DE MATERIAIS NÃO BIOLÓGICOS.....	12
2.7 A TÉCNICA DE PCR.....	13
3. OBJETIVOS	14
3.1 OBJETIVO GERAL	14
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 Localização	15
4.2 Amostras e coleta de material biológico	16
4.3 Extração de DNA total de amostras ambientais.....	17
4.4 Verificação da presença de <i>Histoplasma capsulatum</i> por reação em cadeia da polimerase (PCR).....	18
4.5 Estratégia Experimental	19
5. RESULTADOS	20
5.1 Gruta de Bacaetava	21
5.2 Gruta do Salitre	22
5.3 Gruta de Terra Boa	23
6. DISCUSSÃO	25
7. CONCLUSÃO	28
8. ESTRUTURA	29
9. IDENTIFICAÇÃO DOS DEMAIS PARTICIPANTES DO PROJETO	30
10. REFERÊNCIAS	31

1. INTRODUÇÃO

A histoplasmose é uma micose causada pelo fungo termodimórfico *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* (SEGEL *et al.*, 2015), sendo responsável por uma significativa morbidade e mortalidade que se distribui no mundo todo (HORWARTH *et al.*, 2015). Este fungo possui mais duas variedades: *H. capsulatum* var. *duboisii* e *H. capsulatum* var. *farciminosum*. O fungo *H. capsulatum* var. *duboisii* está presente nas regiões oeste e central da África subsaariana (MANFREDI *et al.*, 1994), enquanto *H. capsulatum* var. *farciminosum* é o agente causador de uma doença crônica que afeta principalmente cavalos e mulas (MEKONNEN *et al.*, 2012).

Esta doença é amplamente distribuída pelos continentes, acumulando relatos em países como Estados Unidos (BENEDICT; MODY, 2016), Austrália (O'SULLIVAN *et al.*, 2004), Índia (KATHURIA *et al.*, 2013; DE; NATH, 2015), Equador (KAJFASZ; BASIAK, 2012), Brasil (ZANCOPÉ-OLIVEIRA *et al.*, 2005; CURY *et al.*, 2001), entre outros. O fungo *H. capsulatum* cresce em solos com elevado conteúdo de nitrogênio, como o encontrado em fezes de aves e morcegos (CURY *et al.*, 2001). Por este motivo, áreas como cavidades naturais (JÜLG, 2008), construções antigas em processo de demolição (ALLARD *et al.*, 2014), árvores e sótãos frequentadas por esses animais são importantes pontos de infecção. O risco de infecção por *H. capsulatum* está intimamente relacionado à quantidade inalada de esporos do fungo pelo indivíduo, seu estado imunológico, frequência e tempo de exposição, bem como o tipo de atividade que este desempenha (CURY *et al.*, 2001; WHEAT; KAUFFMAN, 2003).

O Brasil possui um grande número de cavidades naturais distribuídas em seu território, sendo que várias ainda são inexploradas. Muitos casos de infecções causadas por *H. capsulatum* após visitas turísticas nestes ambientes são reportados (KOTTON, 2012), especialmente em áreas endêmicas. Por isso, investigar a presença deste fungo nestes ambientes pode impulsionar medidas como controle do acesso às cavidades naturais e até orientar planos de visitação nestes locais.

A exposição ao fungo *H. capsulatum* é assintomática na maioria dos casos (WHEAT; KAUFFMAN, 2003). Em geral, a infecção é autolimitada ou restrita aos pulmões, podendo manifestar-se numa infecção pulmonar aguda, forma fibrocavitária crônica, ou a forma disseminada (HORWARTH *et al.*, 2015;

KAUFFMAN, 2007; FERREIRA;BORGES, 2009). Entretanto, pode acometer também o fígado, baço, linfonodos, medula óssea, pele e mucosas (SOOD *et al.*, 2007). Como esta patologia apresenta um quadro sintomático muito variável e até semelhante a outras doenças, a necessidade de identificar precisamente o fungo *H. capsulatum* é um fator determinante para guiar estratégias de tratamento. Atualmente, os métodos mais utilizados para o diagnóstico ainda incluem o exame microscópico direto e crescimento de cultura em meio Sabouraud (DANTAS *et al.*, 2013). Porém, com o objetivo de realizar um diagnóstico mais rápido e preciso para a histoplasmose, surgem métodos moleculares como a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), a qual vem sendo uma técnica utilizada na detecção de *H. capsulatum* em amostras clínicas e ambientais, que apresenta altos níveis de sensibilidade e especificidade (GUIOT *et al.*, 2007). Desta maneira, este método diagnóstico pode representar uma ferramenta ágil para a identificação precisa de *H. capsulatum* em cavidades naturais, já que estes ambientes são importantes nichos ecológicos deste fungo.

Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo aplicar a técnica de PCR espécie específica, a fim de verificar a presença do DNA do fungo *Histoplasma capsulatum* em amostras ambientais provenientes das cavidades naturais Bacaetava, Terra Boa e Salitre. As duas primeiras localizam-se no estado do Paraná, enquanto a última encontra-se no estado de Minas Gerais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO FUNGO *Histoplasma capsulatum*

O fungo *Histoplasma capsulatum* foi primeiramente identificado pelo patologista Samuel Taylor Darling em 1906, após a necrópsia de três pacientes da Ilha de Martinica (DIGHE *et al.*, 2009). Quase um século após esta descoberta, ainda foram relatadas ocorrências de surtos de histoplasmose neste mesmo local (SALOMON *et al.*, 2003; MINOZA *et al.*, 2016).

A variedade mais comum deste fungo denomina-se *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, contudo, existem ainda outras duas espécies: *H. capsulatum* var. *duboisii* e *H. capsulatum* var. *farciminosum*. A variedade *duboisii* é responsável por um grande número de casos de histoplasmose humana nas regiões centrais e oeste do continente africano, incluindo a ilha de Madagascar (RICHAUD *et al.*, 2014). A variedade *farciminosum* afeta apenas animais como cavalos (AL-ANI, 1999; AMENI; SIYOUUM, 2002) e burros (SOLIMAN *et al.*, 1991), sendo reportada principalmente na região norte da África e no Oriente Médio (AMENI, 2006).

Em 1934 foi identificada uma de suas principais características: o dimorfismo térmico (FERREIRA; BORGES, 2009). Esta confere ao *Histoplasma capsulatum* morfologias distintas quando submetido a temperaturas específicas: (1) Forma leveduriforme nos tecidos sob uma temperatura de 37°C, com a presença de colônias brilhantes, cremosas e leveduras ovaladas de 2 a 4µm de diâmetro e (2) Forma micelial quando presente no solo ou em meio Sabouraud em temperatura ambiente, com colônias brancas de aspecto algodinoso (TORTORA, 2012; FERREIRA; BORGES, 2009; KAUFFMAN, 2007; FURUIE, 2014). A mudança da forma micelial para a forma leveduriforme é um aspecto essencial para a patogênese de *H. capsulatum*, sendo que além da temperatura de 37°C que permite seu estabelecimento no hospedeiro, existem produtos de alguns genes que auxiliarão neste processo (RETALLACK; WOODS, 1999; HOLBROOK; RAPPLEYE, 2008). A proteína RYP1 é um destes fatores que está envolvido na transição micelial-leveduriforme, demonstrada num estudo em que células mutantes que não continham RYP1 permaneciam aprisionadas na fase micelial, sugerindo que este representa um fator crítico para a mudança morfológica regulada pela temperatura (NGUYEN; SIL, 2008).

A porta de entrada do fungo *H. capsulatum* são as vias respiratórias, onde os esporos da fase micelial atingem os bronquíolos e então os alvéolos pulmonares. A partir deste momento, acontece a conversão para a fase leveduriforme do fungo, onde serão então contidos por macrófagos e neutrófilos (TEWARI; VON BEHREN, 2000). As leveduras de *H. capsulatum* ligam-se aos macrófagos através das famílias de integrinas CD11 e CD18, onde acontecerá a fusão do fagossoma com o lisossoma, permitindo a proliferação das leveduras nestas estruturas. Desta forma, quando acontece a ruptura das mesmas, o fungo prolifera e aumenta em número (NEWMAN, 1999; WOODS, 2003; MIHU; NOSANCHUK, 2011). Outros grupos de células e fatores também têm envolvimento na resposta celular ao *H. capsulatum*, como o IFN- γ e células T, que contribuem produzindo citocinas ativadoras de fagócitos (DEEPE, 2000).

2.2 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO FUNGO *Histoplasma capsulatum* NO BRASIL E NO MUNDO

O fungo *Histoplasma capsulatum* apresenta uma distribuição geográfica global. Entretanto, existem áreas endêmicas da doença de onde a maioria dos casos reportados originam-se, além de relatos em regiões consideradas não endêmicas, caracterizando os casos importados (OHNO *et al.*, 2010).

Nos Estados Unidos, a doença concentra-se nos estados contemplados pelas águas dos rios Mississipi e Ohio, onde aproximadamente 75% da população nestes locais apresenta resultado positivo em relação a testes sorológicos para *H. capsulatum* (TORTORA, 2012). Na Ásia, países como Tailândia, Malásia, Indonésia, Vietnã apresentam áreas endêmicas (FERREIRA; BORGES, 2009), em especial a Índia, que concentra áreas de grande infecção pelo fungo em regiões ao sul do país e no estado de Bengala Ocidental (RAINA *et al.*, 2016).

A América Central também é reconhecida como um local de origem de surtos de histoplasmose. Em 2002, Buxton e colaboradores descreveram um surto de histoplasmose que incluiu treze estudantes canadenses com idades entre 16 e 18 anos após uma visita a uma cavidade natural em Belize. Os indivíduos relataram sintomas como febre e calafrios na viagem de volta ao seu país de origem, sendo submetidos posteriormente a testes sorológicos que confirmaram a presença de anticorpos para (ou confirmaram a exposição ao fungo) *H. capsulatum*.

No continente africano, a coexistência de *H. capsulatum* var. *duboisii* e *H. capsulatum* var. *capsulatum* é única, reunindo um grande número de casos da doença. A variedade *H. capsulatum* var. *duboisii* concentra-se principalmente na região subsaariana, como já foi relatado em pacientes pediátricos na República do Chade (GARCIA-GUIÑON *et al.*, 2009). Além disso, a África é responsável por inúmeros casos importados da doença causados pela variedade *H. capsulatum* var. *capsulatum*. Este fato pode ser demonstrado por um relato de caso de Rivasi e colaboradores (2001), onde um paciente com AIDS originário de Gana entrou em contato com *H. capsulatum* neste país, e posteriormente viajou para a Itália, apresentando os sintomas da doença.

No Brasil, a histoplasmose tem incidência em todas as regiões do país, sendo considerada relativamente comum (AIDÉ, 2009). Em 1978, Londero e Ramos conduziram um estudo para avaliar a situação da histoplasmose no Brasil naquela época, mostrando que mesmo com a presença de focos da doença, profissionais da área da saúde não possuíam nenhum conhecimento sobre esta micose, além da inexistência de métodos diagnósticos para esta e outras doenças causadas por fungos.

Duas décadas depois, Fava e Fava Netto (1998) reuniram dados de 88 testes epidemiológicos, utilizando histoplasmina, que foram realizados em 18 estados do Brasil e Distrito Federal. Dentre os estudos reunidos neste trabalho, um destes foi realizado na cidade de Curitiba, por Costa no ano de 1961, que revelou uma positividade de aproximadamente 16% para histoplasmina numa amostra de 494 indivíduos da população da cidade. Ainda no estudo de Fava e Fava Netto, de uma forma geral, apresentaram-se resultados de positividade para histoplasmina muito distintos nos estados brasileiros, com uma prevalência de 2,6 % em Salvador, Bahia, e 93,2% na Ilha do Governador, Rio de Janeiro (FAVA; FAVA NETTO, 1998).

Além de dados epidemiológicos sobre a histoplasmose no Brasil já bem documentados na literatura, existem muitos relatos de microepidemias que se espalham pelo território brasileiro, muitos deles com origem em cavidades naturais, galinheiros e construções antigas (CURY *et al.*, 2001). No estado do Rio de Janeiro, um grupo de crianças entre 4 e 11 anos desenvolveu a forma pulmonar aguda da doença após realizarem a limpeza de um forno desativado para produção de carvão vegetal (MARTINS *et al.*, 2003), apresentando grande melhora clínica após tratamento com antifúngicos.

Em 1996, Rodrigues e Resende utilizaram também o teste cutâneo para histoplasmina em indivíduos que trabalhavam em minas de ouro, agrupadas num complexo de sete cavidades naturais, denominado Morro Velho. Neste grupo de trabalhadores, os resultados indicaram uma taxa de positividade de 17,5% para a histoplasmina. Assim, consolidou-se a ideia de que o risco de infecção está intimamente relacionado ao tipo de atividade desenvolvida pelo indivíduo (WHEAT; KAUFFMAN, 2003), pois estes frequentavam locais onde existiam comunidades de morcegos e outras aves, representando um maior potencial de desenvolvimento para *H. capsulatum*.

Outros estados do Brasil também concentram muitos focos da doença, como o Rio Grande do Sul (UNIS *et al.*, 2005), onde a histoplasmose é endêmica particularmente no vale do rio Jacuí (SEVERO *et al.*, 2001). Microepidemias também aconteceram no estado de São Paulo (VICENTINI-MOREIRA *et al.*, 2008; PASSOS *et al.*, 2014), Santa Catarina (OLIVEIRA *et al.*, 2006) e Minas Gerais (CURY *et al.*, 2001; ROCHA-SILVA *et al.*, 2014), sendo que todos estes estudos e relatos de caso fornecem evidências suficientes para afirmar que a histoplasmose representa um grande problema em várias regiões do Brasil.

2.3 HISTOPLASMOSE – PRINCIPAIS ASPECTOS PATOGÊNICOS E TRATAMENTO

A histoplasmose apresenta-se como uma infecção subclínica e assintomática na maioria dos casos (WHEAT; KAUFFMAN, 2003). Porém, a manifestação de formas mais agravadas da doença dependerá de muitos fatores, dentre os quais se destacam: atividade desenvolvida pelo indivíduo e seu estado imunológico, bem como tempo e frequência de exposição ao *Histoplasma capsulatum* (PASSOS *et al.*, 2014; WHEAT ; KAUFFMAN, 2003). A histoplasmose pode ser considerada uma doença ocupacional relevante (ANJOS *et al.*, 2007), tendo grande incidência em indivíduos que frequentam ambientes onde é provável a presença de *Histoplasma capsulatum*, como espeleólogos (ANJOS *et al.*, 2007), pesquisadores que realizam trabalhos de campo (VICENTINI *et al.*, 2012), trabalhadores de minas (RODRIGUES; RESENDE, 1996) e construções (BARTLETT *et al.*, 1982), fazendeiros (ZEIDBERG *et al.*, 1952) e turistas (KAJFASZ; BASIAK, 2012; ROCHA-SILVA *et al.*, 2014).

A infecção sintomática pelo *Histoplasma capsulatum* pode ocorrer nas formas aguda pulmonar, pulmonar crônica e disseminada. A forma primária ou pulmonar aguda é a mais comum, atingindo 90% dos pacientes (WHEAT *et al.*, 2016). É uma infecção geralmente limitada que pode caracterizar-se por sintomas como febre, dor de cabeça, fraqueza, dor no peito e tosse seca (DYLEWSKI, 2011). Esta forma geralmente regride espontaneamente, não sendo necessário o tratamento com antifúngicos (KAUFFMAN, 2007).

De forma diferente, a forma pulmonar crônica cavitária aparentemente tem maior influência em pacientes do sexo masculino com idade mais avançada (KAUFFMAN, 2007), associando-se à presença de enfisema ou algum defeito anatômico estrutural pulmonar que favorece a colonização do *Histoplasma capsulatum* (ROSSINI; GOULART, 2006). Além disso, do ponto de vista clínico e radiológico, esta forma da doença é indistinguível da tuberculose pulmonar com cavitação, dificultando o reconhecimento e diagnóstico da histoplasmose (PUGSLEY *et al.*, 1963).

Por fim, a condição mais grave ocasionada pela infecção com *Histoplasma capsulatum* é denominada forma disseminada. Este quadro clínico mostra-se muito expressivo em pacientes imunodeficientes ou imunocomprometidos, como pacientes com linfomas, transplantados com o uso concomitante de corticoesteroides e principalmente os portadores da síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) (McKINSEY *et al.*, 1997; SAHEKI *et al.*, 2008), e se não tratada adequadamente, pode ser fatal (ORSI *et al.*, 2011). Os sintomas clínicos mais característicos incluem febre elevada, anorexia intensa, perda de peso, hepatoesplenomegalia e lesões cutâneas (WHEAT *et al.*, 2016; FERREIRA; BORGES, 2009), no qual os pacientes portadores da AIDS apresentam uma progressão muito rápida da doença.

Em relação ao tratamento da histoplasmose nas suas diferentes manifestações clínicas, existe uma considerável divergência entre autores, que sugerem distintas estratégias que poderão variar de acordo com a síndrome clínica e estado imunológico do paciente (FERREIRA; BORGES, 2009).

Como a maioria dos pacientes são acometidos pela forma aguda da doença, não há necessidade de iniciar-se um tratamento antifúngico, já que os sintomas irão regredir espontaneamente em um curto período de tempo. Entretanto, quando o quadro sintomático pulmonar agudo é prolongado ou há predominância de formas crônicas e disseminadas da doença, estas formas mais severas da histoplasmose

devem ser tratadas com base em medicamentos antifúngicos (KUROWSKI; OSTAPCHUK, 2002; KAUFFMAN, 2007).

Para a forma pulmonar aguda, geralmente a primeira droga de escolha é o itraconazol, na dose de 200mg três vezes ao dia. Caso os sintomas persistam, a anfotericina B poderá ser administrada até a melhora dos sintomas, sendo feita então a manutenção do tratamento com itraconazol novamente por até três meses, dependendo da melhora clínica do paciente (THAPA *et al.*, 2016; KAUFFMAN, 2007).

A forma pulmonar crônica geralmente manifesta-se de forma mais expressiva em pacientes do sexo masculino com mais de 40 anos, que em algumas situações podem apresentar fatores potencialmente perigosos, como alcoolismo, tabagismo e diabetes (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Nestes casos, a terapia recomendada é semelhante à forma aguda, iniciando-se com itraconazol na dose de 200 mg duas vezes ao dia num período de 12 a 24 meses, podendo adicionar-se a anfotericina B ao tratamento se necessário (KAUFFMAN, 2007).

A forma disseminada da histoplasmose apresenta-se principalmente em indivíduos portadores da AIDS, muitos dos quais viajam para uma região endêmica da doença e retornam ao seu país de origem com sintomas da histoplasmose (LOULERGUE *et al.*, 2007). Novamente, a anfotericina B é a primeira escolha na terapêutica da forma disseminada da histoplasmose, sendo administrada ao paciente numa dose total de 35mg/kg (FERREIRA; BORGES, 2009), seguido de itraconazol por aproximadamente doze meses. Obviamente, o paciente também deve ser submetido simultaneamente ao tratamento com antirretrovirais, para auxiliar na prevenção do avanço da histoplasmose.

Além das drogas clássicas itraconazol e anfotericina B, existem outros antifúngicos empregados no tratamento da histoplasmose. Estes incluem fluconazol, posaconazol, voriconazol e cetoconazol (WHEAT *et al.*, 2016; KAUFFMAN, 2007), tendo seu uso mais restrito e de caráter alternativo, usados quando as drogas clássicas têm alguma restrição de uso pelas características de um determinado paciente.

2.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial da histoplasmose inclui técnicas micológicas, histopatológicas, sorológicas e moleculares (CURY *et al.*, 2001; DIAS, 2009; LÓPEZ *et al.*, 2016). O padrão-ouro do diagnóstico de *H. capsulatum* consiste no isolamento do fungo a partir de sangue, fluidos corporais e tecidos em meio Ágar Sabouraud a 25°C, onde se deve observar o crescimento micelial do fungo. Após incubação a 37°C, é necessário verificar a conversão à fase leveduriforme, confirmando a presença do fungo na cultura (KAUFFMAN, 2007). Como geralmente os casos de histoplasmose são esporádicos, ainda utiliza-se este método como primeira alternativa de identificação do fungo. Porém, o padrão-ouro oferece algumas desvantagens como: dificuldade na manipulação do material; o tempo de crescimento lento do fungo no meio de cultura e o reconhecimento de macroconídeos tuberculados típicos de *H. capsulatum* na análise microscópica, que pode ser confundido com outros fungos, como *Candida glabrata* e *Candida neoformans* (WHEAT *et al.*, 2016).

Quando há suspeita de histoplasmose diretamente ou de alguma doença de origem pulmonar, os achados radiológicos podem contribuir muito para o diagnóstico correto da infecção por *H. capsulatum*. No caso de histoplasmose pulmonar aguda, este inclui a presença de linfonodomegalias hilares bilaterais e mediastinais, que em conjunto com o quadro clínico, pode assemelhar-se à tuberculose pulmonar (CAPONE *et al.*, 2010; AIDÉ, 2009).

O diagnóstico histopatológico consiste na observação de células leveduriformes de *H. capsulatum* em macrófagos, que continuam a proliferar depois que englobam este fungo (DIGHE *et al.*, 2009). Este método pode representar uma alternativa melhor em relação à cultura, pela maior rapidez, possibilitando o tratamento mais precoce de indivíduos afetados pelo *H. capsulatum* (D'AVILA; CHAPADEIRO, 1998). Utiliza-se para este método biópsias de medula óssea, linfonodos, mucosas e pele, na tentativa de encontrar granulomas. Nestas estruturas, é possível observar células leveduriformes que necessitarão de colorações como Gomori-Grocott, hematoxilina-eosina (HE) e ácido periódico-Schiff (ou coloração PAS) (KAUFFMAN, 2007; FERREIRA; BORGES, 2009; GUARNER; BRANDT, 2011) para permitir a visualização adequada do fungo.

Apesar deste método caracterizar-se por mais rapidez e facilidade, seu principal problema encontra-se na possibilidade de se confundir *H. capsulatum* com outros fungos, como *Cryptococcus* spp., que quando se apresenta sem cápsula pode assemelhar-se significativamente ao agente da histoplasmose, gerando um diagnóstico incorreto (SEVERO; GAZZONI; SEVERO, 2009). Além disso, quando é feita esta análise nos tecidos, alguns protozoários podem mostrar-se semelhantes ao *H. capsulatum*. Entretanto, a diferença histopatológica entre os mesmos reside na observação de que protozoários como os agentes da leishmaniose e doença de Chagas são corados por HE inteiramente, ao contrário de células fúngicas (GUARNER; BRANDT, 2011). Deste modo, é importante que a coloração seja escolhida cuidadosamente e observadas as características diferenciais entre espécies de fungos e até protozoários para realizar o diagnóstico histopatológico correto de *H. capsulatum*.

As técnicas sorológicas também são empregadas para o diagnóstico da histoplasmose, abrangendo uma grande variedade de testes. Dentre os mais utilizados, estão a fixação de complemento (FC) e imunodifusão (ID) (FERREIRA; BORGES, 2009). O teste de ID consiste na identificação qualitativa de anticorpos anti-M e anti-H de *H. capsulatum*, tendo melhores resultados num período de 4 a 6 semanas após a infecção. Apesar da alta especificidade para detecção, este método apresenta baixa sensibilidade, podendo gerar resultados falsos negativos durante a fase aguda da doença (GUIMARÃES *et al.*, 2006). Em 1975, Bauman e Smith realizaram uma comparação entre os testes de ID e FC para o diagnóstico da histoplasmose, apontando para uma maior sensibilidade de teste de FC em relação à ID, apesar de apresentar reações cruzadas com outras micoses, como blastomicose, candidíase, coccidioomicose e paracoccidioomicose (GUIMARÃES *et al.*, 2006). Assim, sugere-se que o teste de ID tem mais especificidade, enquanto o teste de FC é uma ferramenta mais confiável na sensibilidade para identificar adequadamente o agente etiológico causador da doença.

Frente aos problemas encontrados nas técnicas mais convencionais e difundidas para o diagnóstico da histoplasmose, surgem como alternativas os métodos moleculares, que apresentam maior precisão e rapidez (BUITRAGO *et al.*, 2013; WHEAT *et al.*, 2016).

Nesse contexto, a PCR tem ganhado notoriedade entre as opções diagnósticas de histoplasmose, caracterizando-se pela alta especificidade. Ensaios de PCR em tempo real utilizando tecidos com a presença de *H. capsulatum* foram previamente submetidos à análise histopatológica, onde o resultado incerto desta análise foi confirmado pela PCR. Constatou-se uma sensibilidade de 88,9% e especificidade de 100% do método nestas amostras clínicas (KOEPSELL *et al.*, 2012), mostrando que a PCR tem grande poder de precisão, servindo como ferramenta em diagnósticos que empregam técnicas que carecem de precisão, como a análise histopatológica. Outra técnica utilizando PCR foi proposta utilizando como alvo molecular o gene RYP1, envolvido na regulação da transição dimórfica de *H. capsulatum*. Esta técnica apresenta uma grande vantagem pelo tempo de execução, que é no máximo de dois dias, além da sua especificidade conferida pelo gene RYP (BRILHANTE *et al.*, 2016). Assim, este método pode ser muito útil para iniciar as estratégias terapêuticas pela sua rapidez, garantindo maior sucesso no tratamento.

A PCR também já foi empregada em amostras ambientais provenientes do solo, já que grande parte das infecções por *H. capsulatum* se dão em ambientes como cavidades naturais, galinheiros e construções (CURY *et al.*, 2001). Em 1999, Reid e Schaffer utilizaram *primers* espécie-específicos denominados HC-1 e HC-2 para *H. capsulatum* e outro par de *primers* universais de fungos, ITS1 e ITS4. Numa PCR de dois estágios, foi possível detectar a presença de *H. capsulatum* nas amostras selecionadas, tornando possível também a utilização deste método para material de origem ambiental, já que a maioria das metodologias diagnósticas tem como foco as amostras clínicas.

2.5 CAVIDADES NATURAIS, VIAGENS E EXPEDIÇÕES: O RISCO DE INFECÇÃO PELO *Histoplasma capsulatum*

A versatilidade do fungo *H. capsulatum* permite que este se adapte a diversos ambientes, fato que justifica as várias fontes de infecção do fungo relatadas na literatura ao longo do tempo. As cavidades naturais representam um ambiente de crescimento muito favorável para este fungo, pela grande concentração de nitrogênio depositado no solo, que é enriquecido constantemente pelas fezes de morcegos e aves que são habitantes comuns a estes locais. Inúmeros casos de indivíduos que visitam cavidades naturais e depois desenvolvem alguma forma da doença já foram

registrados, principalmente aqueles que são expostos a estes ambientes com maior frequência, como espeleólogos (ASHFORD *et al.*, 1999; ERKENS *et al.*, 2002).

A história da espeleologia brasileira remonta do início do século passado, e com o seu fortalecimento ao longo das décadas, procura proteger estes ambientes e reforçar as legislações existentes para a preservação das cavernas brasileiras (FIGUEIREDO, 2011). Para estes profissionais, o risco de infecção de histoplasmose torna-se muito mais alto, pela grande exposição dos mesmos em ambientes com a presença do fungo.

O mesmo pode ser aplicado para viajantes que escolhem como locais de passeio florestas e cavidades naturais, onde podem entrar em contato com *H. capsulatum*. Este fato pode ser exemplificado claramente por um relato de caso registrado por Cottle e colaboradores em 2013, onde um grupo de estudantes viajou à floresta tropical de Uganda em 2011 para a pesquisa de insetos e primatas durante um período de um mês. Dentre os 24 viajantes da expedição, 13 desenvolveram a forma aguda da doença. Acredita-se que a fonte de infecção foi uma árvore infestada de morcegos da qual os estudantes ficaram próximos.

Desta forma, é possível observar que a histoplasmose tornou-se uma doença relativamente comum em viajantes, assim como outras condições recorrentes em viagens, como diarreia e malária (LYON *et al.*, 2004). Além disso, esta doença tem ganhado notoriedade mesmo em áreas consideradas não endêmicas, onde podem ocorrer casos isolados (SKILLMAN *et al.*, 2013).

2.6 ISOLAMENTO DE FUNGOS A PARTIR DE MATERIAIS NÃO BIOLÓGICOS

As técnicas de isolamento de fungos a partir de materiais não biológicos já são conhecidas deste o século passado, sendo bem descritas na literatura (CHESTERS, 1940; THORNTON; CHESTERS, 1956). O processo de isolamento pode trazer algumas dificuldades. Estas envolvem a contaminação por outras espécies, isolamento de um fungo semelhante morfológicamente à espécie que se deseja isolar e problemas na execução da técnica (CHOI *et al.*, 1999). Em relação ao *H. capsulatum*, os primeiros isolamentos a partir de materiais não biológicos foram em amostras de solo (EMMONS, 1949; AJELLO; ZEIDBERG, 1951). Desta maneira, o solo começou a ser reconhecido como um local adequado para o estabelecimento de fungos, dentre eles, alguns patogênicos. Em 1956, Ajello conduziu uma investigação

de fungos patogênicos presentes em solos provenientes de países como Estados Unidos, Panamá, Canadá, Venezuela e Peru. Dentre os fungos isolados, estavam *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*. O último esteve presente em 46,2% de solos que foram coletados em galinheiros, evidenciando a relação entre seu desenvolvimento e a alta concentração de nitrogênio no solo aliado à umidade (AJELLO, 1956). Outros trabalhos também revelaram a tentativa de isolamento de *H. capsulatum* e outros fungos patogênicos a partir de areia, como conduzido por Kishimoto e Baker em 1969 nas areias de Oahu, Havaí. Dentre as 361 amostras selecionadas, foram obtidos apenas 54 isolados de fungos, sendo que nenhum foi de *H. capsulatum*, evidenciando a dificuldade no isolamento deste a partir de materiais não biológicos (KISHIMOTO ; BAKER ,1969).

2.7 A TÉCNICA DE PCR

As técnicas moleculares como a PCR representaram um grande avanço no diagnóstico de fungos patogênicos, apresentando a alta especificidade que métodos convencionais não eram capazes, excluindo a possibilidade de diagnósticos inconclusivos. A utilização de *primers* espécie-específicos que utilizam a região interna ao ITS já foram empregados na identificação de fungos provenientes de amostras ambientais (MARTIN ; RYGIEWICZ , 2005) e clínicas (FERRER *et al.*, 2001). O *Histoplasma capsulatum* também teve sua identificação facilitada por este método. Ensaio de PCR como realizado por Maubon e colaboradores em 2007 diminuiram drasticamente o número de dias necessário para o diagnóstico da histoplasmose em relação às técnicas histopatológicas e de cultura. Neste trabalho, uma amostra de lavado brônquico em um paciente com suspeita de histoplasmose foi submetida à PCR, que gerou um resultado em 2 dias. Em contraste, as técnicas convencionais empregadas na mesma amostra revelaram o resultado apenas 41 dias depois, evidenciando o poder da técnica de PCR na identificação deste fungo (MAUBON *et al.*, 2007).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a ocorrência do fungo *H. capsulatum* em amostras de diferentes substratos e zonas através da técnica de PCR espécie-específica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Extrair o DNA total de amostras ambientais procedentes das regiões a serem estudadas;
- ✓ Verificar a ocorrência do fungo *H. capsulatum* nas diferentes zonas da cavidade natural (externa, entrada, penumbra e afótica);
- ✓ Investigar a existência de restrição da ocorrência do fungo associada a alguma das zonas estudadas;
- ✓ Avaliar a prevalência de *H. capsulatum* em amostras de diferentes substratos e zonas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Localização

Para a realização deste projeto foram selecionadas 3 cavidades naturais, sendo que duas localizam-se no estado do Paraná e uma no estado de Minas Gerais (FIGURA 1 e TABELA 1).

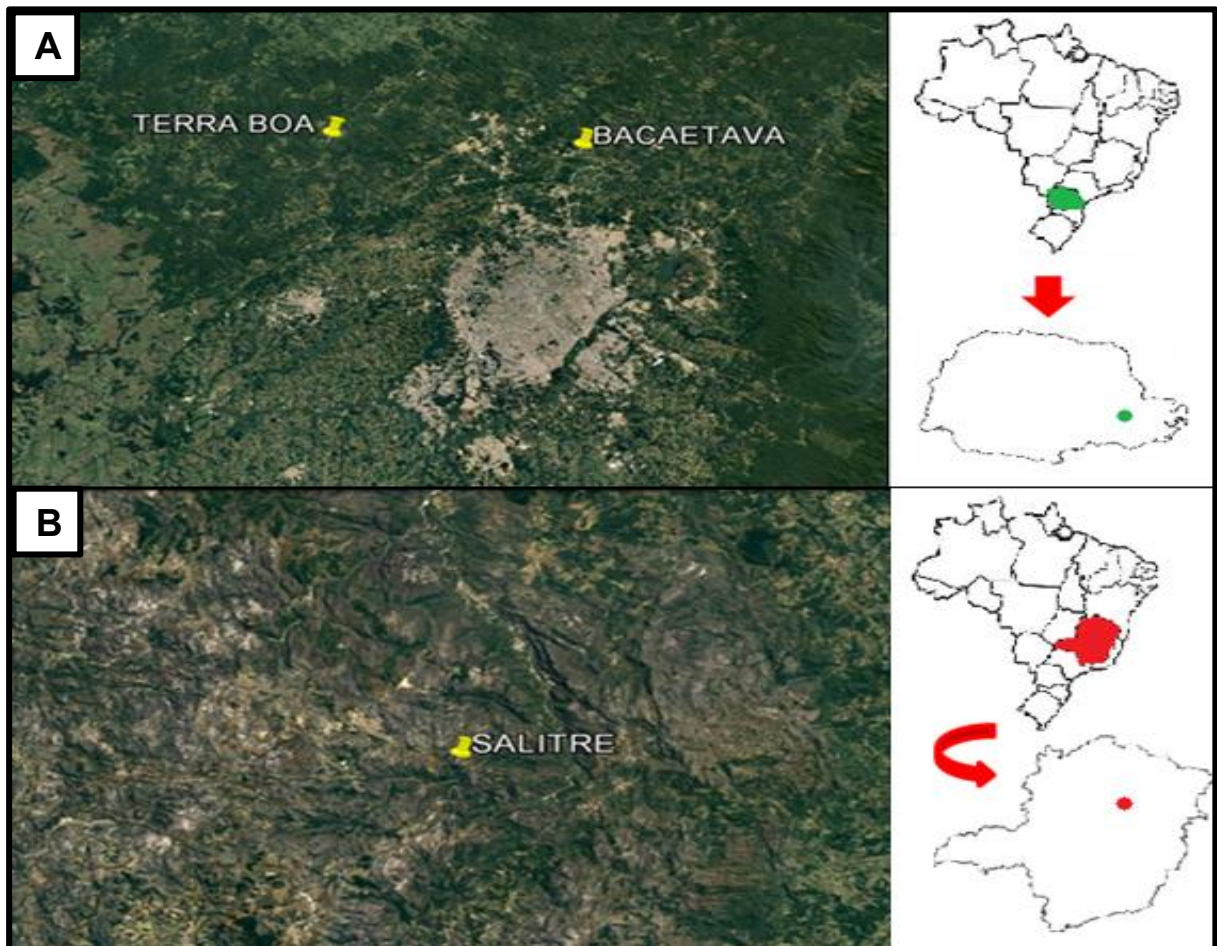


FIGURA 1. Representação da localização das cavidades naturais selecionadas para a investigação de *H. capsulatum*. **(A)** Região metropolitana de Curitiba (Paraná) onde se localizam as cavidades naturais Terra Boa e Bacaetava **(B)** Região da cidade de Diamantina (Minas Gerais) onde se localiza a gruta do Salitre.

FONTE: A AUTORA, 2016.

CAVIDADE NATURAL	NOME	LATITUDE	LONGITUDE	MUNICÍPIO DE REFERÊNCIA
1	GRUTA DE BACAETAVA	25°13'54"S	49°12'26"W	COLOMBO (PR)
2	GRUTA DO SALITRE	19°07'17"S	44°28'24"W	DIAMANTINA (MG)
3	GRUTA DE TERRA BOA	25°12'57"S	49°31'23"W	CAMPO MAGRO (PR)

TABELA 1. Cavernas selecionadas para o estudo com suas respectivas coordenadas geográficas e municípios de referência.

FONTE: A AUTORA, 2016.

4.2 Amostras e coleta de material biológico

As coletas dividiram-se em três categorias: sedimento (substrato depositado sobre o piso); guano (acúmulo de fezes de morcegos e aves) e substratos orgânicos (detritos vegetais e restos de animais).

Foram efetuadas coletas de sedimento próximo à entrada das cavernas selecionadas, com o objetivo de avaliar se a localização do fungo restringe-se ao interior das mesmas. Cada cavidade natural analisada foi dividida em quatro zonas: externa, entrada; penumbra e afótica. Dependendo da geografia de cada cavidade natural, as zonas foram divididas em zonas 1 e 2, pela diferença na extensão da mesma nas cavidades naturais selecionadas neste estudo. Para cada zona, foi coletado aproximadamente 100g de amostra provenientes das três categorias.

Para a coleta de sedimento, guano e substratos orgânicos foram utilizados sacos de coleta do tipo Whirl Pak® e colheres plásticas descartáveis. Para as amostras de sedimento, coletaram-se cinco diferentes pontos em cada uma das zonas para constituir uma amostra composta, já que o substrato depositado no solo da cavidade natural pode diferir consideravelmente numa mesma zona. Uma vez que foram encontradas situações diferentes entre os diferentes acúmulos de guano, como os provenientes de morcego ou outras aves, cada uma foi acomodada em um saco diferente. O mesmo procedimento adotado com as amostragens de guano foi utilizado para as amostras dos demais substratos orgânicos.

Todo o material coletado foi devidamente envasado e encaminhado ao Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LabMicro) da Universidade Federal do Paraná para análise. As amostras contidas nos sacos de coleta foram acondicionadas sob refrigeração a 6°C até o processamento das mesmas.

4.3 Extração de DNA total de amostras ambientais

Para a extração de DNA total e pesquisa da presença/ausência do fungo *Histoplasma capsulatum*, amostras de sedimentos e guano provenientes das cavidades naturais selecionadas foram submetidas à extração do seu DNA genômico com utilização do kit de extração E.Z.N.A. Soil DNA – Omega Biotek®, seguindo instrução do fabricante. Ao final do processo, foi obtido um volume total de 100 µL de DNA e a integridade de cada amostra foi verificada através de eletroforese por 1 hora a 104 V em gel de agarose a 0,8%, utilizando-se um volume de 3µL de DNA para 1,5µL de tampão contendo GelRed.



FIGURA 2. Kit de extração E.Z.N.A. Soil DNA – Omega Biotek®.

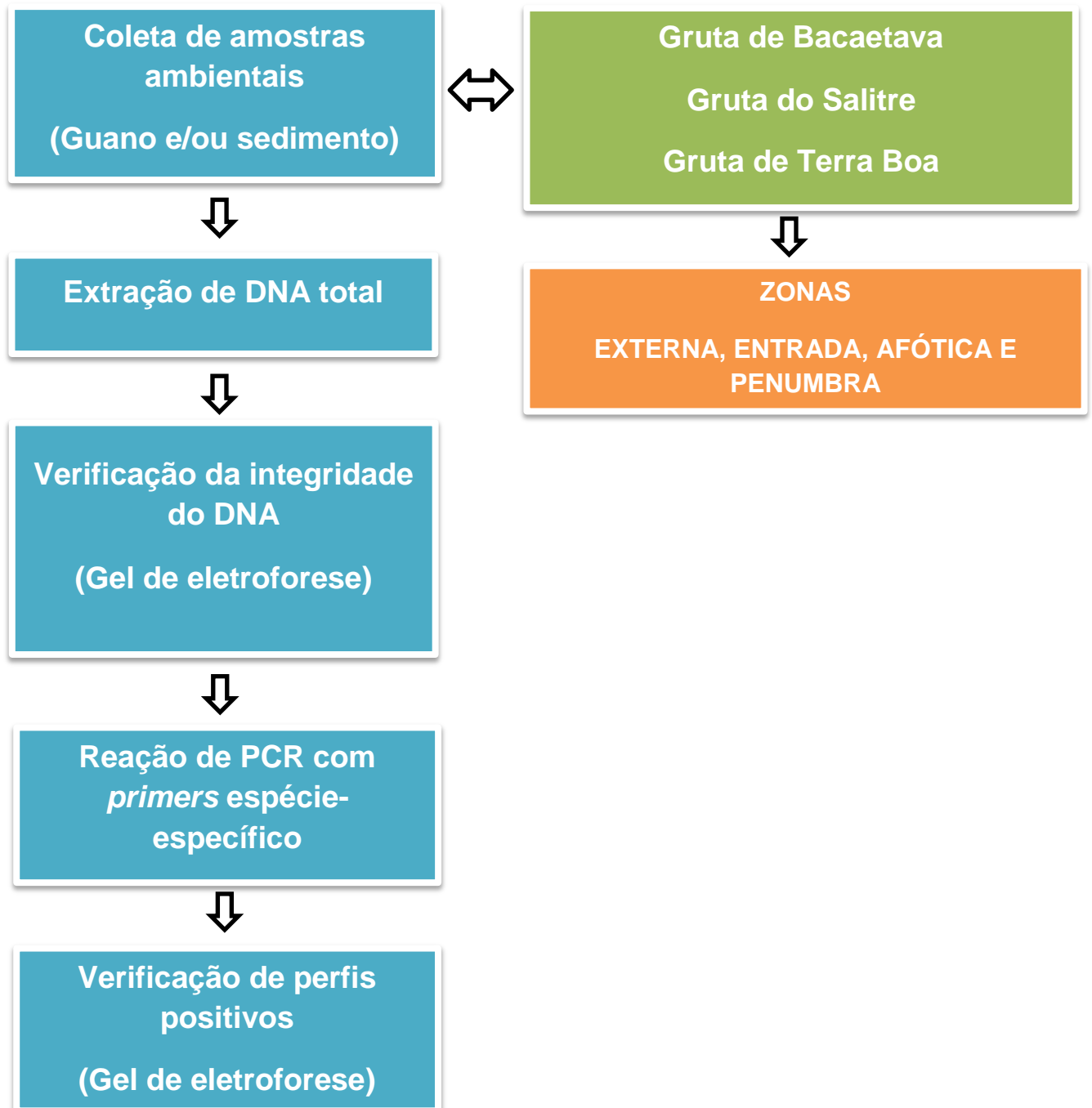
FONTE: A AUTORA, 2016.

4.4 Verificação da presença de *Histoplasma capsulatum* por reação em cadeia da polimerase (PCR)

Todos os DNA extraídos foram submetidos à amplificação, com utilização de *primers* espécie-específicos, HC-1 (5'- GGAGCCTCTGACCGGGAC-3') e HC-2 (5'- GCACGTCCCACCGGTCAG-3'), segundo metodologia descrita por Reid e Schafer (1999), com modificações. As reações de amplificação foram preparadas num volume de 12,5 µL cada, contendo 6,03 µL de água ultrapura esterilizada; 1,25 µL de tampão de PCR 10X; 0,77 µL de MgCl₂; 1,25 µL de dNTPs (2,5 mM); 0,5 µL de cada um dos iniciadores (10 pmol); 0,1 µL de taq DNA polimerase (1 U/mL) e 2 µL do DNA extraído.

A amplificação foi realizada em termociclador BioerLifePro TC-96/G/H(b)A nas seguintes condições: 94°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C durante 45 segundos, 53°C durante 1 minuto e 72°C durante 1 minuto, prosseguidos de 7 minutos a 72°C. Perfis positivos de amplificação foram verificados através de eletroforese por 1 hora a 104 V em gel de agarose a 1,6%, utilizando-se um volume de 2µL do produto de reação para 1,5 µL de tampão contendo GelRed, onde foi observado a presença de um fragmento de 400pb.

4.3 Estratégia Experimental



5. RESULTADOS

Neste estudo foi proposta a identificação do fungo *Histoplasma capsulatum* em amostras ambientais provenientes das grutas do Salitre, Terra Boa e Bacaetava, utilizando como método a PCR espécie-específica. Um total de 43 amostras foram analisadas, sendo 16 pertencentes à Gruta do Salitre, 20 da Gruta de Bacaetava e 7 da gruta de Terra Boa. Após a extração, verificou-se através de eletroforese a integridade do DNA. As amostras que apresentaram uma banda visível nesta etapa foram selecionadas para a amplificação com *primers* espécie-específicos.

Após a amplificação com *primers* espécie-específicos, perfis positivos para amplificação foram verificados através de eletroforese. O resultado desta amplificação pode ser observado nas figuras 3,4 e 5, enquanto as amostras provenientes de cada caverna estão agrupadas nas tabelas 2,3 e 4.

5.1 Bacaetava

Na tabela 2 estão listadas as amostras provenientes de Bacaetava, e o perfil de amplificação através de eletroforese pode ser observado na figura 4.

NÚMERO DA AMOSTRA	TIPO DA AMOSTRA	ZONA DA CAVERNA	PRESENÇA DE <i>H. capsulatum</i>
1	Guano	Entrada 1	-
2	Matéria orgânica	Entrada 1	+
3	Sedimento	Entrada 1	+
4	Guano	Entrada 2	-
5	Sedimento	Entrada 2	+
6	Matéria Orgânica	Entrada 2	-
7	Matéria Orgânica	Penumbra 1	-
8	Sedimento	Penumbra 1	+
9	Guano	Penumbra 1	-
10	Sedimento	Penumbra 2	-
11	Matéria Orgânica	Penumbra 2	-
12	Guano	Penumbra 2	+
13	Matéria Orgânica	Entrada 1	-
14	Sedimento	Entrada 1	-
15	Sedimento	Penumbra 1	-
16	Matéria Orgânica	Penumbra 1	-
17	Sedimento	Afótica	-
18	Guano	Afótica	-
19	Matéria Orgânica	Afótica	-
20	Sedimento	Externo	-

TABELA 2. Amostras provenientes de Bacaetava.

FONTE: A AUTORA, 2016.

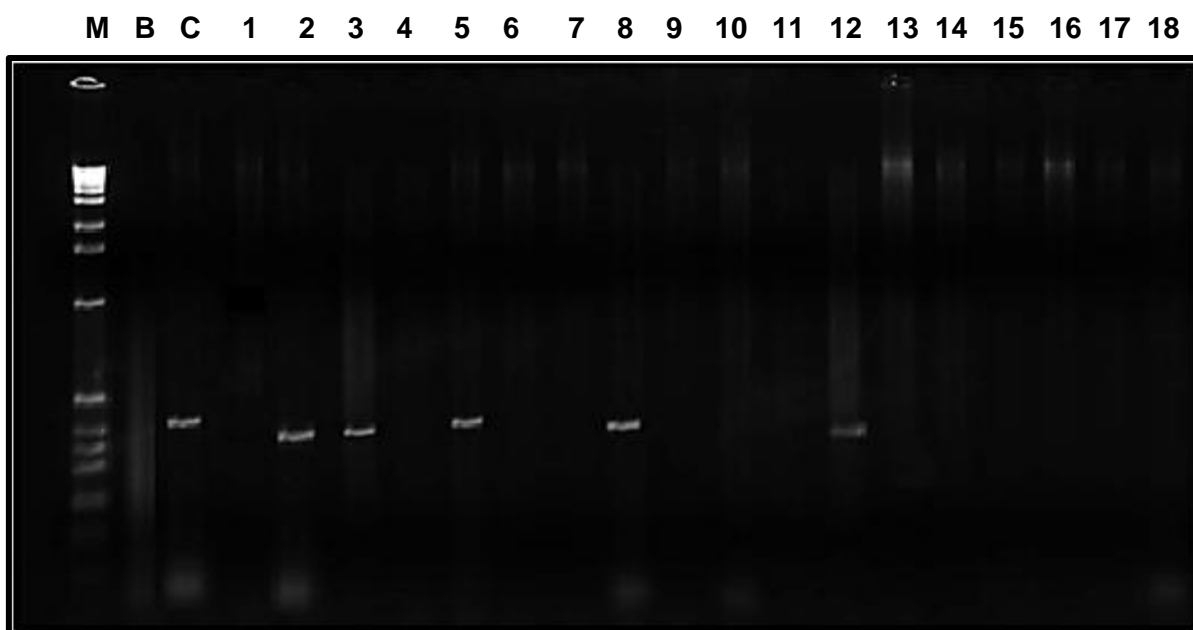


FIGURA 3. Perfil das amostras submetidas à reação de PCR espécie-específica de *Bacetava*. M – Marcador Molecular de 1kb; B – Branco; C – Controle positivo; 1 a 18 – Amostras de DNA de *H. capsulatum*.

5.2 Salitre

Na tabela 2 estão listadas as amostras provenientes de Salitre, e o perfil de amplificação através de eletroforese pode ser observado na figura 5.

NÚMERO DA AMOSTRA	TIPO DA AMOSTRA	ZONA DA CAVERNA	PRESENÇA DE <i>H. capsulatum</i>
21	Sedimento	Afótica 2	-
22	Sedimento	Afótica 2	-
23	Guano	Afótica 2	-
24	Guano andorinha	Afótica 2	-
25	Sedimento	Afótica 2	+
26	Guano	Afótica 2	-
27	Guano	Afótica 2	-
28	Sedimento	Entrada	-
29	Sedimento	Entrada	+
30	Solo	Penumbra	-
31	Matéria orgânica	Penumbra	+
32	Matéria orgânica	Externa	-
33	Solo	Externa	-
34	Guano	Afótica 1	-
35	Solo	Afótica 1	-
36	Matéria Orgânica	Afótica 1	-

TABELA 3. Amostras provenientes de Salitre.

FONTE: A AUTORA, 2016.

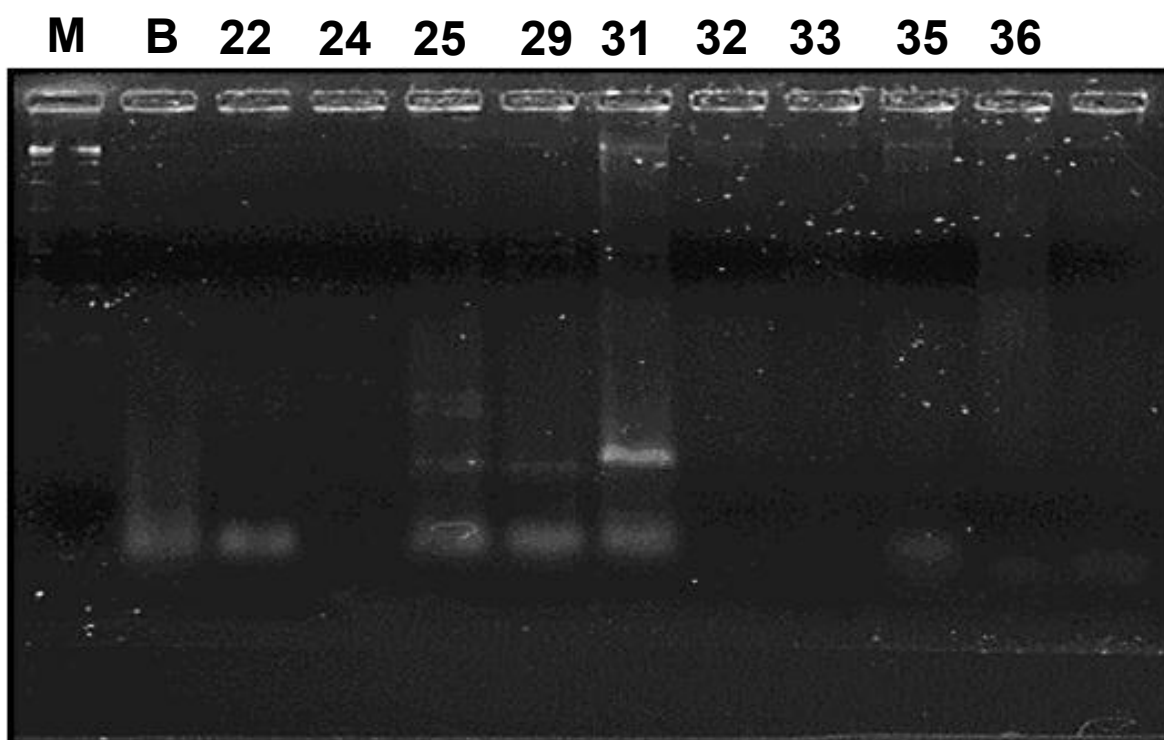


FIGURA 4. Perfil das amostras submetidas à reação de PCR espécie-específica de Salitre. M – Marcador Molecular de 1kb; B – Branco; 22, 24, 25, 29, 31, 32, 33, 35, 36 – Amostras de DNA de *H. capsulatum*.

5.3 Terra Boa

Na tabela 4 estão listadas as amostras provenientes de Terra Boa, e o perfil de amplificação através de eletroforese pode ser observado na figura 6.

NÚMERO DA AMOSTRA	TIPO DA AMOSTRA	ZONA DA CAVERNA	PRESENÇA DE <i>H. capsulatum</i>
37	Matéria orgânica	Entrada	-
38	Matéria orgânica	Afótica	-
39	Solo	Entrada	-
40	Guano	Afótica	+
41	Solo	Penumbra	-
42	Solo	Afótica	-
43	Matéria orgânica	Penumbra	-

TABELA 4. Amostras provenientes de Terra Boa.

FONTE: A AUTORA, 2016.

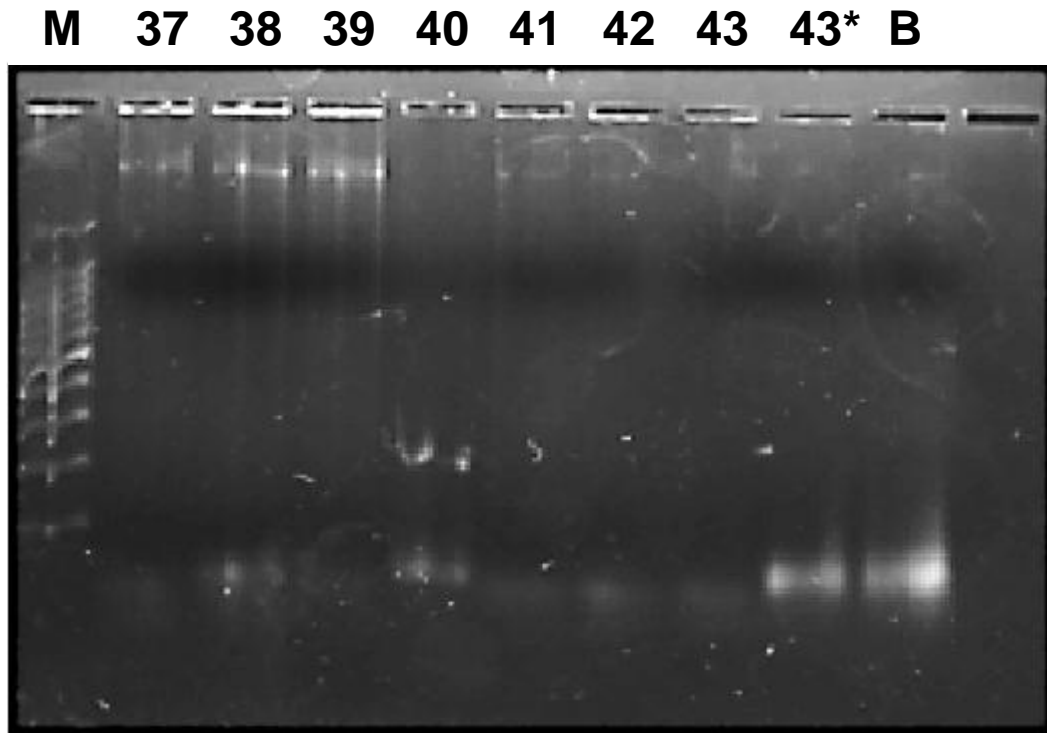


FIGURA 5. Perfil das amostras submetidas à reação de PCR espécie-específica de Terra Boa. M – Marcador Molecular de 1kb; B – Branco; 37 a 43 – Amostras de DNA de *H. capsulatum*. *Amostra que teve seu DNA extraído pela segunda vez.

6. DISCUSSÃO

As infecções fúngicas são responsáveis por grande morbidade e mortalidade no mundo. Apesar de possuírem distribuição ampla, ainda há grande falta de informações sobre as mesmas em algumas regiões, tornando mais desafiador o seu diagnóstico (VALLABHANENI *et al.*, 2016 ; KLIMKO *et al.*, 2015). Como exemplo dentro deste contexto, a histoplasmose é uma micose sistêmica transmitida através da inalação de esporos do fungo *Histoplasma capsulatum*. Este fungo tem seu desenvolvimento favorecido em solos com grande quantidade de nitrogênio, como encontrado em cavernas habitadas por morcegos e aves. O sucesso no tratamento da doença depende em grande parte de métodos diagnósticos que sejam empregados precocemente (BRADSHER, 1996; KAUFFMAN, 2006; CURY *et al.*, 2001).

Neste trabalho foi utilizada a técnica de PCR espécie-específica para a detecção de *H. capsulatum* em amostras ambientais provenientes de Salitre, da Bacaetava e Terra Boa. Um par de *primers* HC-1 e HC-2 foi selecionado para identificar especificamente a região interna ao ITS do DNA de *H. capsulatum*. Do total de amostras investigadas (n=43) nas três cavernas, 9 amostras foram positivas para a presença de *H. capsulatum*, sendo que 3 pertencem à Salitre, 1 à Terra Boa, e 5 à Bacaetava. Dentre estas amostras positivas, 5 foram provenientes de sedimento, 2 a partir de matéria orgânica e 2 de guano. A presença do fungo *H. capsulatum* nos diferentes tipos de amostras incluídas neste estudo evidenciam que os acúmulos de guano, sedimento e matéria orgânica presentes nestas cavernas fornecem um ambiente favorável para seu desenvolvimento. Isto já foi observado em outros locais, onde a presença das fezes de morcegos e aves resulta numa grande concentração do fungo *H. capsulatum*, tornando locais como cavernas potencialmente perigosos para um indivíduo (ZANCOPÉ-OLIVEIRA; WANKE, 1987; TAYLOR *et al.*, 1999).

Em relação às zonas das três cavernas onde foi detectada a presença de *H. capsulatum*, o maior número de amostras positivas (n=4) pertencia à zona de entrada. Mesmo que esta zona possua condições inferiores de umidade em relação às zonas de penumbra e afótica, esta área também pode representar um nicho ecológico sustentável para *H. capsulatum*. A presença deste fungo em áreas externas às cavernas já foi investigada por Jülg e colaboradores em 2008, onde

pesquisadores que estavam próximos à caverna de Tamana não entraram neste local, porém, desenvolveram a forma pulmonar aguda da doença. Este fato ressalta que possivelmente o fungo *Histoplasma capsulatum* não tem uma associação restrita a alguma área específica da caverna, podendo desenvolver-se nas diferentes áreas da mesma.

Em relação à técnica empregada, a PCR espécie-específica já possui considerável número de registros na literatura, onde foi utilizada para a identificação de *H. capsulatum* em amostras de variadas origens, como: tecidos humanos (BRACCA *et al.*, 2003) , morcegos (GALVÃO-DIAS *et al.*,2010; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2012) e de solo (REID; SCHAFFER, 1999). Apesar de representar uma técnica de grande eficácia, esta não substitui métodos mais convencionais como o crescimento do fungo em cultura. Já que a maioria dos casos de histoplasmose é de ocorrência esporádica, a técnica de PCR espécie-específica surge como uma alternativa que se encaixa em casos de urgência no diagnóstico, como de pacientes com suspeita de histoplasmose disseminada. Desta maneira, esta técnica pode ser definida como uma ferramenta complementar no diagnóstico de histoplasmose, podendo oferecer resultados mais rápidos quando há a necessidade e mais precisos quando as técnicas convencionais geram incertezas no diagnóstico.

Além disso, o uso da PCR espécie-específica para a investigação de amostras ambientais provenientes de cavernas pode ser útil para a orientação de indivíduos que podem visitar cavidades naturais. A histoplasmose é uma das doenças mais frequentemente associadas a estes ambientes, onde a exposição ao fungo pode acontecer em decorrência de atividades ocupacionais ou de recreação (IGREJA, 2011). São vastos os registros de pesquisadores (TAYLOR *et al.*, 1999), trabalhadores de depósitos de lixo e construções (HUHN *et al.*,2005; BARTLETT *et al.*, 1982) e turistas (HOENIGL *et al.*,2008) que entraram em contato com *H. capsulatum* em cavidades naturais. Desta maneira, a identificação de *H. capsulatum* fungo nestes locais pode servir como base na elaboração de planos de manejo, que terão como objetivo assegurar a preservação destes ambientes e alertar para a existência de riscos à saúde, como a exposição ao *H. capsulatum* (LIMA; MORAIS, 2006). Sendo assim, algumas cavidades naturais brasileiras já foram investigadas em relação à presença de *H. capsulatum*, como a Gruta do Lago Azul (Mato Grosso do Sul) (REZENDE *et al.*,2003), o complexo de grutas areníticas de Altinópolis (São Paulo) (RODRIGUES, 1986), Gruta de Lapa Nova (Minas Gerais) (TAYLOR *et*

al.,2013) e grutas de formação calcárea pertencentes à série Bambuí (Brasília-DF) (SCHIMDT *et al.*, 1973).

As cavidades naturais Bacaetava e Salitre, incluídas neste estudo, são grandes atrações turísticas naturais, fazendo parte do ecoturismo. No ano de 2014, foram contabilizados aproximadamente 24000 visitantes na cavidade natural Bacaetava (SESSEGOLO *et al.*,2015), e recentemente, têm sido elaboradas taxas de utilização de Salitre para a comunidade que deseja usar este espaço para lazer (ARAUJO *et al.*,2015). De forma diferente, a cavidade natural Terra Boa têm despertado interesse pelas atividades de exploração mineral do maciço calcário (SESSEGOLO, 2006). Assim, o grande crescimento de circulação nestes locais não implica necessariamente na proibição do acesso à comunidade, entretanto, estudos como este podem orientar recomendações sobre uso de equipamentos de segurança e até o impedimento de pessoas em maior risco a uma eventual exposição ao *H. capsulatum*, como hospedeiros imunocomprometidos.

7. CONCLUSÃO

A técnica de PCR espécie-específica utilizada neste trabalho foi capaz de identificar a presença de *Histoplasma capsulatum* em amostras de matéria orgânica, sedimento e guano. A distribuição das amostras positivas contemplou todas as zonas da cavidade natural, sendo encontrada maior prevalência na zona de entrada. Portanto, a ocorrência do fungo não se restringiu somente ao interior da cavidade natural.

A maior prevalência de *H. capsulatum* nas amostras de sedimento evidencia que estes ambientes são favoráveis para o crescimento de *Histoplasma capsulatum* pela grande deposição deste material sobre o solo, tornando Bacaetava, Salitre e Terra Boa nichos ecológicos adequados para o estabelecimento deste fungo.

Pelo grande apelo turístico e interesse econômico destas cavidades naturais, este trabalho pode impulsionar mais investigações do fungo *Histoplasma capsulatum* nestas áreas, contribuindo para a preservação destes ambientes e na prevenção riscos associados à histoplasmose.

8. ESTRUTURA

Todos os experimentos deste projeto foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LabMicro) da Universidade Federal do Paraná, como parte integrante do Macroprojeto de pesquisa intitulado: “Bioprospecção ambiental de fungos de interesse clínico”, coordenado pela Prof.^a Dr.^a. Vania Aparecida Vicente.

As coletas foram realizadas em colaboração com a Ecosystema Consultoria Ambiental Ltda, responsável por esta etapa experimental.

9. IDENTIFICAÇÃO DOS DEMAIS PARTICIPANTES DO PROJETO

- ✓ Angela Bozza de Almeida. Pós-doutoranda pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia (PPGEBB-UFPR). Doutora em Microbiologia, Parasitologia e Patologia. Email: angela.bozza@gmail.com

- ✓ Jason Lee Furuie – Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia (PPGEBB-UFPR). Email: jason.furuie@gmail.com

- ✓ Renata Rodrigues Gomes - Pós-Doutoranda PNPd da Universidade Federal do Paraná, pelo Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia (PPGMPP-UFPR). Doutora em Ciências Biológicas. E-mail: rrgrenata@gmail.com.

- ✓ Gisele Cristina Sessegolo – Doutora pelo programa de Pós-graduação em Geografia (PPGEO- UFPR). Diretora na empresa Ecossistema Consultoria Ambiental. Email: gisele.sessegolo@terra.com.br

10. REFERÊNCIAS

AIDÉ, M.A. Capítulo 4 – Histoplasmose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v.35, p.1145-1151, 2009.

AJELLO, L. Soil as natural reservoir for human pathogenic fungi. **American Association for the Advancement of Science**. v.123, p.876-879, 1956.

AJELLO, L.; ZEIDBERG, L.D. Isolation of *Histoplasma capsulatum* and *Allescheria boydii* from soil. **American Association for the Advancement of Science**. v.113, p.662-663, 1951.

AL-ANI, F.K. Epizootic lymphangitis in horses: a review of the literature. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**. v.18, p.691-699, 1999.

ALLARD, A.; DÉCARIE, D.; GRENIER, J.C.; LACOMBE, M.C.; LEVAC, F. Histoplasmosis Outbreak Associated with the Renovation of an Old House — Quebec, Canada, 2013. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. v. 62, p.1041-1044, 2014.

AMENI, G. Epidemiology of equine histoplasmosis (epizootic lymphangitis) in carthorses in Ethiopia. **Veterinarian Journal**. v.172, p.160-165, 2006.

AMENI, G.; SIYOUM, F. Study on Histoplasmosis (Epizootic Lymphangitis) in Cart-Horses in Ethiopia. **Journal of Veterinary Science**. v.3, p.135-139, 2002.

ANJOS, D.T. NUNES, E; SOUZA, R. VICENTINI-MOREIRA, A. SOUZA, M.C. Incidência de histoplasmose em espeleólogos e monitores ambientais do parque estadual turístico do Alto Ribeira (PETAR). Anais do XXIX Congresso Brasileiro de Espeleologia Ouro Preto MG, 07-10 de junho de 2007 - Sociedade Brasileira de Espeleologia.

ARAUJO, H.R.; OLIVEIRA JUNIOR, A.F.; AZEVEDO, A.A. Valoração de serviços ambientais: subsídio para a sustentabilidade do atrativo natural Gruta do Salitre, Diamantina, Minas Gerais. **Pesquisas em Turismo e Paisagens Cársticas**. v.8, p.17-26, 2015.

ASHFORD, D.A.; HAJJEH, R.A.; KELLEY, M.F.; KAUFMAN, L.; HUTWAGNER, L.; MCNEIL, M.M. Outbreak of histoplasmosis among cavers attending the national speleological society annual convention, Texas, 1994. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 60, p. 899–903, 1999.

BARTLETT, P.C.; VONBEHREN, L.A.; TEWARI, R.P.; MARTIN, R.J.; EAGLETON, L.; ISAAC, M.J.; KULKARNI, P.S. Bats in the belfry: an outbreak of histoplasmosis. **Am. J. Public Health**. v. 72, n. 12, p.1369-72, 1982.

BAUMAN, D.S.; SMITH, C.D. Comparison of Immunodiffusion and Complement Fixation tests in the diagnosis of Histoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v.2, p.77-80, 1975.

BENEDICT, K.; MODY, R.K. Epidemiology of Histoplasmosis Outbreaks, United States, 1938–2013. **Emerging Infectious Diseases**. v. 22, p. 370-378.

BRACCA, A.; TOSELLO, M.E.; GIRARDINI, J.E.; AMIGOT, S.L.; GOMEZ, C.; SERRA, E. Molecular Detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in Human Clinical Samples. **Journal of Clinical Microbiology**. v.41, p. 1753–1755, 2003.

BRADSHAW, R.W. Histoplasmosis and blastomycosis. **Clinical Infectious Diseases**. v. 2, p.102-111, 1996.

BRILHANTE, R.S.N.; GUEDES, G.M.M.; RIELLO, G.B.; RIBEIRO, J.F. ALENCAR, L.P. BANDEIRA, S.P.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; OLIVEIRA, J.S.; FREIRE, J.M.M.; MESQUITA, J.R.L.; CAMARGO, Z.P.; CORDEIRO, R.A.; ROCHA, M.F.G.; SIDRIM, J.J.C. RYP1 gene as a target for molecular diagnosis of histoplasmosis. **Journal of Microbiological Methods**. v.130, p.112-114, 2016.

BUITRAGO, M. J. ; CANTEROS, C. E.; LEÓN, G. F.; GONZÁLEZ, Á.; OLIVEIRA, M.M.; MUÑOZ, C. O.; RAMIREZ, J. A.; TORANZO, A. I.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.; CUENCA-ESTRELLA, M. Comparison of PCR protocols for detecting *Histoplasma capsulatum* DNA through a multicenter study. **Revista Iberoamericana de Micología**. v.30, n.4, p.256-260, 2013.

BUXTON, J.A.; DAWAR, M., WHEAT, J.; BLACK, W.A.; AMES, N.G.; MUGFORD, M., PATRICK, D.M. Outbreak of Histoplasmosis in a school party that visited a cave in Belize: Role of antigen testing in diagnosis. **Journal of Travel Medicine**. v.9, p.48–50, 2002.

CAPONE, D.; JANSEN, J.M.; LOPES, A.J.; SIQUEIRA, H.R.; DA COSTA, A.A.; CAPONE, R.B. Micoses pulmonares. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**. v.9, p.72-80, 2009.

CHESTERS, C.G.C. A method of isolating soil fungi. **Transactions British Mycological Society**. v.24, p.352-355, 1940.

CHESTERS, C.G.C.; THORNTON, R.H. A comparison of techniques for isolating soil fungi. **Transactions British Mycological Society**. v. 39, p.301-313, 1956.

CHOI, Y.; HYDE, K.D.; WELLCOME, W.H.H. Single spore isolation of fungi. **Fungal Diversity**. v.3, p. 29-38, 1999.

COSTA, S.O.P. da. Investigações preliminares sobre a incidência de reatores à histoplasmina em Curitiba (Paraná). **Anais da Faculdade de Medicina do Paraná**. v.4, p. 45-58, 1961.

COTTLE, L.E.; GKRIANIA-KLOTSAS, E.; WILLIAMS, H.J.; BRINDLE, H.E.; CARMICHAEL, A.J.; FRY, G.; BEECHING, N.J. A Multinational Outbreak of

Histoplasmosis Following a Biology Field Trip in the Ugandan Rainforest. **Journal of Travel Medicine**. v.20, p.83-87, 2013.

CURY, G.C.; DINIZ, A.F.; COSTA E CRUZ, G.; HOBAIKA, A.B.S. Outbreak of histoplasmosis in Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 34, n.5, p.483-486, 2001.

DANTAS, K.C.; FREITAS, R.S. MOREIRA, A.P.V.; SILVA, M.V.; BERNARD, G.; VASCONCELLOS, C.; CRIADO, P.R. The use of nested Polymerase Chain Reaction (nested PCR) for the early diagnosis of *Histoplasma capsulatum* infection in serum and whole blood of HIV-positive patients. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 88, n.1, p.141-143, 2013.

D'AVILA, S.C.G.P.; CHAPADEIRO, E. Características histopatológicas e imunohistoquímicas das lesões cutâneas e da mucosa oral na histoplasmose disseminada de portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.31, p.539-547, 1998.

DE, D.; NATH, U.K. Disseminated Histoplasmosis in Immunocompetent Individuals- not a so Rare Entity,in India. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**. v. 7, p-, 2015.

DEEPE JR, G.S. Immune response to early and late *Histoplasma capsulatum* infections. **Current Opinion in Microbiology**. v.3, p.359–362, 2000.

DIGHE, N.S. PATTAN, S.R. BHAWAR, S.B. GAWARE, V.M. HOLE, M.B. CHAVAN, P.A. PARJANE,S.K. Darling's Disease: A Review. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**. v.1, p. 88-101, 2009.

DYLEWSKI, J. Acute pulmonary histoplasmosis. **Canadian Medical Association Journal**. v. 183, 2011.

EMMONS, C.W. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from Soil. **Public Health Reports**. v.64, p.892-896, 1949.

ERKENS,K.; LADEMANN,M.; TINTELNOT,K.; LAFRENZ,N.; KABEN,U.; REISINGER,E.C. Histoplasmosis in a group of bat researchers returning from Cuba. **Deutsche Medizinische Wochenschrift** . v.127, p.21-25, 2002.

FAVA, S.D.C.; FAVA NETTO, C. Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidioidin sensitivity in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** . v.40, p.155-164,1998.

FERREIRA, M.S.; BORGES, A. S. Histoplasmosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 42 , n.2, p.192–198, 2009.

FERRER, C.; COLOM, F.; FRASÉS, S.; MULET, E.; ABAD, J.L.; ALIO,J.L. Detection and Identification of Fungal Pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S Ribosomal DNA Typing in Ocular Infections. **Journal of Clinical Microbiology**. v.39, p. 2873–2879, 2001.

FIGUEIREDO, L.A.V. História da espeleologia brasileira: protagonismo e atualização cronológica. **ANAIS do 31º Congresso Brasileiro de Espeleologia**. Ponta Grossa-PR, 21-24 de julho de 2011 – Sociedade Brasileira de Espeleologia.

FURUIE, J.L. Desenvolvimento de sonda cadeado para diagnóstico molecular de *Histoplasma capsulatum* baseado na técnica de amplificação em círculo rolante (RCA). **Dissertação de Mestrado**, PPGEBB, 2014.

GALVÃO DIAS, M.A.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; GIUDICE, M.C.; MONTENEGRO NETTO, H.; JORDÃO, L.R.; GRIGORIO, I.M.; ROSA, A.R.; AMORIM, J.; NOSANCHUK, J.D.; TRAVASSOS, L.R. TABORDA, C.P. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from bats in the urban área of São Paulo State, Brazil. *Epidemiology Infectious*. v.139, p.1642–1644, 2011.

GARCIA-GUIÑÓN, A.; TORRES-RODRÍGUES, J.M. NDIDONGARTE, D.T.; CORTADELLAS, F.; LABRÍN, L. Disseminated histoplasmosis by *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* in a paediatric patient from the Chad Republic, Africa. **European Journal of Clinical Microbiological Infectious Diseases**. v. 28, p.697-699, 2009.

GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, E.; ALIOUAT-DENIS, C.M.; CARRETO-BINAGHI, L.E.; RAMÍREZ, J.A.; RODRÍGUEZ-ARELLANES, G.; DEMANCHE, C.; CHABE, M.; ALIOUAT, E.M.; DEICAS, E.; TAYLOR, M.L. An Hcp100 gene fragment reveals *Histoplasma capsulatum* presence in lungs of *Tadarida brasiliensis* migratory bats. **Epidemiology & Infection**. v.140, p.1955–1963, 2012.

GUARNER, J.; BRANDT, M.E. Histopathologic Diagnosis of Fungal Infections in the 21st Century. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 24, p. 247-280, 2011.

GUIOT, H. M. ; PASSARELL-BERTRÁN, J.; TORMOS, L.M. ; GONZÁLEZ-KEELAN, C. ; PROCOP, G.W.; FRADERA, J. ; SÁNCHEZ- SERGENTÓN, C.; MÉNDEZ, W. Ilea perforation and reactive hemophagocytic syndrome in a patient with disseminated histoplasmosis: the role of the real-time polymerase chain reaction in the diagnosis and successful treatment with amphotericin Blipid complex. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 57, n. 12, p.429–433, 2007

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

HOENIGL, M.; SCHWETZ, I.; WURM, R.; SCHEIDL, S.; OLSCHESKI, H.; KRAUSE, R. Pulmonary Histoplasmosis in Three Austrian Travelers After a Journey to Mexico. **Infection**. v.36, p.282-284, 2008.

HOLBROOK, E.D.; RAPPLEYE, C.A. *Histoplasma capsulatum* pathogenesis: making a lifestyle switch. **Current Opinion in Microbiology**. v. 11, p.318–324, 2008.

HORWARTH, M.C.; FECHER, R.A.; DEEPE, G.S Jr. *Histoplasma capsulatum*, lung infection and immunity. **Future Microbiology**. v.10, p. 967–975, 2015.

HUHN,G.D.; AUSTIN,C.; CARR,M.; HEYER,D.; BOUDREAU,P. GILBERT,G.; EIMEN,T.; LINDSLEY,M.D.; CALI,S.; CONOVER,C.S.; DWORKIN, M.S. Two Outbreaks of Occupationally Acquired Histoplasmosis: More than Workers at Risk. **Environmental Health Perspectives**. v.113 , p.585-589, 2005.

IGREJA, R.P. Infectious Diseases Associated with Caves. **Wilderness & Environmental Medicine**. v.22, p.115–121, 2011.

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

KAJFASZ, W.; BASIAK, W. Outbreak of pulmonary histoplasmosis involving a group of four Polish travellers returning from Ecuador. **International Maritime Health**. v. 63, p.59-62, 2012.

KATHURIA, S.; CAPOOR, M.R.; YADAV, S.; SINGH, A.; RAMESH, V. Disseminated histoplasmosis in an apparently immunocompetent individual from north India: a case report and review. **Medical Mycology**. v. 51, p. 774-778, 2013.

KAUFFMAN, C.A. Histoplasmosis: a Clinical and Laboratory Update. *Clinical Microbiology Reviews*. v.20, p.115-132, 2007.

KISHIMOTO, R.A.; BAKER, G.E. Pathogenic and Potentially Pathogenic Fungi Isolated from Beach Sands and Selected Soils of Oahu, Hawaii. **Mycologia**. v.61, p.537-548, 1969.

KLIMKO, N.; KOZLOVA, Y.; KHOSTELIDI, S.; SHADRIVOVA, O.; BORZOVA, E.; BURYGINA, N.; DENNING, D.W. The burden of serious fungal diseases in Russia. **Mycoses**. v.58, p.58-62, 2015.

KOEPSSELL, S.A.; HINRICHS, S.H.; IWEN, P.C. Applying a Real-Time PCR Assay for *Histoplasma capsulatum* to Clinically Relevant Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Human Tissue. **Journal of Clinical Microbiology**. v.50, p.3395–3397, 2012.

KOTTON, C.N. Travel and transplantation: travel-related diseases in transplant recipients. **Current Opinion in Organ Transplantation**. v.17, n.6, p. 594–600, 2012.

KUROWSKI, R; OSTAPCHUK, M. Overview of histoplasmosis. **American Family Physician**. v.66, p.2247-2252, 2002.

LIMA, T.F.; MORAIS, M.S. Contribuições para o desenvolvimento de plano de manejo em ambiente cavernícola - Gruta do Maquiné: Um estudo de caso. **Geonomos**. v.14,p. 45 -53, 2006.

LONDERO, A.T.; RAMOS, C.D. The status of histoplasmosis in Brazil. **Mycopathologia**. v. 64, p. 53-156, 1978.

LÓPEZ,L.F.; VALENCIA,Y.; TOBÓN,A.M.; VELÁSQUEZ,O.; SANTA,C.D.; CÁCERES,D.H.; RESTREPO,A.; CANO,L.E. Childhood histoplasmosis in Colombia: Clinical and laboratory observations of 45 patients. **Medical Mycology**. v. 54, p.677-683, 2016.

LOULERGUE, P.; BASTIDES, F.; BAUDOUIN, V.; CHANDENIER, J.; MARIANI-KURKDJIAN, P.; DUPONT, B. ; VIARD, J.P.; DROMER, F.; LORTHOLARY, O. Literature review and case histories of *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* infections in HIV-infected patients. **Emerging Infectious Diseases**. v.13, p.1647- 1652, 2007.

LYON,G.M.; BRAVO,A.V.; ESPINO,A.; LINDSLEY,M.D.; GUTIERREZ,R.E.; RODRIGUEZ,I. CORELLA,A.; CARRILLO,F.; MCNEIL,M.M.; WARNOCK,D.W.; HAJJEH,R.A. Histoplasmosis associated with exploring a bat-inhabited cave in Costa Rica, 1998–1999. v.70, p.438-442, 2004.

MANFREDI, R.; MAZZONI, A.; NANETTI, A. CHIODO, F. *Histoplasmosis capsulati* and *duboisii* in Europe: the impact of the HIV pandemic, travel and immigration. **European Journal of Epidemiology**. v.10, p.675–81, 1994.

MARTIN, K.J.; RYGIEWICZ, P.T. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. **BMC Microbiology**. v. 5, p.1-11,2005.

MAUBON, D.; SIMON, S.; AZNAR, C. Histoplasmosis diagnosis using a polymerase chain reaction method. Application on human samples in French Guiana, South America. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v.58, p.441-444, 2007.

McKINSEY, D.S.; SPIEGEL, R.A.; HUTHWAGNER, L.; STANFORD, J.; DRIKS, M.R.; BREWER, J.; GUPTA, M.R.; SMITH, D.L.; O'CONNOR, M.C.; DALL, L. Prospective Study of Histoplasmosis in Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus: Incidence, Risk Factors, and Pathophysiology. **Clinical Infectious Diseases**. v. 24, p.1195–1203, 1997.

MEKONNEN, N.; MAKONNEN, E. ; AKLILU, N. ; AMENI, G. Evaluation of berries of *Phytolacca dodecandra* for growth inhibition of *Histoplasma capsulatum* var. *farciminosum* and treatment of cases of epizootic lymphangitis in Ethiopia. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v.2, n.7, p. 505-510, 2012.

MIHU, M.R.; NOSANCHUK, J.D. Histoplasma Virulence and Host Responses. **International Journal of Microbiology**. v. 2012, p.1-5, 2011.

MINOZA, A.; ZECLER, J.; MIOSSEC, C.; QUIST, D.; PIERRE-FRANÇOIS, S.; DELIGNY, C.;SIMON,S.;AZNAR,C. Clustered cases of histoplasmosis due to *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in Martinique: Case reports and

environmental investigation. **Journal of Medical Mycology**. v.26, p.377-384, 2016.

MUÑOZ, B.; MARTÍNEZ, M.A.; PALMA, G.; RAMÍREZ, A.; FRÍAS, M.G.; REYES, M.R.; TAYLOR, M.L.; HIGUERA, A.L.; CORCHO, A.; MANJARREZ, M.E. Molecular characterization of *Histoplasma capsulatum* isolated from an outbreak in treasure hunters *Histoplasma capsulatum* in treasure hunters. **BMC Infectious Diseases** . v.10, p. 1-7, 2010.

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

NGUYEN, V.Q.; SIL, A. Temperature-induced switch to the pathogenic yeast form of *Histoplasma capsulatum* requires Ryp1, a conserved transcriptional regulator. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.105, p. 4880–4885, 2008.

OHNO, H.; OGATA, Y.; SUGURO, H.; YOKOTA, S.; WATANABE, A.; KAMEI, K.; YAMAGOE, S.; OKAWARA-ISHIDA, A.; KANEKO, Y.; ORINO, A.; YAMANE, K.; TSUJI, T.; NAGATA, N.; HASEGAWA, H.; ARAKAWA, Y.; SATA, T.; MIYAZAKI, Y. Outbreak of Histoplasmosis among Healthy Young Japanese Women after Traveling to Southeast Asia. **Internal Medicine**. v. 49, p. 491-495, 2010.

OLIVEIRA, F.M. UNIS, G. SEVERO, L.C. Microepidemia de histoplasmose em Blumenau, Santa Catarina. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v.32, p.375-378, 2006.

OLIVEIRA, P.B.; MATTOS, A.L.A.; DE ABREU, M.A.M.M. Importance of multidisciplinary approach in diagnosis of histoplasmosis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v.91, p.362-364, 2016.

ORSI, A.T. CHRUSCIK-TALHARI, A. FERREIRA, L.C.L. TALLHARI, C. NOGUEIRA, L. SANTOS, M.; TALHARI, S. Coinfecção histoplasmose e AIDS. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 86, p.1025-1026, 2011.

O'SULLIVAN, M.V.N.; WHITBY, M.; CHAHOUD, C.; MILLER, S.M. Histoplasmosis in Australia: A report of a case with a review of the literature. **Australian Dental Journal**. v. 49, p.94-9, 2004.

PASSOS, A.N.; KOHARA, V.S.; FREITAS, R.S.; VICENTINI, A.P. Immunological assays employed for the elucidation of an histoplasmosis outbreak in São Paulo, SP. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 45, p.1357-1361, 2014.

PUGSLEY, H.E.; BROWN, A.S.; CHEUNG, T. Chronic Cavitory Histoplasmosis of the Lung. **Canadian Medical Association Journal**. v.88, p. 646-649, 1963.

RAINA, R.K.; MAHAJAN, V.; SOOD, A.; SAURABH, S. Primary Cutaneous Histoplasmosis in an Immunocompetent Host from a Nonendemic Area. **Indian Journal of Dermatology**. v.61, p.467, 2016.

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

RESTALLACK, D.M.; WOODS, J.P. Molecular epidemiology, pathogenesis, and genetics of the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. **Microbes and Infection**. v.1, p. 817–825, 1999.

REZENDE, C. C., DUARTE, D.C., FILIU, W.F.O. Pesquisa de *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum* na Gruta Lago Azul, Bonito – MS. **Anais XXVII Congresso de Brasileiro de Espeleologia**. Januária, MG. 2003.

RICHAUD, C.; CHANDESRIS, M.O.; LANTERNIER, F.; BENZAGUEN-FORNER, H.; GARCIA HERMOSO, D.; PICARD, C.; CATHERINOT, E.; BOUGNOUX, M.E.; LORTHOLARY, O. Case Report: Imported African Histoplasmosis in an Immunocompetent Patient 40 Years after Staying in a Disease-Endemic Area. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 91, p.1011-1014, 2014.

RIVASI, F.; CASALI, B.; NANETTI, A.; COLLINA, G.; MAZZONI, A. *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* occurring in an HIV-positive Ghanaian immigrant to Italy. **APMIS**. v.109, p.721-725, 2001.

ROCHA-SILVA, F.; FIGUEIREDO, S.M.; SILVEIRA, T.T.S.; ASSUNÇÃO, C.B.; CAMPOLINA, S.S.; PENA-BARBOSA, J.P.P.; ROTONDO, A.; CALIGIORNE, R.B. Histoplasmosis outbreak in Tamboril Cave- Minas Gerais state, Brazil. **Medical Mycology Case Reports**. v. 4, p. 1–4, 2014.

RODRIGUES, G.S. Levantamento micológico das grutas areníticas de Altinópolis (SP) e uma resenha informativa sobre o *Histoplasma capsulatum*. **Espeleo-Tema**. v.15, p.34-42, 1986.

RODRIGUES, M.T.; RESENDE, M.A. Epidemiologic skin test survey of sensitivity to paracoccidioidin, histoplasmin and sporotrichin among gold mine workers of Morro Velho Mining, Brazil. **Mycopathologia**. v 135, p.89-98, 1996.

ROSSINI, T.F.; GOULART, L.S. Classic histoplasmosis: Review. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v. 38, p.275-279, 2006.

SAHEKI, M.M.; SCHUBACH, A.O.; SALGUEIRO, M.M.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; WANKE, B.; LAZERA, M. Histoplasmosse cutânea primária: relato de caso em paciente imunocompetente e revisão de literatura. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 41, p.680-682, 2008.

SALOMON, J.; FLAMENT-SAILLOUR, M.; TRUCHIS, P.; BOUGNOUX, M.E.; DROMER, F.; DUPONT, G.; PERRONE, C. An Outbreak of Acute Pulmonary

Histoplasmosis in Members of a Trekking Trip in Martinique, French West Indies. **Journal of Travel Medicine**. v.10, p.87-93, 2003.

SCHMIDT, S.; MACHADO, O.P.; GALVÃO, A.B. Microepidemia de histoplasmosse na zona rural de Brasília – DF – 1967: II – Estudos epidemiológico e parasitológico da fonte de infecção. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 8, p. 107-115, 1973.

SEGEL, M.J. ; ROZENMAN,J. ; LINDSLEY,M.D.; LACHISH, T. ; BERKMAN, N.; NEUBERGER, A. ; SCHWARTZ,E. Histoplasmosis in Israeli Travelers. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.92, n.6, p.1168-1172, 2015.

SESSEGOLO, G.C; SILVA DA ROCHA, L.F.; de LIMA, F.F Conhecendo Cavernas. Região Metropolitana de Curitiba. 1. Ed. Curitiba: GEEP Açungui, 2006.

SESSEGOLO, G.C.; THEULEN, V.; MARTINHAGO, A.. A evolução do turismo e da conservação nos Parques Naturais Municipais das Grutas de Botuverá/SC e da Gruta do Bacaetava/PR. In: RASTEIRO, M.A.; SALLUN FILHO, W. (orgs.) CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPELEOLOGIA, 33, 2015. Eldorado. Anais Campinas: SBE, p.681-686, 2015.

SEVERO, C.B.; GAZZONI, A.F.; SEVERO, L.C. Capítulo 3 - Criptococose pulmonar. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v.35, p.1136-1144, 2009.

SEVERO, L.C.; OLIVEIRA, F.M.O.; IRION, K. PORTO, N.S.; LONDERO, A.T. Histoplasmosis in Rio Grande do Sul, Brazil: a 21-year experience. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.43 , p.183-187, 2001.

SKILLMAN, D.; DAVIS, B.; HARRIS, J.R. NETT, R.J. Histoplasmosis in a State Where It Is Not Known to Be Endemic — Montana, 2012–2013. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. v.62, p.834-837, 2013.

SOLIMAN, R.; EBEID, M.; ESSA, M.; ABD EL-HAMID, M.; KHAMIS, Y., SAID, A.H. Ocular histoplasmosis due to *Histoplasma farciminosum* in Egyptian donkeys. **Mycoses**. v.34, p.261-266, 1991.

SOOD, N.; GUGNANI, H.C.; BATRA, R. ; RAMESH, V. ; PADHYE, A.A. Mucocutaneous nasal histoplasmosis in an immunocompetent young adult. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**. v.73, p.182-184, 2007.

TAYLOR, M.L.; CHÁVEZ-TAPIA, R.; VARGAS-YAÑES, G.; RODRÍGUEZ,ARELLANES, G.R. PEÑA-SANDOVAL, C.; TORIELLO, A.; PÉREZ, A.; REYES-MONTES, M.R. Environmental conditions favoring bat infection with *Histoplasma capsulatum* in Mexican shelters. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.61, p. 914–919, 1999.

TAYLOR, E.L.S.; STOIANOFF, M.A.R.; FERREIRA, R.L. Mycological study for a management plan of a neotropical show cave (Brazil). **International Journal of Speleology**. v.42, p.267-277, 2013.

TEWARI, R.P.; VON BEHREN, L.A. Immune Responses in Histoplasmosis, a prototype of Respiratory Mycoses. **Indian Journal of Chest Diseases Allied Sciences**. v.42, p.265-269, 2000.

THAPA, S.; JHA, S.C.; TROTTER, A.B. Persistent fever and skin lesions due to histoplasmosis in a boy from rural Nepal. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.94, p. 249-250, 2016.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE C.L. Microbiologia. 10. ed. São Paulo: Artmed, 2012.

UNIS G.; ROESCH, E.W.; SEVERO, L.C. Histoplasmoze pulmonar aguda no Rio Grande do Sul. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v. 31, p.52-59, 2005.

VALLABHANENI, S.; MODY, R.K.; WALKER, T.; CHILLER, T. The Global Burden of Fungal Diseases. **Infectious Diseases Clinics of North America**. v.30 , p.1-11, 2016.

VICENTINI-MOREIRA, A.P. KOHARA, V.S. PASSOS, A.N.; FELICIANO, R.S.; BARRETO, L.C. FREITAS, R.S. SANTOS, M.A.V. GARCIA, M.C.A. Microepidemia de histoplasmoze no município de Arapeí, São Paulo. **Bepa**. v.5, p.8-11, 2008.

VICENTINI, A.P. PASSOS, A.N.; SILVA, D.F. BARRETO, L.C. ASSIS, C.Z. FREITAS, R.S. Histoplasmoze: um risco ocupacional entre pesquisadores que realizam trabalho de campo? **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 71, p.747-52, 2012.

ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M. MORAIS E SILVA TAVARES, P.; MUNIZ, M.M. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains in Brazil. **Immunology & Medical Microbiology**. v. 45, p.443-449,2005.

ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; WANKE, B. Distribution of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* soil sources in Rio da Prata – Rio de Janeiro (RJ). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.29, p.243-250, 1987.

ZEIDBERG, L. D.; AJELLO, L.; DILLON, A.; RUNYON, L. C. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil. **American Journal of Public Health**. v. 42: p. 930-935, 1952.

WHEAT,L.J.; AZAR,M.M.; BAHR,N.C.; SPEC,A.; RELICH,R.F.; HAGE,C. Histoplasmosis. **Infectious Diseases Clinical of North America**. v.30, p.207-227, 2016.

WHEAT L.J.; KAUFFMAN, .C.A. Histoplasmosis. **Infectious Disease Clinics of North America**. v.17, n.1, p. 1-19, 2003.

WOODS, J.P. Knocking on the right door and making a comfortable home: *Histoplasma capsulatum* intracellular pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**. v.6, p.327–331, 2003.