

VARIABILIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS BRASILEIROS DE *Histoplasma capsulatum*

GENETIC VARIABILITY OF BRAZILIAN ISOLATES OF *Histoplasma capsulatum*

GERLAN DA ROCHA SANTOS¹, ISNARA COELHO DE RESENDE DIAS², CLÁUDIO ANGELO VENTURA³, FERNANDA MACHADO FONSECA^{4*}

1. Biomédico. Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Reis Velloso, Parnaíba, Piauí; 2. Biomédica. Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Reis Velloso, Parnaíba, Piauí; 3. Docente do Departamento de Biomedicina, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Reis Velloso, Parnaíba, Piauí; 4. Docente do Departamento de Biomedicina, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Reis Velloso, Parnaíba, Piauí.

* Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Reis Velloso - Avenida São Sebastião 2819, Reis Velloso, Parnaíba, Piauí, Brasil. CEP: 64204-035. fmachadofonseca@gmail.com; fonsecadm@ufpi.edu.br

Recebido em 24/07/2016. Aceito para publicação em 16/10/2016

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi analisar a diversidade genética de isolados de *H. capsulatum* no Brasil. Foram selecionadas amostras sequenciadas de *H. capsulatum* para os genes *arf* (Fator de ribosilação ADP) e *ole* (*delta-9 fatty acid desaturase*), provenientes de diversos estados do país. Os dados foram obtidos no Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI - *National Center for Biotechnology Information*). Foram incluídas 79 amostras de *H. capsulatum* sendo que destas, 45 (57%) eram sequências do gene *arf* e 34 (43%) eram sequências do gene *ole*. Dentre as 45 amostras do gene *arf*, 29 (64,4%) eram de origem clínica, 12 (26,7%) de origem ambiental e quatro (8,9%) de origem veterinária. As 34 (100%) amostras do gene *ole* eram de origem clínica. A análise do gene *arf* demonstrou que similaridade das amostras variou de 61 a 99%. Entretanto, observamos uma similaridade menor (44%) entre quatro amostras provenientes do Rio de Janeiro. De acordo com a análise filogenética, as sequências parciais do gene *ole* demonstraram elevados níveis similaridade, variando de 62 a 99%. Os isolados de *H. capsulatum* demonstraram grande semelhança entre si quando analisamos o gene *ole* assim como o gene *arf*, independente da região geográfica do país.

PALAVRAS-CHAVE: *Histoplasma*; Fator 1 de Ribosilação do ADP, variação genética.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the genetic diversity of *H. capsulatum* samples sequenced to *arf* (ribosylation factor ADP) and *ole* (*delta-9 fatty acid desaturase*) gene from different regions of Brazil. The data about *arf* and *ole* sequences were obtained after reviewing the National Center for Biotechnology Information (NCBI) for further phylogenetic analysis. A total of 79 *H. capsulatum* samples were included and of these, 45 (57%) were sequences of the *arf* gene and 34 (43%) were sequences of the *ole* gene. Among the 45 samples of the *arf* gene, 29 (64.4%) were clinical origin, 12 (26.7%) were environmental origin and four (8.9%) were veterinary origin. All the 34 (100%) *ole* gene samples were from clinical samples. The analysis of *arf* gene showed similarity of 61 to 99%. However,

a lower similarity (44%) was detected among four samples from Rio de Janeiro. According to the phylogenetic analysis of the *ole* gene, was observed a higher (62% to 99) similarity among the samples. The samples of *H. capsulatum* are similar when analyzed the *ole* gene as well as the *arf* gene, regardless of the geographic region of the country.

KEYWORDS: *Histoplasma*; ADP-Ribosylation Factor 1, genetic variation.

1. INTRODUÇÃO

Histoplasma capsulatum é um fungo saprófita encontrado em locais contaminados com excretas de aves e morcegos como cavernas, galinheiros, ocos de árvores, minas, parques públicos, edificações antigas e forros de casas^{1,2}. No Brasil, foi isolado pela primeira vez em 1939 a partir do cultivo de fragmentos obtidos por biópsia de uma lesão de um indivíduo com cromoblastomycose, entretanto, foi a partir das décadas de 80 e 90 que a histoplasmose passou a ser observada em pessoas portadoras da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Estudos demonstraram que 95% dos pacientes portadores do vírus HIV e com histoplasmose apresentavam a forma disseminada desta doença³.

A histoplasmose é adquirida através da inalação de microconídios encontrados em solo contaminado com o fungo. O surgimento da infecção assintomática ou sintomática é diretamente dependente da competência imunológica do hospedeiro, da virulência da cepa infectante e/ou da carga parasitária adquirida, sendo, o início da infecção resultante de uma complexa relação entre o fungo e seu hospedeiro⁴.

A infecção por *H. capsulatum* é cosmopolita com ampla distribuição geográfica. Há predomínio no Centro-Oeste e Sudeste dos Estados Unidos, regiões endêmicas da América do Norte. Possui elevada prevalência no Equador, Uruguai, Paraguai, Brasil, Venezuela e Argentina na América Latina. Têm sido relatados casos

Sul (MS), Pernambuco (PE), Goiás (GO) e São Paulo (SP) e somente um (2,2%) era proveniente do estado do Ceará (CE). Já as amostras do gene *ole* 16 (47%) eram provenientes do estado do RJ, cinco (14,7%) eram provenientes do RS, quatro (11,7%) eram provenientes do ES, dois (5,8%) eram provenientes de MS, PE, GO e SP e um (3%) era proveniente do estado do CE.

Quando analisamos o gene *arf*, observamos que as amostras são parecidas, com similaridade que variou de 61 a 99%. Entretanto, observamos uma similaridade menor (44%) entre quatro amostras do RJ. As amostras dos estados brasileiros avaliados (RS, RJ, PE, CE, GO, MS, ES, SP) se agruparam em um mesmo clado e demonstraram 55% de similaridade entre si, com exceção de algumas amostras do RJ e uma amostra do MS que se agruparam em clados diferentes (Figura 1). De acordo com a análise filogenética das sequências parciais do gene *ole*, foi observado um elevado nível de semelhança entre as amostras, com similaridade variando de 62 a 99%, com exceção de quatro amostras do RJ que demonstraram similaridade de 6% apenas (Figura 2).

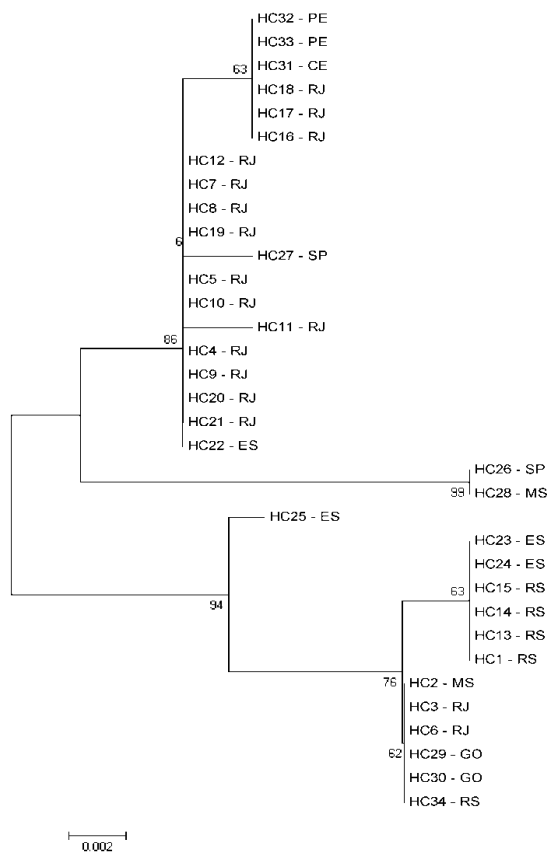


Figura 2. Análise filogenética dos isolados de *H. capsulatum* construída pelo software MEGA 5.0 pelo método *Neighbour Joining* para o gene *ole*. A porcentagem de replicatas da árvore nas quais os clados foram agrupados no teste de *Bootstrap* (1000 replicatas) está demonstrada próximo aos braços. A árvore foi desenhada para escala, com o tamanho dos braços nas mesmas unidades daquelas da distância evolucionária (calculada pelo método *Kimura 2 parâmetros*) utilizada para inferir a árvore filogenética.

4. DISCUSSÃO

A histoplasmose é uma das micoses sistêmicas de grande importância nas Américas². Na América Latina, ocorre com maior frequência na Venezuela, Equador, Brasil, Uruguai e Argentina. No Brasil, apresenta ampla distribuição em todas as regiões, com áreas endêmicas relatadas nas regiões Centro-Oeste e Sudeste^{16,17}.

Devido ao aumento da histoplasmose no mundo, diversos estudos tentam traçar o perfil epidemiológico e molecular de amostras circulantes de *H. capsulatum*, por meio de técnicas moleculares, para melhor entendimento da distribuição e patogenicidade dessa doença⁸. Em 1986, pesquisadores realizaram estudos epidemiológicos de *H. capsulatum* pelo método de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). Vinte e uma amostras do fungo de humanos e animais foram agrupadas em três classes, com base no polimorfismo de seu DNA mitocondrial (mtDNA) e DNA ribossomal (rDNA). A classe I foi constituída de um único membro formado por uma cepa de *H. capsulatum* da América do Norte, tendo sido isolada da vagina de uma paciente com uma apresentação clínica incomum. A maioria dos isolados pertenceu à classe II. Esse grupo incluiu amostras norte-americanas e amostras africanas, sendo 14 amostras de *H. capsulatum* var. *capsulatum* e dois pertencentes à variedade *H. capsulatum* var. *duboisii*. A classe III, por sua vez, foi composta de quatro amostras de *H. capsulatum* isoladas da América Central e América do Sul¹⁸.

Spitzer *et al.* (1989)¹⁹ ampliaram os estudos de tipagem de amostras de *H. capsulatum* através de RFLP de seus mtDNA e rDNA, agrupando os isolados clínicos e de solo em quatro classes. As classes I e III correspondem à classificação de Vicent e colaboradores (1986), enquanto que os isolados de solo, procedentes de sete sítios geográficos diferentes nos EUA, mostraram perfis indistinguíveis da maioria de *H. capsulatum* provenientes de pacientes e por isso foram incluídas na classe II. Somente um isolado na Flórida representa a classe IV.

Atualmente o sequenciamento tem se tornado relevante no que diz respeito à identificação de microrganismos, entretanto a sua aplicação na rotina diagnóstica ainda é limitada e distante devido ao elevado custo quando comparado com outros métodos. Os resultados do presente estudo demonstraram que as amostras de *H. capsulatum* no Brasil variam de acordo com a região, mas são parecidas entre si. Uma similaridade de 100% foi detectada entre isolados de *H. capsulatum* brasileiros e de outros países latino-americanos após a análise de sequências de um banco de dados público⁸.

H. capsulatum é constituído por genes codificantes de proteínas entre eles *arf* e *ole*. O gene *arf* participa da transdução de sinais intracelular, além de ser importante para o crescimento das hifas e participação da montagem de vesículas e do transporte destas, entre organelas. O gene *ole* está envolvido na regulação da fluidez da

membrana, expressa em resposta ao aumento da temperatura (25°C -37°C) e na alteração de fase (micélio para levedura). Esses genes contribuem para explorar a diversidade fúngica, por meio de técnicas moleculares que auxiliam no estudo da epidemiologia da infecção⁸.

No presente estudo, avaliamos a filogenia de 79 isolados geograficamente diversificados de *H. capsulatum* e as análises filogenéticas não revelaram diferenças em NJ e até mesmo demonstraram que houve agrupamento de isolados que estavam intimamente relacionadas na análise. O nível de similaridade genética entre os isolados sugere que as amostras circulantes no Brasil, em sua maioria, são semelhantes entre si. Cabe ressaltar que a migração, viagens e turismo de pacientes para outros locais geograficamente distintos, são fatores que podem explicar a diversidade genética observada em algumas amostras de ambos os genes *arf* e *ole*^{10,20}.

A utilização da análise da sequência de DNA é um método utilizado que permite avaliar a variabilidade genética de microrganismos, sendo importante uma vez que quanto maior a variabilidade, maior as chances de aparecimento de amostras resistentes aos tratamentos antimicrobianos, e ainda, fornecem informações úteis para a compreensão de disseminação do fungo e evidências para casos importados⁸.

5. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que de forma geral, as amostras brasileiras de *H. capsulatum* possuem uma similaridade genética, tanto para o gene *arf* quanto para o gene *ole*, sugerindo a presença de amostras circulantes semelhantes entre si, independente da região geográfica do país.

REFERÊNCIAS

- [01] Aidé MA. Histoplasmosis. J. Bras. Pneumol 2009 Nov;35(11):1145-1151.
- [02] Ferreira MS, Borges AS. Histoplasmosis. Rev Soc Bras Med Trop 2009 Mar-Apr; 42(2):192-198.
- [03] Zancopé-Oliveira RM, Muniz MM, Wanke B. Histoplasmosis. In: Coura JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013.
- [04] Kauffman CA. Histoplasmosis. Clin Chest Med 2009 Jun; 30(2):217-225.
- [05] Rossini FT, Goulart LS. Classic histoplasmosis: Review. RBAC 2006; 38(4):275-279.
- [06] Vicentini-Moreira AP, Kohara VS, Passos AN, Feliciano RS, Barreto LC, Freitas RS, Santos MABDV, Garcia MCA. Microepidemia de histoplasmosis no município de Arapeí, São Paulo Histoplasmosis microepidemics in the city of Arapeí, São Paulo. Bepa 2008 Out; 5(58):8-11.
- [07] Guimarães AJ, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Diagnosis of histoplasmosis. Braz J Microbiol 2006 Jan; 37(1):1-13.
- [08] Munõz C, Gómez BL, Tobón A, Arango K, Restrepo A, Correa MM, Muskus C, Cano LE, González A. Validation and clinical application of a molecular method for identification of *Histoplasma capsulatum* in human specimens in Colombia, South America. Clin Vaccine Immunol 2010 Jan; 17(1):62-67.
- [09] Zancopé-Oliveira RM, Morais E Silva Tavares P, Muniz MM. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains in Brazil. FEMS. Immunol. Med. Microbiol 2005 Sep; 45(3):443-449.
- [10] Muniz MM, Morais E Silva Tavares P, Meyer W, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Comparison of different DNA-Based methods for molecular typing of *Histoplasma capsulatum*. Appl and Envir Microbiol 2010 Jul; 76(13):4438-4447.
- [11] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 1994 Nov; 22(22):4673-4680.
- [12] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 2011 Out; 28(10):2731-2739.
- [13] Saitou N, Nei M. The Neighbor-Joining Method-a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 1987 Jul; 4(4):406-425.
- [14] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol 1980 Dec; 16(2):111-120.
- [15] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 1985 Jul; 39(4):783-791.
- [16] Leimann BC, Pizzini CV, Muniz MM, Albuquerque PC, Monteiro PC, Reis RS, Almeida-Paes R, Lazera MS, Wanke B, Pérez MA, Zancopé-Oliveira RM. Histoplasmosis in a Brazilian center: clinical forms and laboratory tests. Rev Iberoam Micol 2005 Sep; 22(3):141-146.
- [17] Oliveira FM, Unis G, Severo LC. Microepidemia de histoplasmosis em Blumenau, Santa Catarina. J Bras Pneumol 2006 July/Aug; 32(4):375-378.
- [18] Vincent RD, Goewert R, Goldman WE, Kobayashi GS, Lambowitz AM, Medoff G. Classification of *Histoplasma capsulatum* isolates by restriction fragment polymorphisms. J Bacteriol 1986 Mar; 165(3):813-818.
- [19] Spitzer ED, Lasker BA, Travis SJ, Kobayashi GS, Medoff G. Use of mitochondrial and ribosomal DNA polymorphisms to classify clinical and soil isolates of *Histoplasma capsulatum*. Infect Immun 1989 May; 57(5):1409-1412.
- [20] Norman FF, Martín-Dávila P, Fortún J, Dronza F, Quereda C, Sánchez-Sousa A, López-Vélez R. Imported histoplasmosis: two distinct profiles in travelers and immigrants. J Travel Med 2009 Jul-Aug; 16(4):258-262.