

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Veterinária**  
**Programa de Pós-Graduação em Veterinária**



Tese

**Investigação sorológica e molecular da presença de *Paracoccidioides* spp. em  
três mesorregiões do Rio Grande do Sul**

**Josiara Furtado Mendes Redü**

Pelotas, 2018

**Josiara Furtado Mendes Redü**

**Investigação sorológica e molecular da presença de *Paracoccidioides* spp. em três mesorregiões do Rio Grande do Sul**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Meireles

Co-orientadora: Profa. Dra. Melissa Orzechowski Xavier

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

R312i Redü, Josiara Furtado Mendes

Investigação sorológica e molecular da presença de Paracoccidioides spp. em três mesorregiões do Rio Grande do Sul / Josiara Furtado Mendes Redü ; Mário Carlos Araújo Meireles, orientador ; Melissa Orzechowski Xavier, coorientadora. — Pelotas, 2018.

95 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Paracoccidioidomicose. 2. Nested-PCR. 3. ELISA. 4. Solo. 5. Bioma Pampa. I. Meireles, Mário Carlos Araújo, orient. II. Xavier, Melissa Orzechowski, coorient. III. Título.

CDD : 636.089

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Josiara Furtado Mendes Redü

Investigação sorológica e molecular da presença de *Paracoccidioides* spp. em três mesorregiões do Rio Grande do Sul

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 20/02/2018

Banca examinadora:

Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Meireles (Orientador)  
Doutor em microbiologia e imunologia pela Universidade Federal de São Paulo

Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Neuschrack Albano  
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Isabel Brayer Pereira  
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia da Silva Nascente  
Doutora em Ciências pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## Agradecimentos

Este espaço é dedicado a todos aqueles de alguma forma foram essenciais para realização deste trabalho (tese), se precisasse definir meu doutorado em uma palavra seria gratidão, tive a felicidade de encontrar pessoas incríveis ao longo desses quatro anos, as quais não poderia deixar de agradecer, talvez não consiga citar todas, mas algumas não podem deixar de serem lembradas.

Agradeço em primeiro lugar ao meu orientador **Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Meireles** por todos aprendizados, pela oportunidade, pela confiança, pela liberdade na realização desta tese e principalmente por embarcar comigo neste projeto sendo incansável para que adquiríssemos todos os recursos necessários para sua realização, mesmo sem nenhuma garantia que fossemos ter bons resultados no final.

A minha co-orientadora **Prof. Dr<sup>a</sup> Melissa Orzechowski Xavier**, pela amizade, pela confiança, por todo aprendizado, por abraçar esse trabalho comigo mesmo eu sendo de outra universidade. Se obtivemos excelentes resultados neste trabalho foi devido ao seu empenho e dedicação, pois uma vez que eu deixasse passar algum detalhe, ela como sempre esteve inteiramente por dentro do projeto, me mostrou o caminho que fez chegar até aqui. Poucos acadêmicos tem a sorte que eu tive com meus orientadores, sempre atentos e dispostos. E como já falei pessoalmente espero que ela nunca perca essa empolgação com o trabalho dos seus orientados, pois é ela que tem nos levado aos excelentes resultados que o Grupo de Micologia FURG tem adquirido. Aliás eu ainda tento entender como ela consegue estar por dentro dos projetos de todos os orientados, com tantos detalhes e linhas diferentes, mesmo após o nascimento dos seus dois filhos, fato que não fez sua dedicação por nós diminuir em nenhum momento. Um dia espero poder ser assim com meus orientados.

A toda equipe do **MicVet** por todos os anos que pude dividir com vocês e não foram poucos, entre idas e vindas faço parte deste lab. desde 2008. Nesses quase 10 anos pude encontrar muitas pessoas diferentes, que certamente acrescentaram muito para o meu crescimento, foi onde aprendi de fato Micologia, essa parte em especial

dedico a **Isabel, Antonella e Rosema** e também a **Patty (Nascente)** que apesar de eu ter conhecido já em outro lab. foi fundamental nesse começo. Talvez não lembre de todos mas certamente sou grata a cada um. Agradeço pelas rodas de chimarrão, pelo conhecimento trocado, pelos congressos, pelas reuniões, pelos churrascos, pelas festinhas do lab., pelas conversas. Agradeço a todos os estagiários que passaram pelo lab. em todos esses anos. A todas colegas de pós-graduação **Stefanie, Luiza, Anna Luísa, Márcia**. Gostaria de agradecer em especial as colegas de pós do MicVet que se tornaram amigas e com quem além das pesquisas, eu pude dividir (e ainda divido) tantos momentos fora do lab., **Ângela, Ana Paula, Otávia e Alessandra**.

Ao grupo do Laboratório de Micologia da FURG, que me fez sentir em casa durante esses anos, embarcando comigo nesse projeto e me auxiliando em tudo que fosse necessário. Lá mais do que colegas de trabalho, eu fiz amigos, mostrando que ao contrário do que muitos pensam, o ambiente de trabalho pode ser leve e de cooperação entre os membros, e posso dizer que assim, os resultados são muito melhores. Não posso deixar de citar nosso querido **Gabriel Baracy Klafke** pela dedicação incansável em todos os momentos. A minha amiga **Tchana Martinez Brandolt**, pela amizade, pelos almoços, pelas horas de laboratório divididas, pelas indiadas, por todos os momentos que podemos dividir. A minha também queridíssima amiga **Vanice Rodrigues Poester**, que foi um feliz encontro desse doutorado, obrigada por toda ajuda com minha pesquisa, seria impossível enumerar quantas vezes que dividi a bancada com ela, pela amizade, pelos encontros fora do lab., enfim por ser essa pessoa tão especial. Agradeço todo grupo por todos os momentos divididos no laboratório, congressos, reuniões, enfim, o meu muito obrigado também a **Lurdeti, Karine, Aryse, Ângela, Antonella, Jéssica, Livia** e a todos estagiários que passaram pelo lab. nesses quatro anos.

A todos os professores que de alguma forma me auxiliaram na realização deste trabalho, se não fosse por sua experiência e contribuição, certamente essa pesquisa teria um desfecho diferente. Aos professores **Dr. Zoilo Pires de Camargo** e **Dr. Anderson Messias Rodrigues** da UNIFESP por sempre estarem dispostos a conversar comigo e sanar minhas dúvidas, pelas dicas que recebi sempre que nos encontramos, elas foram essenciais, pela parceria na pesquisa, pelo material cedido para a realização da mesma. A **Profª Drª Andrea Von Grol**, por me apresentar o mundo da biologia molecular, pela dedicação, pelos ensinamentos, por ter a paciência

de ainda hoje sentar a bancada do laboratório para ensinar um aluno, pela parceria estabelecida, por estar sempre disposta se reunir comigo para responder a todas as minhas dúvidas, que não foram poucas. Ao **Prof. Dr. Carlos Eduardo Wayne Nogueira** por todo auxílio com a parte que envolveu os equinos neste trabalho, pela disponibilidade de ir até a cidade de Bagé “abrir” as portas dos locais onde realizamos nossas coletas. Aproveito espaço para agradecer também a **Carolina L. Brasil**, por encarar as coletas de solo conosco, sua disponibilidade, ajuda e bom humor foram essenciais nessa parte do trabalho. Ao **Prof. Dr. Ronei Mamoni** da UNICAMP por gentilmente ceder um isolado da cepa PB 18, e a minha querida **Lívia de Castro**, que pude encontrar graças a linha de pesquisa em comum, pelas mensagens trocadas, por me enviar o isolado, pelos congressos, pelas dicas na pesquisa, pelos ensinamentos, pela amizade. A todos os outros professores não citados aqui, mas que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento acadêmico e pessoal, eu me considero uma pessoa de sorte por ter encontrado todos vocês.

A todos os meus amigos com quem divido a vida fora do lab. pelas angustias e alegrias compartilhadas, com vocês as pausas entre um parágrafo e outro de produção melhora tudo o que tenho produzido na vida, não vou citar nomes pra não ser injusta e esquecer de alguém, mas vocês sabem quem são, os “divertidos”, as “entocadas”, as “das antigas”, as “de cem anos” e tantos outros que não fazem parte destes grupos.

A Universidade Federal de Pelotas e a Universidade Federal de Rio Grande pela oportunidade de fazer uma pós-graduação e desenvolver minha pesquisa. A CAPES pela concessão da bolsa.

Aos componentes da banca que atenderam o convite, pela atenção, **Profª Drª Daniela Isabel Brayer Pereira, Profª Drª Patrícia da Silva Nascente, Drª Ana Paula Neuschrank Albano e Profª Drª Renata Osório de Faria.**

A minha família, **mãe, pai e Leo** pelo apoio e bons exemplos, recebidos desde a infância. Por sua capacidade de acreditar e investir em mim, pelo orgulho que vocês pelo que eu faço mesmo sem entender muito bem do que trata, fazem questão de explicar a outras pessoas. Meus cachorros Fiona e Thor por todo seu companheirismo, carinho e amor incondicional em todos os momentos. Ao meu amado marido **Luiz Fernando Redü**, pessoa com quem amo partilhar a vida. Obrigada pelo carinho, paciência, por sua capacidade de me trazer paz na correria de cada dia. Por ter compreendido todos os momentos em que estive ausente e por todo

auxílio nessa reta final que se tornou um pouco “difícil”, por toda a dedicação que tens com o nosso relacionamento, acredito que seja um privilégio de poucos. E por fim ao meu já tão amado filho **Theo**, o qual ainda carrego em meu ventre, mas que já me ensinou, nessa reta final do doutorado, que paciência é uma virtude dos fortes, e que nós não precisamos estar no controle todos os momentos para que as coisas possam dar certo, que podemos entregar nossas tarefas diárias, sejam elas quais forem aos amigos e que elas estarão em boas mãos.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos a mim, fazendo esta vida valer cada vez mais a pena.

**Muito Obrigada!**



***“A persistência é o caminho do êxito.”  
(Charles Chaplin)***

## Resumo

MENDES, Josiara Furtado. **Investigação sorológica e molecular da presença de *Paracoccidioides* spp. em três mesorregiões do Rio Grande do Sul.** 2018. 87f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

A paracoccidioidomicose (PCM) vem sendo descrita em humanos no Rio Grande do Sul (RS) desde a década de 40, no entanto, os aspectos ecológicos que envolvem os seus agentes etiológicos ainda não foram totalmente esclarecidos. O solo é descrito como o habitat do *Paracoccidioides* spp., no entanto, devido à dificuldade de isolar o agente do ambiente, dados específicos sobre seu nicho ecológico são ainda pouco conhecidos. Isto, associado ao grande período de latência que a doença pode apresentar, dificulta a determinação da fonte de infecção dos indivíduos pelo patógeno. Contudo, técnicas sorológicas e moleculares vem sendo empregadas para melhor compreensão da ecoepidemiologia do *Paracoccidioides* spp. demonstrando que está ocorrendo uma expansão geográfica de suas áreas endêmicas. Sendo assim, este estudo teve por objetivo pesquisar a presença de *Paracoccidioides* spp. em três mesorregiões do RS. Para tanto foram realizados estudos utilizando animais como sentinelas da presença do fungo, a partir da busca de anticorpos por sorologia, e utilizando a biologia molecular para detecção do DNA fúngico de amostras de solo. Para sorologia foram incluídas amostras de 481 animais domésticos e silvestres as quais foram submetidas ao teste de ELISA indireto buscando anticorpos anti-*P. lutzii*. Para o estudo molecular, amostras de solo das cidades de Bagé (n=30) e Rio Grande (n=16) foram devidamente coletadas e submetidas a protocolo de extração de DNA por kit comercial (Norgen Biotek Corp®) e técnicas de PCR e *Nested-PCR* com *primers* específicos para o gênero. Dos 481 animais estudados, 51 (10,6%) foram soropositivos para IgG anti-*P. lutzii*. Das 46 amostras de solo estudadas, o DNA de *Paracoccidioides* spp. foi encontrado em 19 (41,3%), sendo dez em Bagé (52,6%) e nove no solo de Rio Grande (47,4%). Este estudo trouxe dados importantes sobre o habitat dos agentes da PCM no RS, demonstrando pela primeira vez a presença de *P. lutzii* no estado e uma alta taxa de detecção de DNA de *Paracoccidioides* spp. em solos do Bioma Pampa, o que ainda não havia sido descrito na literatura. Esses dados ajudam a compreender a ecologia dos agentes da PCM como um todo, fazendo com que essa doença ainda hoje negligenciada ganhe uma maior visibilidade na região e indiretamente no país.

**Palavras-chave:** paracoccidioidomicose; *Nested-PCR*; ELISA; solo; *Paracoccidioides lutzii*; ecoepidemiologia; bioma Pampa

## Abstract

MENDES, Josiara Furtado. **Serological and molecular investigation of the presence of *Paracoccidioides* spp. in three mesoregions of Rio Grande do Sul. 2018.** 87f. Thesis (Doctor in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Paracoccidioidomycosis (PCM) has been described in humans in Rio Grande do Sul (RS) since the 40s, however, the ecological aspects that involve its etiological agents have not yet been fully clarified. Soil is described as the habitat of *Paracoccidioides* spp., however, due to the difficulty of isolating the agent from the environment, specific data about its ecological niche are still little known. This, together with the long latency that the disease can present, makes it difficult to determine the source of infection of the individuals by the pathogen. Serological and molecular techniques have been used to better understand the ecoepidemiology of *Paracoccidioides* spp. demonstrating that there is a geographical expansion of their endemic areas. Therefore, this study aimed to investigate the presence of *Paracoccidioides* spp. in three mesoregions of RS. For this purpose, animal studies were conducted as sentinels of the presence of the fungus, from the search for antibodies by serology, and using molecular biology to detect the fungal DNA of soil samples. For serology, samples from 481 domestic and wild animals were included, which were submitted to the indirect ELISA test for antibodies anti-*P.lutzii*. For the molecular study, soil samples from the cities of Bagé (n = 30) and Rio Grande (n = 16) were duly collected and submitted to DNA extraction protocol by commercial kit (Norgen Biotek Corp.) and PCR and Nested-PCR with primers specific for the genus. Of the 481 animals studied, 51 (10.6%) were seropositive for IgG anti-*P.lutzii*. Of the 46 soil samples studied, the DNA of *Paracoccidioides* spp. was found in 19 (41.3%), ten in Bagé (52.6%) and nine in Rio Grande (47.4%). This study provided important data on the habitat of PCM agents in RS, demonstrating for the first time the presence of *P. lutzii* in RS and a high DNA detection rate of *Paracoccidioides* spp. in soils of the Pampa Biome, which had not yet been described in the literature. These data help to understand the ecology of PCM agents as a whole, making this neglected disease even more visible in the region and indirectly in the country.

**Keywords:** paracoccidioidomycosis; serology; Nested-PCR; ELISA; soil; *P. lutzii*; ecoepidemiology; Pampa biome

## Lista de Figuras

Figura 1	Artigo 1: Figure 1: Seropositivity in the ELISA test for IgG anti <i>Paracoccidioides lutzii</i> in animals from RS, Brazil, according to their origin.....	53
Figura 2	Artigo 2: Figure 1: Distribution of Biomes in Brazil, with emphasis on the Pampa Biome, restricted to the southern region of RS; and geographic location of the collection site (city of Bagé, South Rio Grande do Sul, Brazil) at Pampa Biome.....	58
Figura 3	Artigo 2: Figure 2: Nested-PCR results of five soil samples: (1: 100bp marker; 2: white; 3: negative control; 4: positive control; 5 and 8: negative samples; 6, 7 and 9: positive samples for <i>Paracoccidioides</i> spp. with approximately 424 bp).....	61
Figura 4	Artigo 3: Figure 1: Nested-PCR products from five soil samples (1: 100bp marker; 2,3,4,5: positive samples showing a band of approximately 424bp, 6 and 7: negative samples, 8: positive control, 9: negative control; 10: white).....	75
Figura 5	Artigo 3: Figure 2: Geographic localization of positive (pink markers; n = 9) and negative samples (green markers; n = 7) for the presence of <i>Paracoccidioides</i> spp. DNA in the city of Rio Grande, southern RS, Brazil. CB= Cassino beach; AO = Atlantic Ocean; LP= Lagoa dos Patos.....	76

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Artigo 1: Table 1: Seropositivity for IgG anti- <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> and <i>P. lutzii</i> in sera from the horses, dogs and wild mammals from Rio Grande do Sul, Brazil, using ELISA.....	52
Tabela 2	Artigo 2: Table 1: Physical and chemical parameters of the negative (n = 20) and positive (n = 10) pool of soil samples in the Nested PCR technique for detection <i>Paracoccidioides</i> spp. DNA.....	62

## Lista de Abreviaturas e Siglas

AG	Antígeno
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CEEA	Comitê de Ética e Experimentação Animal
CIE	Contraímunoeletroforese
DNA	Ácido dextrorribonúcleico
DO	Densidade óptica
DP	Desvio Padrão
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
FAMED-FURG	Faculdade de Medicina – FURG
FURG	Universidade Federal de Rio Grande
FV-UFPEL	Faculdade de Veterinária da UFPEL
gp-43	Glicoproteína de 43 kDa
H+Al-	Alumínio Trocável
HAB.	Habitantes
IB	Imunoblot
ID	Imunodifusão
IDGA	Imunodifusão em duplo gel de ágar
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
nm	Nanômetro
NURFS	Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre da UFPEL
Pb	Pares de base
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBS-T	<i>Phosphate buffered saline</i> com Tween
PCM	Paracoccidiodomicose
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

RS	Rio Grande do Sul
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	São Paulo
UFPEL	Universidade Federal de Pelotas
UV	Ultravioleta
VEs	Vesículas extracelulares

## Lista de Símbolos

<	Menor
>	Maior
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou Igual
©	Copyright
®	Registrado
°C	Grau Celsius
μm	Micrometros
α	Alfa
β	Beta
%	Porcentagem
G	Gramma
μg	Micrograma
Km <sup>2</sup>	Quilometro quadrado
kDa	Quilodalton
mL	Mililitro
g/L	Gramma por litro
mM	Milimolar
μL	Microlitros



## Sumário

<b>1 Introdução</b> .....	16
<b>1.1 Objetivos</b> .....	17
<b>1.1.1 Objetivo geral</b> .....	17
<b>1.1.2 Objetivos específicos</b> .....	17
<b>2 Revisão da Literatura</b> .....	18
<b>2.1 Paracoccidioidomicose: Definição e Histórico</b> .....	18
<b>2.2 Etiologia da PCM</b> .....	19
<b>2.3 Ecologia dos agentes, habitat e nicho ecológico de <i>Paracoccidioides</i> spp.</b> .....	20
<b>2.4 Patogenia e Fatores de virulência</b> .....	22
<b>2.4.1 Fatores de virulência de <i>Paracoccidioides</i> spp. que desempenham um papel relevante na patogênese:</b> .....	23
<b>2.5 Formas Clínicas da PCM</b> .....	24
<b>2.6 Epidemiologia</b> .....	27
<b>2.6.1 PCM no Rio Grande do Sul (RS)</b> .....	28
<b>2.6.1.1 Bioma Pampa</b> .....	29
<b>2.7 PCM em animais</b> .....	30
<b>2.8 Diagnóstico e Tratamento da PCM</b> .....	36
<b>3.1 Artigo 1</b> .....	39
<b>3.2 Artigo 2</b> .....	54
<b>3.3 Artigo 3</b> .....	67
<b>4 Considerações Finais</b> .....	77
<b>Referências</b> .....	78
<b>Anexos</b> .....	94

## 1 Introdução

Considerada a segunda micose sistêmica de maior importância na América Latina, principalmente no Brasil, Venezuela e Colômbia, a Paracoccidiodomicose (PCM) acomete, sobretudo, indivíduos da população rural, e é causada por fungos termodimórficos do gênero *Paracoccidioides* (*P. lutzii*, *P. brasiliensis*, *P. venezuelensis*, *P. americana* e *P. restrepiensis*) (TEIXEIRA et al., 2014, TURISSINI et al., 2017).

Após mais de 100 anos da primeira descrição da PCM pouco se sabe sobre a ecoepidemiologia dos fungos do gênero *Paracoccidioides*, assim como, aspectos biológicos da interação patógeno/hospedeiro. *Paracoccidioides* spp. tem seu habitat (local físico e geográfico de distribuição) no solo, mas seu nicho ecológico (somatório de todas as interações do micro-organismo com os fatores bióticos e abióticos do meio) ainda não foi completamente determinado, o que impede um melhor conhecimento do local mais específico que os indivíduos são infectados pelo patógeno (BALABANOV et al., 1964; SILVA et al., 2000; TERÇARIOLI et al., 2007). Vários fatores contribuem para essa limitação, como a dificuldade do isolamento do fungo do meio ambiente e o período de latência prolongado que a doença pode apresentar (BAGAGLI et al., 2003; THEODORO et al., 2012).

A utilização de metodologias para detecção dos fungos do gênero *Paracoccidioides* no ambiente, como a biologia molecular, vem trazendo novas perspectivas na elucidação do habitat e da distribuição geográfica dos agentes da PCM (THEODORO et al., 2008; BARROZO et al., 2009; 2010). Assim como a investigação da infecção fúngica em animais vem representando uma excelente estratégia para estudos sobre a ecologia do agente (BAGLAGLI et al., 2003). Estudos utilizando animais como sentinelas, comprovaram pela primeira vez a presença de *P. brasiliensis* no Rio Grande do Sul (RS) (ALBANO et al., 2014; 2015). No entanto, dados sobre *P. lutzii* ainda são desconhecidos no estado, no qual se destaca pela diferença de Bioma em relação ao resto do país. O Bioma Pampa é restrito ao RS no Brasil, onde há escassez de estudos sobre a incidência da doença, ecologia dos agentes, como também a exposição dos indivíduos ao *Paracoccidioides* spp. Dessa forma, estudos sobre os agentes da PCM no RS tornam-se imprescindíveis para a

compreensão da sua expansão geográfica no estado, fazendo com que essa doença ainda hoje negligenciada ganhe uma maior visibilidade na região e no país.

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.1 Objetivo geral**

Pesquisar a exposição por *P. lutzii* em animais silvestres e domésticos, e a presença do DNA de *Paracoccidioides* spp. em amostras de solos, como forma de auxiliar na compreensão da ecoepidemiologia dos agentes da PCM no Rio Grande do Sul.

### **1.1.2 Objetivos específicos**

- Detectar a presença de anticorpos anti-*P. lutzii* em amostras séricas de mamíferos silvestres, equinos e caninos de três mesorregiões do RS e correlacionar a exposição do patógeno com a origem dos animais avaliados;
- Verificar a presença de DNA de *Paracoccidioides* spp. em amostras de solo de dois municípios do Bioma Pampa no RS;
- Avaliar as características dos solos avaliados do município de Bagé e sua relação com a presença do fungo.

## 2 Revisão da Literatura

### 2.1 Paracoccidioidomicose: Definição e Histórico

Micose sistêmica granulomatosa de maior importância na América Latina, a paracoccidioidomicose (PCM), causada por fungos termodimórficos do gênero *Paracoccidioides*, ocorre em vários países da América Latina, principalmente Brasil, Venezuela e Colômbia. Acomete, sobretudo, indivíduos da população rural, que vivem nas áreas endêmicas, e ao manipular o solo, geram aerossóis contendo conídios fúngicos, os quais são inalados pelo hospedeiro (FRANCO et al., 2000). Uma vez inalados, os propágulos dão origem a formas leveduriformes do fungo que constituirão sua forma parasitária nos tecidos do hospedeiro, podendo causar PCM infecção assintomática, ou PCM doença. Considerada a principal micose sistêmica do Brasil, a PCM representa um importante problema de saúde pública devido a seu alto potencial incapacitante e a quantidade de mortes prematuras que provoca (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

A PCM foi descrita pela primeira vez em 1908 por Adolf Lutz, em dois pacientes internados na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (SP) com lesões na mucosa oral, de onde Lutz efetuou o primeiro isolamento do agente em cultura, identificando-o como fungo. Ele acabou não dando nome ao micro-organismo, porém chamou de “micose pseudococcídica”, diferenciando da coccidioidomicose, descrita alguns anos antes na Argentina. Quatro anos depois, em 1912, Afonso Splendore descreveu novos casos em pacientes também da Santa Casa de SP, e estudou minuciosamente a morfologia do fungo, denominando como *Zymonema brasiliensis*. Em 1930, Floriano de Almeida instituiu a denominação *Paracoccidioides brasiliensis*, considerada a única espécie por 75 anos. O termo paracoccidioidomicose foi instituído em 1971 na reunião de micologistas das Américas em Medellín e persiste, até hoje, como nomenclatura oficial (LUTZ, 1908; SPLENDORE, 1912; ALMEIDA, 1930; VALLE e COSTA, 2001).

Em 2006, Matute e colaboradores definiram *P. brasiliensis* como um complexo de espécies através de estudos filogenéticos, caracterizando três subespécies denominadas S1, PS2 e PS3. A ocorrência desses achados ficou restrita as áreas geográficas do Brasil, Argentina, Peru Paraguai, Venezuela (S1 e PS2) e Colômbia (PS3) (MATUTE et al., 2006; CARRERO et al., 2008). A subespécie PS4 foi identificada mais tarde na Venezuela (SALGADO-SALAZAR et al., 2010; THEODORO et al., 2012). Em 2009, Teixeira e colaboradores identificaram novos isolados não pertencentes ao grupo em que se estavam as subespécies S1, PS2, PS3 e PS4, constituindo uma nova espécie, mais divergente, denominada inicialmente como Pb01-like e finalmente como *P. lutzii*.

O uso da taxonomia molecular levou a identificação de novas espécies, ficando o gênero composto por *P. lutzii* mais quatro espécies no complexo *brasiliensis*. Com base nas genealogias analisadas, foi revelada a existência de três novas espécies no gênero *Paracoccidioides*, com diferentes níveis de divergência, uma delas restrita a Colômbia, *P. restrepiensis* (PS3), *P. americana* (PS2) distribuída no continente Sul-Americano, *P. venezuelensis* (PS4) ocorrendo na Venezuela e também no Brasil, além das já conhecidas *P. brasiliensis* (S1a e S1b) e *P. lutzii* (TURISSINI et al., 2017).

## 2.2 Etiologia da PCM

O gênero *Paracoccidioides* pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Plectomycetes, Ordem Onygenales, Família Onygenaceae (fase assexuada do fungo), Gênero *Paracoccidioides*, Espécies: *P. brasiliensis*, *P. lutzii*, *P. americana*, *P. restrepiensis* e *P. venezuelensis*. Por algum tempo este foi considerado um fungo imperfeito por sua fase sexual não ter sido detectada. Contudo, nos últimos anos, com os avanços de técnicas moleculares, *P. brasiliensis* foi colocado na família Onygenaceae, no mesmo grupo de fungos como *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* e *Lacazia loboi*. Um novo clado na ordem Onygenales foi proposto como uma nova família denominada de Ajellomycetaceae (fase sexuada do fungo) que constitui um grupo monofilético incluindo os gêneros anamorfos *Blastomyces*, *Emmonsia*, *Histoplasma* e *Paracoccidioides* (UNTEREINER et al., 2004; BAGAGLI et al., 2008).

Os fungos do gênero são termodimórficos, apresentando-se a 25°C na natureza na forma filamentosa, e na fase parasitária como leveduriforme, a 37°C. A forma micelial produz propágulos infectantes que quando inalados pelos hospedeiros

susceptíveis e, em condições de temperatura entre 35 e 37°C e disponibilidade de nutrientes, se transformam em células leveduriformes, tendo como característica patognomônica a presença de multi-brotamentos periféricos da célula-mãe, formando nos tecidos dos hospedeiros estruturas similares a uma roda-de-leme (SAN-BLAS et al., 2002).

Macroscopicamente a fase leveduriforme é caracterizada por colônias cremosas e rugosas, com aspecto cerebriforme, constituídas de blastoconídios grandes medindo de 5 a 25 µm de diâmetro (CAMARGO et al., 1992; GARCIA et al., 1993). Quanto a morfologia em temperatura ambiente este fungo macroscopicamente apresenta colônias brancas, pequenas e irregulares, formada por hifas septadas e finas, que dão origem ao curto micélio aéreo o qual forma estruturas conidiogênicas originando os microconídios, propágulos fúngicos infectantes; artroconídios ou clamidoconídios intercalares podem também ser visualizados (CAMARGO et al., 1992; GARCIA et al., 1993).

### **2.3 Ecologia dos agentes, habitat e nicho ecológico de *Paracoccidioides* spp.**

Apesar de ser descrito que fungos do gênero *Paracoccidioides* tem seu habitat localizado no solo, seus nichos ecológicos ainda não foram completamente elucidados (BALABANOV et al., 1964; ARANTES et al., 2013; 2016). Estudos sobre a ecologia do gênero ganharam novas perspectivas nos últimos anos, pela utilização de técnicas sorológicas, biologia molecular e também pela aplicação de métodos de geoprocessamento (THEODORO et al., 2008; BARROZO et al., 2009; 2010).

De fato, a investigação da infecção fúngica em animais vem representando uma excelente estratégia possibilitando determinar a ocorrência do micro-organismo em diferentes regiões, como o Rio Grande do Sul, São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Pará e outros estados da região Norte do país (SILVA-VERGARA et al., 2000; BAGAGLI et al., 2003; CORREDOR et al., 2005; ALBANO et al., 2014; 2015; TELES et al., 2016). Da mesma forma, utilizando a biologia molecular, ARANTES et al. (2013) comprovaram a presença de *P. lutzii* em aerossóis da região Sudeste do Brasil, sugerindo que esta espécie não é exclusiva da Região Centro-Oeste do país como proposto anteriormente (TEIXEIRA et al., 2009).

Com o uso de técnicas moleculares, estudos para o mapeamento ambiental e distribuição geográfica dos agentes da PCM em áreas endêmicas e não endêmicas tem sido realizado nas regiões Sudeste, Centro-oeste e Norte do Brasil, revelando a

presença de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* em todas as regiões estudadas; o que comprova a expansão das áreas de distribuição das espécies do gênero *Paracoccidioides*, além das regiões anteriormente cogitadas (ARANTES et al., 2016).

Por outro lado, poucos estudos descrevem as características físicas e químicas do solo ideais para o desenvolvimento e reprodução de *Paracoccidioides* spp. Concentração de matéria orgânica, pH, macronutrientes, micronutrientes, quantidade de água, presença de alumínio trocável e percentagem de saturação de base podem influenciar no crescimento do fungo. Solos com textura arenosa e argilosa parecem ser propícios para o desenvolvimento do agente, sendo seu crescimento mais abundante em solos saturados com água, com baixos níveis de alumínio trocável (H+Al-), e em locais com temperaturas amenas (17° a 27° em média). Clima úmido (acima de 70%), altitudes médias e vegetação abundante também parecem favorecer seu crescimento, e por outro lado, o uso de pesticidas nas lavouras pode inibi-lo. Altos níveis de umidade no solo favorecem o crescimento do fungo e um breve período de seca após um intenso período de tempo úmido, facilita a dispersão dos agentes da PCM, o que pode explicar a “Teoria do Sopro”, na qual o número de casos de PCM em regiões endêmicas aumenta consideravelmente após estações chuvosas (MATUTE et al., 2006; TERÇARIOLI et al., 2007; BARROZO et al., 2009; 2010; ARANTES et al., 2013).

Essas variações decorrem de diversos fatores, e de uma forma ampla, dependem e estão associadas ao tipo de bioma. O Brasil é um país com dimensões continentais, e nele existem seis biomas cada um com características muito particulares de acordo com a região do país: Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Pantanal e Pampa. Essas características variam desde zonas áridas a úmidas, regiões com vegetação abundante ou escassa, ambientes quentes e úmidos a frios e secos, entre outros (IBGE, 2017). Considerando que a ocorrência de *Paracoccidioides* spp. é descrita em vários estados brasileiros, estas características podem ser determinantes e extrapoladas, assim, ambientes semelhantes geograficamente podem apresentar as mesmas condições para o desenvolvimento das espécies do Complexo *P. brasiliensis* e *P. lutzii* (BAGAGLI et al., 2003; 2008; TEIXEIRA et al., 2009; CORTE et al., 2012; ARANTES et al., 2013; SOUZA et al., 2014; ALBANO et al.; 2014; 2015; TELES et al., 2016; ROBERTO et al., 2016).

Estudos moleculares afim de determinar a ecologia de *Paracoccidioides* spp. através de amostras de solo ou amostras de aerossóis, já foram realizados em várias regiões do Brasil, estando os agentes da PCM distribuídos por vários Biomas. No Bioma Mata Atlântida a ocorrência de *P. brasiliensis* em amostras de solo e de *P. lutzii* em amostras de aerossóis vem sendo descrita especialmente pelo estado de São Paulo (THEODORO et al., 2005; TERÇARIOLI et al., 2007; ARANTES et al., 2013; 2016). No Bioma Cerrado, *P. brasiliensis* e *P. lutzii* foram detectados nos estados de Goiás e Minas Gerais. Os estados de Roraima e Pará, localizados no Bioma Amazônia também foram estudados em relação a ocorrência ambiental de *Paracoccidioides* spp. (ARANTES et al., 2016). No Bioma Pampa os estudos são escassos, tendo sido sugerida, há menos de uma década, a presença de *Paracoccidioides brasiliensis* no sul do RS, por detecção de animais soropositivos (ALBANO et al., 2014; 2015; TELES et al., 2016).

#### **2.4 Patogenia e Fatores de virulência**

Os patógenos apresentam estratégias para sobreviver e se replicar dentro das células hospedeiras. A virulência é o resultado da interação entre um hospedeiro e um micro-organismo, enquanto o hospedeiro visa controlar efetivamente o patógeno causando danos ou não. No contexto da "estrutura de danos-resposta", um fator de virulência é um componente microbiano que pode prejudicar um hospedeiro susceptível (CASADEVALL et al., 2009). A interação de *Paracoccidioides* spp. com o ambiente extracelular, seja quando o fungo encontra-se em vida livre, no ambiente ou nos estágios de parasitismo, pode ter estimulado a evolução molecular dos fungos do gênero, especialmente no contexto virulência (MATUTE et al., 2008). A estratégia microbiana que confere a *Paracoccidioides* spp. o potencial de tornar-se patógeno está relacionada ao escape dos mecanismos de defesa do hospedeiro (THIND et al., 2015; CAMACHO et al., 2017).

Uma vez que os conídios ou fragmentos de hifas são inalados, nos alvéolos pulmonares do hospedeiro ocorre a mudança morfológica para as células leveduriformes, este é um dos requisitos para que a doença seja estabelecida. Assim, processos metabólicos relacionados a mudança dimórfica dos fungos do gênero *Paracoccidioides* são mecanismos de adaptação para possibilitar sua sobrevivência (SORAIS et al., 2003; CAMACHO et al., 2017).



*Paracoccidioides* spp. invade inicialmente células hospedeiras não fagocíticas, como células epiteliais e células endoteliais, induzindo sua própria absorção e causando a apoptose das células hospedeiras. A adesão e a sobrevivência no interior do hospedeiro são extremamente importantes para o estabelecimento da patogênese. Alguns genes como o DRK- 1 (gene da histidina quinase) e Duf (gene da hemolisina) de *Paracoccidioides* spp. se apresentam diferencialmente expressos durante a transição dimórfica do fungo, apresentando baixos níveis de expressão na forma micelial quando comparadas com a forma leveduriforme, sugerindo que estes possivelmente façam parte de estratégias moleculares do *Paracoccidioides* spp. para adaptação morfológica e sobrevivência no hospedeiro. A fase de adesão está intimamente associada ao controle transcricional envolvendo várias vias regulatórias. A invasão de *Paracoccidioides* spp. afeta a estrutura do citoesqueleto das células epiteliais, interferindo em aspectos morfológicos da actina, tubulina e citoqueratina. A degradação de citoqueratina por *P. brasiliensis* pode ocorrer devido aos efeitos de enzimas específicas ou pela glicoproteína 43-kD, gp43, causando a perda das características de rede filamentosa (SOUTO et al., 2003; MENDES-GIANNINI et al., 2004).

#### **2.4.1 Fatores de virulência de *Paracoccidioides* spp. que desempenham um papel relevante na patogênese:**

a) Melanina: confere proteção contra agressões geradas pelo sistema imune do hospedeiro, sendo moléculas imunologicamente ativas que podem: 1) ativar o sistema complemento; 2) conferir resistência a fagocitose, interferindo na capacidade de *burst* oxidativo dos macrófagos, na produção de óxido nítrico, na fagocitose do fungo e até mesmo, inibindo a apoptose de macrófagos após a fagocitose de células melanizadas; 3) atuar na modulação de citocinas, alterando ou até mesmo inibindo sua produção; 4) gerar uma resposta efetiva de anticorpos (EISENMAN et al., 2011; 2012; CASADEVALL et al., 2012).

b) Vesículas extracelulares (VEs): VEs fúngicas são capazes de atravessar a parede da célula e são moléculas de transporte que desempenham um papel na aquisição de nutrientes, defesa celular e até modulação da defesa imune. Estes compartimentos extracelulares compostos por bicamadas lipídicas têm o potencial de regular os principais passos patogênicos durante infecções fúngicas. Particularmente no gênero *Paracoccidioides*, um estudo pioneiro caracterizou VEs fúngicas isolados

de sobrenadantes de cultura de células de levedura de *P. brasiliensis*. Este estudo demonstrou que as VEs de fungos carregam componentes antigênicos com epítomos de  $\alpha$ -galactopiranosil ( $\alpha$ -Gal) altamente imunogênicos, que foram encontrados tanto na superfície da vesícula quanto no lúmen (RODRIGUES et al., 2008; VALLEJO et al., 2011; CAMACHO et al., 2017).

Na última etapa do processo infeccioso, a disseminação, a capacidade de estabelecer a infecção fúngica em nichos distantes a partir da formação de biofilmes representa um fator de virulência crítico em *Paracoccidioides* spp., dificultando a ação de drogas antifúngicas e contribuindo para um estado crônico da doença. Além disso, gp43 inibe a capacidade fagocítica e fungicida dos macrófagos, pela ligação aos receptores de manose, induzindo a produção de IL-18, ocorrendo fuga adicional de *Paracoccidioides* spp. do sistema imunológico por alteração do repertório de células-T. A diferenciação e a maturação das células-T ocorrem no timo, portanto, a integridade do microambiente tímico é crucial para a maturação dos timócitos. Dados experimentais em modelo murino de paracoccidioidomicose aguda mostram que a infecção com células leveduriformes de *Paracoccidioides* promove a atrofia do timo como consequência da desordem espacial das células epiteliais e aumento da expressão gênica de mediadores inflamatórios. Esses resultados sugerem que uma diminuição da diferenciação de células-T patogênicas leva à imunossupressão do hospedeiro, favorecendo ao *Paracoccidioides* spp. a capacidade de se estabelecer e multiplicar no microambiente do timo (GONZALÉZ et al., 2005; VALLEJO et al., 2012; DIAS-MELICIO et al., 2015; CAMACHO et al., 2017).

## 2.5 Formas Clínicas da PCM

A inalação dos conídios dos agentes da PCM provoca inicialmente um complexo primário pulmonar, que pode regredir, com destruição do fungo, progredir, disseminando por via linfática ou hematogênica para outros órgãos, ou ainda formar focos quiescentes, onde o fungo pode ficar viável por décadas no interior de granulomas (RESTREPO et al., 2001, SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). Uma vez que o sistema imune entra em contato com o fungo, vários fatores podem predispor a manifestação da PCM, dentre eles: carência alimentar, susceptibilidade genética, alcoolismo (>50g/dia) e tabagismo (> 20cigarros/dia/>20anos). A progressão da infecção para a doença depende também do tamanho do inóculo, características de patogenicidade e virulência do fungo, bem como da qualidade e integridade do

sistema imunológico do hospedeiro (RESTREPO et al., 2001; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; 2017).

O principal grupo de risco para a infecção são trabalhadores relacionados às atividades com o solo (agricultura, terraplanagem, jardinagem, transporte de produtos vegetais). Os pacientes geralmente são expostos aos agentes infectantes nas duas primeiras décadas de vida, no entanto a manifestação clínica da doença ocorre geralmente entre 30 e 50 anos de idade, sendo somente 10% dos casos em indivíduos menores de 20 anos (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A classificação atual da PCM de acordo com o Colóquio Internacional sobre Paracoccidiodomicose realizado em Fevereiro de 1986 em Medellín, Colômbia (FRANCO et al., 1987) descreve que a PCM pode ser assintomática (PCM-infecção) ou classificada como PCM-doença, clinicamente classificada como forma aguda/subaguda, forma crônica ou forma residual.

A forma aguda/subaguda, ou também conhecida como forma juvenil, é responsável por 5-25% dos casos, predominando em crianças e adolescentes, mas eventualmente pode acometer indivíduos até os 35 anos de idade. A distribuição é semelhante entre indivíduos dos dois sexos, e é caracterizada pela evolução mais rápida da doença. Em quatro a doze semanas os pacientes apresentam linfadenomegalia, manifestações digestivas, hepatoesplenomegalia, envolvimento ósteo-articular, lesões cutâneas ou de mucosa e mais raramente envolvimento pulmonar. Podem apresentar também febre, perda de peso e anorexia (FERREIRA et al., 2009; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A forma crônica (forma adulta) corresponde de 74 a 96% dos casos de PCM e ocorre principalmente em indivíduos entre 30 e 60 anos, predominantemente do sexo masculino (22 homens para cada mulher). A doença progride lentamente, de forma silenciosa, podendo levar décadas até que seja diagnosticada. A PCM crônica inicia lentamente e os sinais e sintomas geralmente surgem após 4-6 meses, possivelmente até um ano. Em alguns pacientes se desenvolve sem qualquer manifestação clínica, e a doença só é detectada em exames de rotina ou exames relacionados ao trabalho. Em 90% dos casos de pacientes com PCM, observa-se comprometimento pulmonar (COSTA et al., 2013; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Pode ser classificada como suave, moderada ou severa. Os casos graves são definidos pela ocorrência de três ou mais dos seguintes critérios: perda de peso de mais de 10% do peso corporal normal, intenso envolvimento pulmonar e envolvimento

de outros órgãos como glândulas supra-renais, sistema nervoso central (SNC) e ossos. Linfonodos podem ser acometidos em múltiplas cadeias em forma superficial, profunda ou supurativa, e elevados títulos de anticorpos são encontrados. Casos considerados leves atingem uma pequena parte dos pacientes, que tem perda de peso corporal abaixo de 5% e envolvimento de um único ou poucos órgãos ou tecidos sem perda da função. Quando os pacientes apresentam manifestações clínicas de mais de uma forma da doença, aguda/subaguda ou crônica, ocorre dificuldade na classificação da doença. Nesses casos os pacientes podem apresentar baixa imunidade celular acentuada e são classificados como tendo forma mista da doença (FRANCO et al., 1987; BERNARD et al., 2000; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

As manifestações clínicas da PCM podem ser bastante severas e acabam deixando graves sequelas nos pacientes acometidos pela doença. As formas residuais ou sequelas são manifestações clínicas das alterações anatômicas e funcionais observadas após o tratamento da PCM. Ocorre especialmente em pulmões, mas podem ser observadas em múltiplos órgãos, como pele, laringe, traqueia, glândulas suprarrenais, mucosa do trato-digestivo superior, SNC e sistema linfático (VALLE et al., 1995; TOBON et al., 2003; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; 2017).

A fibrose pulmonar é descrita em aproximadamente 50% dos pacientes com infecção crônica no pulmão, podendo evoluir para doença pulmonar obstrutiva crônica e suas complicações. Redução da função das glândulas adrenais ocorrem em 40 a 50% dos pacientes. Comprometimento do SNC em 6 a 25% dos pacientes com ocorrência de déficit motor, quadros de epilepsia e hidrocefalia, sendo sua apresentação mais comum representada por lesões expansivas, únicas ou múltiplas, em hemisférios do cérebro, cerebelo ou de ambos. Também pode ocorrer alterações crônicas na voz, como disfonia, devido as lesões nas cordas vocais, com rouquidão ou mudanças na voz não reversíveis, bem como obstrução laríngea com possível necessidade de traqueostomia, redução da rima bucal e quadros de icterícia obstrutiva (obstáculo ao livre fluxo de bile) (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; 2017).

O diagnóstico diferencial para PCM deve ser considerado em condições que incluem: linfoma agudo, leucemia, histoplasmose, tuberculose, toxoplasmose, leishmaniose visceral e mononucleose infecciosa, coccidioidomicose, sarcoidose, pneumoconiose e pneumonite intersticial (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

## 2.6 Epidemiologia

A PCM representa uma das micoses sistêmicas mais importantes da América Latina, sendo endêmica e restrita a mesma, com distribuição limitada entre o México e a Argentina, e maior ocorrência na Venezuela, Colômbia e Brasil. Cerca de 80% dos casos descritos são provenientes do Brasil, principalmente dos estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (BRUMMER et al., 1993; RESTREPO et al., 2001; PANIAGO et al., 2003; VERLI et al., 2005), porém, a ausência de notificação obrigatória dificulta estabelecer a real prevalência da PCM.

É a 8ª causa de morte entre as doenças infecciosas e parasitárias. Estima-se que 10 milhões de latino-americanos já foram infectados pelos agentes da PCM, e que 50% dos trabalhadores rurais já foram expostos a estes agentes, dos quais 1-2% apresentam alguma das formas clínicas da doença. A incidência anual da PCM varia de 1 a 3,7 novos casos a cada 100.000 habitantes, sendo responsável por 1,65 morte/milhão de habitantes no Brasil (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; RESTREPO et al., 2010; QUEIROZ-TELLES et al., 2017; LIFE, 2017). Segundo estudo recente, no Brasil 7,99/1000 habitantes são hospitalizados com suspeita de PCM por ano, sendo esse número maior do que em outras micoses sistêmicas importantes, como a coccidioidomicose (7,12/1000hab.) e a histoplomose (2,19/1000hab.) (GIACOMAZZI et al., 2015).

Algumas mudanças nas características demográficas e na distribuição geográfica dos agentes da PCM puderam ser observadas nas últimas décadas. Essas mudanças podem ser atribuídas ao aumento das cidades, que cada vez mais invadem as áreas rurais, a melhoria no diagnóstico da doença e aos estudos moleculares acerca dos agentes causadores da PCM, que vem ganhando importância, especialmente nas últimas duas décadas. Outros motivos também podem ser atribuídos a essas mudanças, como os fatores ambientais, tais como: expansão de assentamentos, desmatamento das florestas e o aumento da produção de café são citados por vários autores como algumas das razões que podem contribuir para os altos níveis atuais da incidência da PCM (VIEIRA et al., 2014; ARANTES et al., 2016; ROBERTO et al., 2016; TURISSINI et al., 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

### 2.6.1 PCM no Rio Grande do Sul (RS)

Apesar da PCM ser descrita no RS desde 1942 em humanos (CAMPOS et al., 1942; CAUSEL et al., 1942; MEDINA et al., 1942), estudos sobre a doença no estado são escassos, no entanto, somente em Porto Alegre, 757 casos em humanos foram diagnosticados em um único hospital no período de 1996 a agosto de 2002, representando uma média de 126/ano (SILVA et al., 2003). Em outro estudo realizado no estado, foram descritos 61 pacientes diagnosticados com a enfermidade, observando ainda que 73,7% desses provinham da região norte do estado, área tipicamente agrícola (VERLI et al., 2005).

Colares et al. (1998) relatou o primeiro caso autóctone de PCM disseminada aguda/subaguda no RS ocorrido em criança. A doença iniciou com adenomegalias superficiais generalizadas, seis meses antes da internação hospitalar e o diagnóstico foi feito a partir de biópsia de gânglio cervical. Cinco casos em pacientes com acometimento ósseo por PCM crônica em Porto Alegre foram descritos em estudo incluindo 505 pacientes entre 1966 a 1994, todos homens entre 31 a 47 anos de idade (SEVERO et al., 1996).

Um estudo clínico e micológico relatou 260 casos de PCM no interior do RS de 1958 a 1987. Destes, 65 apresentavam a forma pulmonar crônica, 191 a forma disseminada crônica, um a forma oportunista e um, lesões residuais em achados de necropsia. O estudo foi realizado na cidade de Santa Maria, onde residia a maioria dos pacientes, os demais residiam em municípios vizinhos ou ao Norte do estado (LONDERO et al., 1990).

No entanto esses estudos não são suficientes para determinar a distribuição da doença e a ecologia de seus agentes. No extremo Sul do estado os estudos acerca da PCM são ainda mais raros. Embora relatos descrevam a presença da doença na região desde 1963 (KLOETZEL et al, 1963; DUARTE et al., 1999), somente há menos de 10 anos, foi possível evidenciar que a doença tem uma alta prevalência também nessas cidades do extremo sul do RS, com registro de 123 casos diagnosticados somente na cidade de Pelotas, sendo cerca de 100 destes nas últimas duas décadas do estudo (SOUZA et al., 2014). Ainda hoje a grande maioria dos estudos sobre a PCM no RS se restringem a metade norte do estado, mais frequentemente na região Metropolitana de Porto Alegre (LONDERO, 1990; SANTOS et al., 1999; VERLI et al. 2005).

Em adição, a partir do uso de animais como sentinelas, a primeira comprovação da presença de *P. brasiliensis* na zona rural e urbana do extremo sul do RS foi descrita nos últimos anos (ALBANO et al., 2014; 2015; TELES et al., 2016). Estes dados corroboram com a hipótese de que as áreas endêmicas de *Paracoccidioides* spp. vem se expandindo no Brasil (ARANTES et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2014; ARANTES et al., 2016; ROBERTO et al.; 2016). Apesar disso, a ecologia do *Paracoccidioides* spp. ainda é pouco estudada, e, descrições das regiões onde as diferentes espécies do gênero *Paracoccidioides* ocorrem são necessárias para uma melhor compreensão do processo que envolve “agente-hospedeiro-doença” (SHOME & BATISTA 1963; SILVA-VERGARA et al., 1998; FRANCO et al., 2000, ARANTES et al. 2013, ROBERTO et al., 2016).

### **2.6.1.1 Bioma Pampa**

O Pampa no Brasil é restrito ao Rio Grande do Sul, ocupando uma área de 176,496 km<sup>2</sup> (IBGE, 2017). Isto corresponde a 63% do território gaúcho e a 2,07% do território nacional. As paisagens naturais do Pampa são variadas, de serras a planícies, de morros rupestres a coxilhas, com predomínio de campos nativos, mas há também a presença de matas ciliares, matas de encosta, matas de pau-ferro, formações arbustivas, butiazais, banhados, afloramentos rochosos, entre outros (IBGE, 2017). É uma das áreas de campos temperados mais importantes do planeta. Caracteriza-se pelo clima ameno, com chuvas bem distribuídas durante o ano, e umidade relativa média de 75% a 85% durante o ano (IBGE, 2017).

Este bioma apresenta fauna e flora próprias e diversificadas, com grande biodiversidade, devido ser um conjunto de ecossistemas antigo, existe uma grande quantidade de espécies, muitas delas ainda não catalogadas. Dados do Ministério do Meio Ambiente estimam que existam mais de 3.000 tipos de plantas, 500 tipos de aves e 100 espécies de mamíferos desconhecidos (IBGE, 2017). Desde a colonização, a pecuária extensiva sobre os campos nativos tem sido a principal atividade econômica da região, devido ao relevo plano, levemente ondulado. Além de proporcionar resultados econômicos importantes, tem permitido a conservação dos campos, impedindo o avanço das monoculturas que causam uma rápida degradação e descaracterização das paisagens naturais do bioma Pampa, que atualmente encontra-se ameaçado devido o cultivo de algumas monoculturas (IBGE, 2017; CSR/IBAMA, 2010).

Está restrito a metade sul do RS, se estendendo à parte da Argentina e todo o território do Uruguai. Escassos estudos têm sido realizados com *Paracoccidioides* spp. no Pampa, tendo ainda muitas lacunas a serem elucidadas, tanto em relação a incidência da doença quanto a ecologia dos agentes etiológicos e, conseqüentemente, a exposição dos indivíduos à estes fungos. Aproximadamente 1,6 milhões de habitantes gaúchos residem e trabalham na região rural do estado. No Bioma Pampa 46% desses habitantes trabalham com pecuária (25,5% gado de leite) e 30% com agricultura familiar e, devido a esta atividade podem estar no grupo de risco para PCM, já que residem e trabalham em regiões com todas as características de zonas endêmicas da doença, lidando diretamente com o solo (BINKOWSKI, 2009; BOLDRINI et al., 2010; FEE, 2017; BRASIL, 2017).

Estudos epidemiológicos são portanto, imprescindíveis para uma melhor compreensão da importância dessa micose no Pampa Gaúcho, cuja prevalência provavelmente encontra-se subestimada, já que as principais espécies envolvidas com quadros clínicos, e a alta frequência da doença foi recentemente comprovada em algumas cidades do extremo Sul do estado (SOUZA et al., 2014; ALBANO et al., 2014; 2015; TELES et al., 2016).

## 2.7 PCM em animais

Os animais, assim como os humanos, podem se infectar pelos fungos do gênero *Paracoccidioides*, apesar de raramente desenvolver a doença. Na literatura são relatados diversos casos de PCM em animais desde 1977, como em mico-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) (JOHNSON & LANG, 1977), tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*) (NAIFF et al., 1986), tatu-do-rabo-de-porco (*Cabassous centralis*) (CORREDOR et al., 2005), preguiça-real (*Choloepus didactylus*) (TREJO-CHAVES et al., 2011), cão doméstico (*Canis familiaris*) (RICCI et al. 2004; FARIAS et al., 2005;), e gato-doméstico (*Felis catus*) (GONZALEZ et al., 2010).

O primeiro relato de PCM em um animal silvestre ocorreu em um mico-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) na Bolívia, onde o animal foi encontrado apático e com sangramento anal, foi então encaminhado para eutanásia e na necropsia foram observadas lesões ulceradas e granulomatosas na mucosa gástrica e no fígado. Ao realizar exames histopatológicos foi constatado a presença de *P. brasiliensis* (JOHNSON & LANG, 1977).



Os tatus são animais muito estudados em relação a PCM, auxiliando na compreensão da epidemiologia da doença. Isto porque vivem em tocas no solo de áreas rurais, não costumam se afastar muito desses locais, possuem hábito fossorial e escavatório, o que poderia contribuir para a dispersão dos conídios do *Paracoccidioides* spp. no ambiente. A distribuição geográfica desses animais costuma coincidir com a distribuição da PCM no Brasil, podendo esses animais serem considerados sentinelas da presença do fungo. Diversos autores descreveram a exposição dos tatus ao *P. brasiliensis*, bem como já realizaram isolamento fúngico de lesões de diversos órgãos comprovando inclusive acometimento dos pulmões. Estudos realizados nos habitats de tatus, já foram realizados para comprovar a presença do *Paracoccidioides* spp. no solo (NAIFF et al., 1986; CORREDOR et al., 1999; SILVA-VERGARA et al., 2000; BAGAGLI et al., 2003; 2008; ALBANO et al., 2014; ARANTES et al., 2013; 2016).

O caso mais recente em animais silvestres foi de uma preguiça-de-dois-dedos (*Choloepus didactylus*) importada da Guiana Francesa para o México, pouco após sua chegada tornou-se letárgica, anoréxica e desidratada indo a óbito. Na necropsia foram observadas lesões granulomatosas em alguns órgãos como fígado, baço, rins e pulmões, onde foram observadas células leveduriformes com múltiplos brotamentos compatíveis com *P. brasiliensis* ao exame histopatológico (TREJO-CHAVEZ et al., 2011).

Nos animais domésticos também existem relatos da ocorrência da PCM. Na cidade de Mogi Guaçu em São Paulo, uma cadela da raça Dobermann foi relatada como o primeiro caso de PCM em cães no Brasil. O animal apresentava aumento dos linfonodos cervicais que na histopatologia revelou células leveduriformes com características compatíveis com *P. brasiliensis*, sem comprometimento de outros órgãos. Foi tratada até a regressão dos linfonodos, porém após 18 meses os sinais clínicos retornaram e optou-se pela eutanásia. O diagnóstico para PCM foi confirmado por imunohistoquímica com anticorpo específico anti-gp43 e por *nested*-PCR usando *primers* específicos (RICCI et al., 2004).

Outro caso de PCM foi relatado em 2011, também em cão fêmea da raça Dobermann. O animal nasceu na Argentina, participava de exposições onde permaneceu até os dois anos de idade e veio para o Brasil onde passou por vários estados até residir permanentemente na cidade de Curitiba no Paraná. Com seis anos apresentava linfadenomegalia generalizada, com emagrecimento progressivo. O

diagnóstico foi realizado por cultura fúngica, imunohistoquímica e histopatologia do linfonodo poplíteo. A cura clínica foi obtida após dois anos de tratamento com itraconazol (FARIAS et al., 2011).

Em felinos domésticos há o relato de PCM em um gato persa macho. De acordo com o autor foram detectadas estruturas compatíveis com *P. brasiliensis* no líquido cefalorraquidiano e na urina do animal. Apresentava febre, anorexia, fraqueza, tremores e neutropenia e não respondeu a antibioticoterapia. Após o diagnóstico foi tratado com antifúngicos e desenvolveu uma síndrome urêmica progressiva onde optou-se pela eutanásia. A necropsia não foi autorizada pelo proprietário, sendo esse caso portanto não comprovado pela falta de análise dos possíveis tecidos lesionados pela doença (GONZALEZ et al., 2010).

A utilização de animais como sentinelas vem demonstrando uma excelente estratégia para mapear a distribuição da PCM-infecção no Brasil, uma vez que os animais silvestres fornecem um dado importante por manterem um contato estrito com o ambiente, favorecendo assim conhecimento de áreas geográficas onde há a presença do fungo, visto que muitos animais não têm hábitos migratórios como os humanos. Na literatura existem diversos relatos acerca de casos da infecção por *Paracoccidioides* spp. em animais mostrando uma ampla distribuição dos agentes da PCM. Para que este mapeamento seja realizado estudos tem utilizado diversos ensaios sorológicos como imunodifusão dupla em gel de ágar (IDGA), ensaio imunoenzimático (ELISA), *Westerm Blot* e também o emprego de outras técnicas como a PCR com utilização de *primers* específicos para as espécies de *Paracoccidioides*, além de cultivo micológico em diversas espécies domésticas e silvestres (ONO et al., 2001; CORTE et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2012; ALBANO et al., 2014).

Em Minas Gerais um estudo com objetivo de avaliar a infecção natural por *P. brasiliensis* foi realizado a partir de sorologia e teste intradérmico em 275 cães domésticos, demonstrando que dos 149 animais da área urbana do município de Uberaba 80 apresentaram sorologia positiva e nove foram positivos para os testes intradérmicos, enquanto que dos 126 da área rural, soropositividade foi encontrada em 102 (FONTANA et al., 2010). No município de Monte Negro, Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira, positividade de 54,8% das amostras de soro de 126 cães urbanos analisadas por ELISA indireto utilizando gp43 foi encontrada, sem diferença estatística observada na soroprevalência em relação ao sexo ou à idade (CORTE et al., 2012).

Outro estudo realizado no norte do Paraná incluiu soro de 305 animais analisados por ELISA para detectar a presença de anticorpos anti-gp43. Os animais foram divididos em grupos: 54 cães urbanos (animais com pouco ou nenhum contato com a área rural), 213 cães suburbanos (animais da periferia da cidade, locais sem calçamento ou asfalto) e 38 cães rurais (animais que viviam exclusivamente em área rural). Os resultados obtidos demonstraram que os cães urbanos tiveram uma positividade de 14,8%, os suburbanos de 48,8% enquanto que 89,5% dos animais da área rural foi positivo (ONO et al., 2001).

Ainda no estado do Paraná, um estudo buscou avaliar a infecção por *P. brasiliensis* em 100 equinos, 53 machos e 47 fêmeas, com idades entre um e dezesseis anos. As amostras séricas foram analisadas por ELISA e por imunodifusão radial em gel de ágar, utilizando como antígenos a gp43 e o exoantígeno de *P. brasiliensis*. Não foram observados animais positivos na imunodifusão radial em gel de Ágar, enquanto que por ELISA a soropositividade foi de 30% (CORTE et al., 2009). Neste mesmo estado, em Guarapuava, estudo soroepidemiológico demonstrou uma positividade de 37% para gp43 por ELISA em 262 ovinos da região (OLIVEIRA et al., 2012).

Bovinos leiteiros também já foram estudados quanto a presença do *P. brasiliensis* em um estudo soroepidemiológico realizado no estado do Mato Grosso do Sul. Foram incluídos 400 animais, 340 fêmeas e 60 machos, com idades entre nove meses a dez anos, demonstrando 17,5% de soropositividade para a gp43 (SILVEIRA et al., 2008). Frangos domésticos (*Gallus domesticus*) foram incluídos em um estudo da região do Pantanal sul matogrossense e da região norte do estado do Paraná, onde amostras de soro foram testadas por ELISA indireto utilizando gp43 como antígeno. As amostras foram coletadas de 100 animais não confinados e 43 confinados no Paraná, e de 40 animais não confinados no Mato Grosso do Sul. Os animais não confinados do Mato Grosso do Sul e do Paraná apresentaram positividade de 55% e 16%, respectivamente, enquanto que todos os animais confinados foram negativos (OLIVEIRA et al., 2011).

Estudos com animais silvestres também foram realizados com destaque para o tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*), cuja importância se dá pela sua distribuição geográfica na natureza, que se sobrepõem, em grande parte, às áreas endêmicas da PCM-doença. O animal é bastante estudado devido seus hábitos de não se afastar de sua toca, o que permite a delimitação com maior precisão da possível reservárea de

*Paracoccidioides* spp. e, conseqüentemente, de maior risco para infecção humana. Estes animais, possuem íntimo contato com o solo, e podem ser considerados como importantes sentinelas da presença do agente fúngico na região onde se encontra, seja por detecção da sua exposição ao agente ou por seu acometimento por PCM, conforme já descrito por diversos autores com casos comprovados por isolamento fúngico ou por exame anátomo-patológico de lesões em fígado, baço, pulmões e linfonodos mesentéricos (SILVA-VERGARA & MARTINEZ, 1999; CORREDOR et al., 1999; SILVA-VERGARA et al., 2000; BAGAGLI et al., 2003; BAGAGLI et al., 2008).

A biologia molecular também é utilizada para avaliar a presença de *Paracoccidioides* spp. em animais silvestres. Um estudo realizado em SP, utilizando animais vítimas de atropelamento detectou a presença de *P. brasiliensis* por *nested-PCR*. Amostras de tecido de vários órgãos de 19 animais silvestres foram estudadas, sendo positivas em dois tatus (*Dasyus novemcinctus* e *Dasyus septemcinctus*) e uma preá (*Cavia aperea*), nos pulmões e fígado de um ouriço-cacheiro (*Sphiggurus spinosus*) e nos pulmões de um mão-pelada (*Procyon cancrivorus*) e um furão (*Gallictis vittata*) (RICHINI-PEREIRA et al., 2008).

Um estudo realizado com Xenartros, também vítimas de atropelamento, mortos em cativeiro, capturados ou encontrados mortos na natureza, utilizando técnicas moleculares e cultura fúngica, descreve *P. brasiliensis* em vários órgãos de sete tatus-galinha (*Dasyus novemcinctus*) e em dois tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*). A positividade foi relativamente alta nos animais da natureza ou que morreram logo após o início do cativeiro enquanto todas as amostras de animais que estavam um longo período em cativeiro foram negativas (RICHINI-PEREIRA et al., 2009).

Um estudo realizado com 20 gambás-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*), no Triângulo Mineiro, estado de Minas Gerais, buscou o isolamento fúngico direto de fígado, baço e pulmões e posterior inoculação intraperitoneal da suspensão dos fragmentos destas vísceras em camundongos, não houve isolamento fúngico durante as 12 semanas de incubação nem desenvolvimento da doença nos animais inoculados (SILVA-VERGARA et al., 2001).

Costa et al., (1995a), estudou a relação dos habitats e comportamento de animais silvestres, em um estudo com teste intradérmico com paracoccidioidina em 96 mamíferos silvestres: 33 primatas, macacos-prego (*Cebus apella*), saguis detufos-branco (*Callithrix jacchus*), 37 quatis (*Nasua nasua*) e 10 felídeos (*Panthera onca*,

*Leopardus pardalis*, *Leopardus wiedii*, *Leopardus tigrinus* e *Leopardus geoffroyi*), demonstrando que os animais de hábito terrestre possuem maior positividade (82,98%) do que os arborícolas (22,45%).

Em São Paulo (SP) estudo sorológico, com testes intradérmicos, foi realizado pelos mesmos autores utilizando animais domésticos de vários municípios, e animais silvestres provenientes do Zoológico de SP ou doações de particulares. Foram incluídos neste estudo 632 bovinos, 234 equinos, 98 ovinos, 16 saguis-de-tufos-branco (*Callithrix jacchus*), 36 macacos-prego (*Cebus apella*), 37 quatis (*Nasua nasua*) e três onças-pintada (*Panthera onca*), uma jaguatirica (*Leopardus pardalis*), um gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), quatro gatos maracajá (*Leopardus wiedii*), e um gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*). Observou-se positividade de 40,2% nos bovinos, 63,8% nos equinos, 40,8% nos ovinos, 21,1% nos primatas, 94,6% nos procionídeos e 45,4% nos felídeos (COSTA et al., 1995 b).

No RS estudos utilizando animais como sentinelas foram realizados com animais domésticos e silvestres comprovando a presença de *P. brasiliensis* na zona rural e urbana do extremo sul do estado (ALBANO et al., 2014; 2015; TELES et al., 2016). O primeiro destes estudos foi realizado com amostras séricas de 128 animais silvestres de três mesorregiões do RS (Mesorregiões Sudeste, Sudoeste e Metropolitana de Porto Alegre) por IDGA e ELISA para detecção de anticorpos anti-gp43 de *P. brasiliensis*. Nenhuma amostra foi positiva na IDGA, mas houve positividade em 26 animais (20%) pertencentes a 13 espécies distintas, pela técnica ELISA. Os animais soropositivos eram de duas mesorregiões do estado (Sudeste e Metropolitana de Porto Alegre) (ALBANO et al., 2014).

No ano de 2015 o mesmo grupo de pesquisadores realizou um estudo semelhante com equinos provenientes da mesorregião Sudoeste do estado. Foram incluídas amostras séricas de 200 equinos de cinco haras da cidade de Bagé submetidas a técnicas sorológicas, IDGA e ELISA, para detectar anticorpo anti-gp43. A sorologia foi realizada em 200 cavalos ingleses-puro-sangue de até dois anos de idade que nasceram e foram criados exclusivamente nestes haras. Destes equinos, 12% apresentaram anticorpos anti-gp43 de acordo com os resultados de ELISA, com taxas variando de 0 a 30% de acordo com o Haras de origem. Na imunodifusão todas amostras de soro equino foram negativas (ALBANO et al., 2015). Outro estudo realizado com cães domésticos no sul do RS, zona urbana das cidades de Pelotas e Capão do Leão, demonstrou a presença de *P. brasiliensis* na região pela detecção de

anticorpos anti-gp43. Foram incluídos 196 animais em situação de rua e semi-domiciliados, e a soropositividade foi de 29,6%, sem diferença significativa quanto ao gênero, idade e raça. Animais soropositivos foram detectados em todos os bairros estudados da cidade de Pelotas, bem como no município vizinho Capão do Leão (TELES et al., 2016).

## 2.8 Diagnóstico e Tratamento da PCM

O padrão-ouro para diagnóstico da PCM ainda é o exame direto do escarro ou outras amostras clínicas como raspado de lesão, aspirado de linfonodos e/ou fragmento de biópsia de órgãos que possam estar acometidos (SIDRIM & ROCHA, 2003; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; 2017). O exame direto das amostras biológicas pode ser realizado com hidróxido de potássio (KOH) 10-40%, evidenciando blastoconídios grandes esféricos a ovalados com parede dupla, que podem apresentar um único ou múltiplos brotamentos (exoesporulação) característicos do fungo. As leveduras de *Paracoccidioides* spp. tem tamanho destacado em relação a outras micoses, medindo de 5 a 25  $\mu\text{m}$ . A coloração pelas técnicas de prata de Gomori/Grocott e de ácido periódico de Schiff pode ser utilizada no exame direto e nos fragmentos de biópsia tecidual para melhor visualização do fungo aumentando a sensibilidade do teste (LACAZ, 2002; SIDRIM & ROCHA, 2003; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

A cultura fúngica também pode ser utilizada como ferramenta diagnóstica, no entanto o resultado é tardio, devido a necessidade de incubação por um período superior a 21 dias, visto que *Paracoccidioides* spp. é um fungo fastidioso e de crescimento lento. A amostra deve ser semeada em ágar Sabouraud dextrose, ágar Sabouraud dextrose com cicloheximida, ágar BHI (*brain heart infusion*) acrescido de glicose ou ainda ágar sangue. O material é incubado a temperatura ambiente (25°C), observando-se culturas aveludadas com micélio curto de coloração branca e reverso amarelo-acastanhado, e a 37°C para evidenciar seu dimorfismo, demonstrando colônias leveduriformes (WANKE et al., 2001; TARANTINO et al., 2002; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; 2017).

As provas sorológicas têm grande importância no diagnóstico da PCM, pois também avaliam a resposta ao tratamento e as recidivas da doença, onde a elevação de títulos de anticorpos pode proceder a uma recidiva clínica. Atualmente a imunodifusão dupla em gel de ágar (IDGA), a contraímunoeletroforese (CIE),

imunoblots (IB) e ensaios enzimáticos (ELISA) são os testes sorológicos disponíveis em serviços de referência (MARQUES et al., 2003). Um dos testes sorológicos mais utilizados na prática clínica é o da IDGA, por causa de sua simplicidade, custo-efetividade, e sensibilidade e especificidade superiores a 85%. É sempre desejável que a IDGA seja titulada para uma melhor interpretação da resposta terapêutica. Para atender aos critérios de cura sorológica, os resultados negativos ou de estabilização em uma diluição de 1:2 ou menos devem ser alcançados (NEGRONI et al., 1976; CAMARGO et al., 1988).

O ELISA representa um método alternativo para o sorodiagnóstico da PCM, mais rápido e mais apropriado para exame de grande número de soros. É técnica mais sensível, porém sua especificidade é menor do que a da IDGA, exigindo cuidadosa padronização e interpretação dos resultados positivos. A reação de IB permite especificar os tipos de anticorpos séricos contra os diversos determinantes antigênicos do fungo. Resultados falso-negativos podem ocorrer em pacientes portadores de AIDS e falso-positivos nos que tenham histoplasmose ou aspergilose (MARQUES et al., 2003; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; 2017). Outros exames, incluindo a técnica de imunotransferência (*Western Blot*), o teste ELISA de triagem, a detecção de antígenos específicos e PCR apesar de eficazes não estão disponíveis na rotina de avaliação da PCM (MARQUES et al., 2003; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; 2017).

O tratamento da PCM deve incluir medidas de suporte às complicações clínicas associadas ao envolvimento de diferentes órgãos por esta micose, além da terapia antifúngica específica. Ao contrário de outros fungos patogênicos, *P. brasiliensis* e *P. lutzii* são suscetíveis a maioria dos antifúngicos sistêmicos, e até mesmo os derivados de sulfonamidas podem inibir seu crescimento. Não há evidências concretas para a resistência primária ou secundária aos medicamentos utilizados no tratamento da PCM. Vários antifúngicos demonstram ser eficazes contra as diferentes formas clínicas da PCM, entre eles os derivados azóis: cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol, e os derivados de sulfonamidas: cotrimoxazol, sulfadiazina, entre outros; a anfotericina B pode ser utilizada para as formas mais graves, assim como a terbinafina (QUEIROZ-TELES et al., 2007; THOMPSON et al., 2016; PEÇANHA et al., 2016; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Informações disponíveis sobre o tratamento da PCM são limitadas, no entanto, estudos comparativos com diferentes esquemas terapêuticos sugerem que o itraconazol é a opção terapêutica que permitiria o controle das formas leves e moderadas da doença em um período mais curto de tempo. Porém como o medicamento não está disponível na rede pública de saúde da maioria dos estados brasileiros, a combinação sulfametoxazol-trimetoprim é a alternativa da maioria dos pacientes na terapêutica ambulatorial. Pacientes com formas graves, necessitando internação hospitalar, devem receber anfotericina B ou associação sulfametoxazol-trimetoprim por via intravenosa (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; QUEIROZ-TELES et al., 2007; BORGES et al., 2014; THOMPSON et al., 2016; PEÇANHA et al., 2016).

A duração do tratamento está relacionada a gravidade da doença e ao tipo de fármaco utilizado. O tratamento geralmente é de longa duração, para permitir o controle das manifestações clínicas da doença e evitar as recidivas. O paciente deve manter o tratamento até atender todos os critérios de cura, com base nos parâmetros clínicos, radiológicos e sorológicos. Mesmo após considerado curado o paciente deve retornar todos os anos ao ambulatório médico para exame sorológico que irá controlar os níveis de anticorpos contra os fungos do gênero *Paracoccidioides*, devido a esta problemática alguns autores consideram que não há a cura clínica definitiva da PCM. O tratamento para as formas leves e moderadas da doença pode durar de seis a 18 meses quando administrado itraconazol, e de 12 a 24 para o tratamento com sulfametoxazol-trimetropim (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; 2017; MEDSCAPE et al., 2017).



### **3 Artigos**

#### **3.1 Artigo 1**

#### **Paracoccidioidomycosis infection in domestic and wild mammals by *Paracoccidioides lutzii***

Josiara F. Mendes, Gabriel B. Klafke, Ana Paula N. Albano, Ângela L. Cabana,  
Alessandra J. Teles, Zoilo P. de Camargo, Melissa O. Xavier, Mário Carlos A.  
Meireles

Publicado na revista Mycoses 2017 Jun;60(6):402-406

**Paracoccidioidomycosis infection in domestic and wild mammals by *Paracoccidioides lutzii***

Josiara Furtado Mendes<sup>1</sup>, Gabriel Baracy Klafke<sup>2</sup>, Ana Paula Neuschrack Albano<sup>3</sup>, Ângela Leitzke Cabana<sup>1</sup>, Alessandra Jacomelli Teles<sup>1</sup>, Zoilo Pires de Camargo<sup>4</sup>; Melissa Orzechowski Xavier<sup>2</sup>, Mário Carlos Araújo Meireles<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Center of Diagnosis in Veterinary Micology, Department of Veterinary Preventive, Faculty of Veterinary, University Federal of Pelotas (UFPel), RS, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratory of Micology, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande (FURG), RS, Brasil.

<sup>3</sup>Hospital of Veterinary Practice, Faculty of Veterinary, UFPel, RS, Brasil

<sup>4</sup>Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Cellular Biology Division, Federal University of São Paulo (UNIFESP) São Paulo, Brasil

**Short title:** *Paracoccidioides lutzii* in animals

**Keywords:** ELISA, antibodies, paracoccidioidomycosis-infection, epidemiology, Rio Grande do Sul, *Paracoccidioides lutzii*, CFA.

**Corresponding author:**

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Melissa Orzechowski Xavier

phone: 55 53 32374636, [melissaxavierfurg@gmail.com](mailto:melissaxavierfurg@gmail.com).

## SUMMARY

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis that occurs in several Latin American countries, especially Brazil. It is caused by the thermo-dimorphic fungus *Paracoccidioides* spp. Serological studies to detect animal infection has represented an excellent strategy for data on the agent's ecology. In this context, given that the state of Rio Grande do Sul (RS) is an endemic area for PCM in humans, but there is scarce information available on the ecology of the agent in the region, this study aimed to investigate the infection by *Paracoccidioides lutzii* in animals living in RS. A total of 85 wild mammals, 200 horses and 196 domestic dogs, previously tested for infection with *P. brasiliensis* were included in this study. Serum samples from the animals were tested by ELISA to detect anti- *P. lutzii* antibodies. From the 481 animals tested, 105 (21.8%) were seropositive for IgG anti-*P. lutzii*. Of these, 54 was also positive for *P. brasiliensis*. A total of 11 horses (10.5%), 30 dogs (28.8%) and 10 wild mammals (9.5%) were positive only for *P. lutzii* (n = 51). The detection of anti-*P. lutzii* antibodies in animals of RS suggests that the fungus can be found in southern Brazil, despite being described mainly in the Midwest and Southeast of the country.

## INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis with a major importance in Latin America countries, especially Brazil. It affects mainly individuals of rural areas, and is caused by thermo-dimorphic fungi of the genus *Paracoccidioides* [1-3]. This fungus lives in the soil, especially in rural areas near waterways [4], however, their ecological niche is not yet fully defined. Several factors contribute to this limitation, such as difficulty of the environment fungus isolation and the long latency period of the disease [5,6].

Workers who handle the soil directly are the most likely to acquire PCM. Particles or aerosol contained conidia of the fungus can be inhaled and reach the terminal bronchioles in the lungs. Once installed in the pulmonary alveoli, the fungus get the dimorphic transition to the yeast form due to the corporal temperature [7].

Phylogenetic studies about the etiological agent of the disease found that *Paracoccidioides brasiliensis* corresponds to a complex of species: *P. brasiliensis* (S1, PS2, PS3, PS4) and *P. lutzii*, with descriptive occurrence in geographical areas of Brazil, Argentina, Peru, Paraguay, Venezuela (S1 and PS2) and Colombia (PS3) [8,9]. The subspecies PS4 was most recently isolated in Venezuela [10, 11] and the *P. lutzii*, recently described in Brazil [8].

Few data are described in the literature concerning the infection by this new PCM agent, *P. lutzii*. Also, those studies have focused mainly in human infections, and describe PCM cases in Brazil since the Midwest, Southeast, Amazon region [12], to Pará, Paraná and Rio Grande do Sul [13].

Although the Rio Grande do Sul is considered endemic to PCM in humans for several decades [14,15], recent studies using animals as sentinels demonstrated for the first time the presence of the fungus *P. brasiliensis* on the state [16,17]. Data on the presence of *P. lutzii* in the state of RS are not yet described and considered the serological investigation of fungal infection in animals, this study represents an excellent strategy to study the ecology of *P. lutzii* [5]. This study aimed to assess paracoccidioidomycosis infection due *P. lutzii* in domestic and wild mammals from different mesoregions of Rio Grande do Sul (RS) by serological technique.

## MATERIALS AND METHODS

### Samples and Regions Studied

The study included 200 samples of blood serum of horses, 196 domestic dogs and 85 wild mammals from different mesoregion of the RS, Brazil. Serum samples were stored in Serum Bank's of the Mycology Laboratory of the Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande (FAMED-FURG).

Horses studied were originated from the city of Bagé, located in the Southwest mesoregion of Rio Grande do Sul (RS), Brazil, at an average height of 212m. It has subtropical temperate, lukewarm summers (high temperatures during the day and mild at night), and quite harsh winters with frosts. The annual average temperature is 18°C and the monthly temperatures range from near zero in winter to 24°C in summer. The average annual relative humidity is 75%. Precipitation is generally distributed throughout the year, and the average annual volume is 1.472 mm, with monthly averages ranging from 104 mm to 142 mm [18].

The dogs included in the study belonged to the mesoregion of Southeast RS, specifically from the urban areas of the municipalities of Pelotas and Capão do Leão. These municipalities are characterized by subtropical-humid climate, with tepid summers and winters with frosts. The annual average temperature is 17.5°C, ranging from temperatures close to zero in the winter and 36°C in summer. The average annual rainfall is 1.379 mm and relative humidity of about 80% [19, 20].

The wild mammals originated from three different mesoregions of RS, mesoregion Southwest (71 animals), Metropolitan mesoregion of Porto Alegre (13 animals) and mesoregion Southeast (one animal). These include mesoregions altitudes between four and 450 meters. The climate is humid subtropical, with high relative humidity ranging from 70 to 85%, hot summers and cold winters with frequent frosts. Average temperatures vary in the range of 23 to 25 ° C in the warmer months and 12-14°C in the coldest months. Rainfall eventually distributed throughout the year, with an average annual rainfall of 1.300 mm [20].

### **Characteristics and Origin of Animals**

All horses included in the study were Thoroughbred, with up to two years old, born and raised exclusively in five different farms in the city of Bagé. The animals were select randomly, and those who had access to any other location (transport, participation in events, auctions) were excluded, totalizing 200 horses.

Domestic dogs (n = 196) included were wandering and domiciled animals participants of a population control program. Of these, 161 animals were mongrel, and other (n = 35) belonged to 18 different breeds.

The wild mammals were originated from the Rehabilitation Center of Wildlife of Pelotas (NURFS), Brazil, located in the Biology Institute of the Federal University of Pelotas (UFPEL) and belonged to six different orders: Primates (n=16), Rodentia (n=5), Carnivora (n=22), Marsupialia (n=32), Xenarthra (n=3) and Artiodactyla (n=7), totalizing 85 animals.

All procedures were developed in accordance to the ethical principles, and the project was approved by the Ethics Committee on Animal Experiments of the UFPEL (CEEA 6863-2015).

### ***P. brasiliensis* and *P. lutzii* antigens**

For the traditional *P. brasiliensis* exoantigen preparations (AgPbB339), we used *P. brasiliensis* B339 isolate as described previously [21]. Briefly, the fungus was initially grown on Sabouraud medium (SAB) slant tubes for 3 days at 35°C. At that time, growth (consisting entirely of yeast cells) was collected from at least 10 tubes. These cells were inoculated into 500mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL yeast extract-peptone-dextrose (YPD) broth (Difco). This culture was incubated for 3 days at 35°C on a gyratory shaker at 50 RPM (ETICA, Sao Paulo, Brazil). The growth obtained was transferred to 1800 mL Fernbach flasks containing 500 mL YPD broth. The flasks were further incubated as above for 7 days. The culture was killed with Merthiolate (ethylmercurithiosalicylic acid, sodium salt, 0.2 g/L). A presumptive test for viability is microscopic observation of cells suspended in 0.4%.

Trypan blue dye. Supernatant fluids were collected following paper filtration, concentrated under vacuum at 45°C, and dialyzed against three changes of 3l each of distilled water. The molecular weight cut-off of the dialysis membrane used was 10 kDa. After dialysis, if the final volume increased, the solution was concentrated again.

Preparation of *P. lutzii* cell-free antigen (CFA): CFA corresponds to molecules that are secreted by the fungus across the cell wall, adhere to the surface of the fungus, and then released during antigenic preparation. *P. lutzii* isolate (EPM 208) was grown on SAB (Difco Laboratories) at 35°C for 7 days. The fungal growth was collected from five tubes by gently scraping the surface. The cell mass was suspended in 1 mL of PBS, vortexed for 60s, and immediately centrifuged at 10.000 g in an Eppendorf tabletop centrifuge for 60s. The supernatant contained the CFA [22]. Protease inhibitor PMSF (20 mM final concentration) was added to the CFA and finally lyophilized. Before use, each CFA preparation was resuspended in saline. The protein concentration varied between 1220 and 2000 µg/mL. The protein contents were determined using the Bradford method [23]. The presence of antigenic fractions was monitored by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) [24].

### **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

To assess the exposure of animals to *P. lutzii* or *P. brasiliensis* serum samples were subjected to ELISA. Polystyrene 96-well microplates (Kasvi, k12-096. - Imp Curitiba-Paraná),

were coated with 100  $\mu\text{L}$ /well of *P. lutzii* cell-free antigen (CFA) (27 $\mu\text{L}$  of CFA diluted in 11 ml of bicarbonate buffer in pH 9.6), and incubated at 4°C for 18h. Also, *P. brasiliensis* exoantigens (12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was used to detect antibodies anti-*P. brasiliensis*. The plates were then washed with phosphate buffered saline phosphate plus 0.5% Tween 20 (PBS-T). Washes of the plates with the same solution were performed between each step of the test. Then, wells were blocked with 5% powdered skimmed milk (in PBS) for 1h at 37 °C. Then sera (1:50 dilution in PBS-T) were added at (100  $\mu\text{L}$ / well), incubated for 1h at 37 °C. Then, 100  $\mu\text{L}$  of conjugate was added in each well, followed by incubation for 1h at 37 °C. After the final wash, 100  $\mu\text{L}$  of the substrate (OPD 0,005 $\mu\text{g}$  + 11 mL citrate buffer + 11  $\mu\text{L}$  of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) was added and the microplate was incubated for 10 minutes at 37 °C in the dark. The reaction was blocked by adding 100  $\mu\text{L}$  of 1N sulfuric acid and the reading of the absorption was determined in a microplate reader (THERMO PLATE®) using 450 nm filter. All samples were tested in triplicate.

The conjugate used in the test from horse serum samples was protein G-peroxidase (Sigma ® / USA) at 1:10.000 dilution. For the test with sera of domestic dogs it was used anti-dog IgG immunoglobulin conjugated to peroxidase (Sigma ® / USA, 1: 10.000 dilution). And, finally, for tests carried out with wild mammal sera it was used protein G-peroxidase and peroxidase-Protein A (both Sigma ® / USA, 1:10.000 dilution) as the conjugate.

The positive control used in all tests was obtained from a sample previously tested with a positive result of each species, equine (OD – Optical Density - 0.39 to 0.81), canine (OD 0.82 to 1.41) and wild mammal (OD: 0.20 to 0.44). Negative control corresponded to a "pool" of animal sera, previously tested as negative (horses: OD from 0.12 to 0.29; canines: OD from 0.06 to 0.31 and wild mammals OD ranged from 0.05 to 0.08). Samples with absorbance greater than twice the negative control were considered positive.

### **Variables evaluated**

Variables evaluated for seropositivity was origin for all animals. It was determined by stud farm of origin for horses, city region (Areal, Três Vendas, Centro, Fragata, Laranjal ou Capão do Leão) for dogs and mesoregion of origin (Metropolitan Porto Alegre, Southeast and Southwest of Rio Grande do Sul) for wild mammals.

It was also evaluated the presence of anti-*P. brasiliensis* IgG in all animals from previous serologic studies with gp-43 antigen [16, 17, 25].

### **Data analysis**

Descriptive analysis of the data was performed by Chi-square test to assess the categorical variables using the program SPSS Statistics v. 20.0 (IBM®) and considering the significance level  $p < 0.05$ .

## RESULTS

Seropositivity for IgG anti-CFA of *P. lutzii* was detected in 13% of horses (26/200), 26.5% of the dogs (52/196) and 31.8% of wild mammals (27/85). Of these, sera from 15 horses, 22 dogs and 17 wild mammals also had IgG anti-gp-43 from *P. brasiliensis* [16, 17, 25]. However, seropositivity only for *P. lutzii* occurred in 5.5% (11/200) of horses in 15,3% (30/196) of dogs and 11,8% (10/85) of wild animals (Table 1).

The variable evaluated influenced significantly ( $p < 0.001$ ) the seropositivity of the studied horses, with the animal seropositivity rate ranging from 1.9 to 50% among the five horse farms studied. On the other hand, in dogs and wild mammals, this variable had no significant effect on the results (Figure 1).

## DISCUSSION

Serology is a useful tool to study epidemiological aspects of mycotic infections in domestic and wild animals, once the fungi present in nature can be inhaled by these animals and their organism elicit an immune response by the production of specific antibodies. Several studies on the detection of *P. brasiliensis* antibodies in domestic and wild animals using serological methods, mainly by ELISA, have been reported [26, 27, 28], denoting the occurrence of paracoccidioidomycosis infection.

According to recent studies, *P. lutzii* has its epicenter in the central-west region of Brazil, unlike *P. brasiliensis*, which was also described in the South and Southeast regions of the country [3, 6, 16, 24, 29]. However, *P. lutzii* was reported in Amazon region [30]. This is the first report to describe animals with antibodies against *P. lutzii* in the state of Rio Grande do Sul, suggesting that the fungus is also present in southern Brazil.

Among the seropositive animals for IgG anti-*P. lutzii*, 54 of them were also positive in detecting anti-*P. brasiliensis* antibodies. This may be result of cross-reaction between both species, once *P. lutzii* CFA and *P. brasiliensis* exoantigens are constituted by various antigenic components and some of them may have common epitopes. According to the study by Gegembauer et al. [24], anti-*P. brasiliensis* (gp43) antibodies are detectable only in individuals infected with *P. brasiliensis*, however, the detection of anti-*P. lutzii* antibodies can occur in the infection by both species. In this context, we can assume that at least 51 of the 105 positive



animals of our study, which had only anti-*P.lutzii* antibodies, with a negative result for IgG anti- *P. brasiliensis* (gp43), were exposed to *P. lutzii*. Considering the origin of these animals, it suggested that the agent is present in different Southeast and Southwest mesoregions of Rio Grande do Sul.

Some authors had showed that the antibody titration of these animals could assist in better interpretation of this finding, since although there is cross-reactivity of infection by *P. brasiliensis* in ELISA for anti-CFA IgG detection, those samples results in much lower antibody titers [22,23]. However, this is a limitation of our study where no antibodies quantification was performed, considering seropositive the samples with absorbance detection at least two times higher than the negative control.

A study with aerosols to the environmental detection of *P. lutzii* by molecular techniques was carried out in the Southeast region of Brazil by Arantes et al. [9], showing the presence of the DNA of this fungus, which suggest that the fungus cannot be exclusive of the country's Midwest region as previously proposed [8]. Our results corroborate with this study, suggesting the presence of *P. lutzii* species also in southern Brazil.

Considering that *Paracoccidioides* spp. habitat soil, and growth better in humid environment with water courses near [30,31], the difference in seropositivity rate between horses in our study, can be linked to the environmental conditions at the place where they live. Although the vegetation of them was similar, the minerals present in the soil, the soil type (sandy, clay) and watercourses nearby properties differ, which can influence the development of *P. lutzii* saprobe phase, as described by Conti-Diaz [4].

Specific antibodies against *P. lutzii* were detected in our study such in animals from the rural area (horses and wild mammals) as well as from urban animals (domestic canines in the cities of Pelotas and Capão do Leão) from distinct mesoregions of Rio Grande do Sul, Brazil. These data contribute to a better understanding of the ecology of this new fungal species that causes PCM, suggesting that it is not restricted to specific regions of the country as previously contemplated [8]. Our study opens perspectives regarding a more specific evaluation of these soil contaminated environments supposedly trying to detect characteristics that promote or inhibit the development of fungus on your saprobe state.

**Acknowledgements:**

We thanks to Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), and Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

**Conflict of interest:**

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

- [1] Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Tratado de Micologia Médica Lacaz. Sarvier, São Paulo, Brasil, 2002:9-18.
- [2] Shikanai-Yasuda MA, Telles-Filho Q, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. Guidelines in paracoccidioidomycosis. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2006;39:297-310.
- [3] Teixeira MM, Theodoro RC, Oliveira FFM, *et al.* *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. Med. Mycol. 2013;52:19-28.
- [4] Conti-diaz, IA. On the unknown ecological niche of *Paracoccidioides brasiliensis*: our hypothesis of 1989: present status and perspectives. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 2007;49:131-134.
- [5] Bagagli E, Franco M, Bosco SMG. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillo (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. Med. Mycol. 2003;41:217-233.
- [6] Theodoro RC, Teixeira MDM, Felipe MSS, Paduan KDS, Ribolla PM. Genus *Paracoccidioides*: Species Recognition and Biogeographic Aspects. PLoS ONE. 2012; doi: 10.1371/journal.pone.0037694.
- [7] San-blas G, Nino-Vega G, Iturriaga T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: Molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. Med. Mycol. 2002;40:225-242.
- [8] Teixeira MM, Theodoro RC, Carvalho MJA. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. Mol. Phylog. Evol. 2009;52:273-283.
- [9] Arantes TD, Theodoro RC, Macoris SAG, Bagagli E. Detection of *Paracoccidioides* spp. in environmental aerosol samples. Med. Mycol. 2013;51:83-92.
- [10] Salgado-Salazar C, Jones LR, Restrepo A, Mcewen JG. The human fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: phylogenetic evidence from five mitochondrial markers. Cladistics. 2010;26:613-624.
- [11] Muñoz JF, Farrer RA, Desjardins CA *et al.* Genome Diversity, Recombination, and Virulence across the Major Lineages of *Paracoccidioides*. *MSphere*. 2016; 1(5):1-18.
- [12] Teixeira MM, Theodoro RC, Nino-Vega G, Bagagli E, Felipe MSS. *Paracoccidioides* Species Complex: Ecology, Phylogeny, Sexual Reproduction, and Virulence. PLoS Pathogens. 2014; doi:10.1371/journal.ppat.1004397.

- [13] Roberto TN, Rodriguez AM, Hahn RC, Camargo ZP. Identifying *Paracoccidioides* phylogenetic species by PCR-RFLP of the alpha-tubulin gene. *Medical Mycology*. 2016;54:240–247.
- [14] Londero AT, Ramos CD, Lopes JOS. Progressive pulmonar paracoccidioidomycosis a study of 34 cases observed in Rio Grande do Sul (Brazil). *Mycopathologia*. 1978;63:53-56.
- [15] Verli FD, Marinho SA, Souza SC, Zancanaro MA, Yurgel LS. Clinical-epidemiologic profile of paracoccidioidomycosis at the Stomatology Department of São Lucas Hospital, Pontificia Universidade Católica of Rio Grande do Sul. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2005;38:234-247.
- [16] Albano APN, Klafke GB, Brandolt TM, *et al.* Wild Animals as Sentinels of *Paracoccidioides brasiliensis* in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathologia*. 2014;15:177-184.
- [17] Albano APN, Klafke GB, Brandolt TM, *et al.* Seroepidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in horses from Rio Grande do Sul, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 2015;46:513-527.
- [18] Fundação de Economia e Estatística (FEE). [<http://www.fee.rs.gov.br/>]. Rio Grande do Sul, Brasil. Disponível em: [http://www.fee.rs.gov.br/feedados/consulta/unidades\\_geo.asp](http://www.fee.rs.gov.br/feedados/consulta/unidades_geo.asp). Acesso em julho de 2015.
- [19] Dados oficiais sobre temperaturas e pluviosidade do Centro de Pesquisas e Previsões Meteorológicas da Universidade Federal de Pelotas (CPPMet- UFPel, 2015).
- [20] Rosa, M. Geografia de Pelotas. Ed. UFPEL, Pelotas, Brasil, 1985:11-20.
- [21] Camargo ZP, Berzaghi R, Amaral CC, Silva SH. Simplified method for producing *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for use in immunodiffusion tests. *Med Mycol.* 2003;41: 539–542.
- [22] Camargo ZP, Tabora CP, Rodrigues EG, Travassos LR. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. *J Med Vet Mycol.* 1991;29: 31–38.
- [23] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72: 248–254.
- [24] Gegembauer G, Araujo LM, Pereira EF, *et al.* Serology of Paracoccidioidomycosis Due to *Paracoccidioides lutzii*. *PLoS Neg. Trop. Diseases.* 2014; doi: 10.1371/journal.pntd.0002986.
- [25] Teles AJ, Klafke GB, Cabana AL, Albano APN, Xavier MO, Meireles MCA. Serological Investigation of *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Dogs from Southern Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathologia.* 2015; 183(3-4):323-328.

- [26] Ono MA, Bracarense APFRL, Morais HSA, Trapp SM, Belitardo DR, Camargo ZP. Canine paracoccidioidomycosis: A seroepidemiologic study. *Med. Mycol.* 2001; 39:277-282.
- [27] Ono MA, Kishima MO, Itano EM, Bracarense APFRL, Camargo ZP. Experimental paracoccidioidomycosis in dogs. *Med. Mycol.* 2003;41: 265-268.
- [28] Corte AC, Itano EN, Freire RL, Camargo ZP, Ono MA. Detection of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in horses from northern Region of Paraná State. *Semina. Ciênc. Agrárias.* 2009;30:441-446.
- [29] Hahn RC, Rodrigues AM, Fontes CJF, *et al.* Case Report: Fatal Fungemia due to *Paracoccidioides lutzii*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2014;91:394-398.
- [30] Marques-da-Silva SH, Rodrigues AM, De Hoog GS, Silveira-Gomes F, Camargo ZP. Occurrence of *Paracoccidioides lutzii* in the Amazon region: description of two cases. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;4:710-714.
- [31] Terçarioli GR, Bagagli E, Reis GM. Ecological Study of *Paracoccidioides brasiliensis* in Soil: Growth Ability, Conidia Production and Molecular Detection. *BMC Microbiol.* 2007;92:1-8.

Table 1: Seropositivity for IgG anti- *P. brasiliensis* and *P. lutzii* in sera from the horses, dogs and wild mammals from Rio Grande do Sul, Brazil, using ELISA

<b>Animal (n)</b>	<b>Seropositive only <i>P. brasiliensis</i>/n (%)</b>	<b>Seropositive for both fungal species /n (%)</b>	<b>Seropositive only <i>P.</i> <i>lutzii</i>/n (%)</b>
<b>Horses (200)</b>	9 (4.5)	15 (7.5)	11 (5.5)
<b>Domestic dogs (196)</b>	36(18.4)	22 (11.2)	30 (15.3)
<b>Wild mammals (85)</b>	9 (10.6)	17 (20)	10 (11.8)
<b>Total (481)</b>	<b>54 (11.23)</b>	<b>54 (11.23)</b>	<b>51 (10.6)</b>

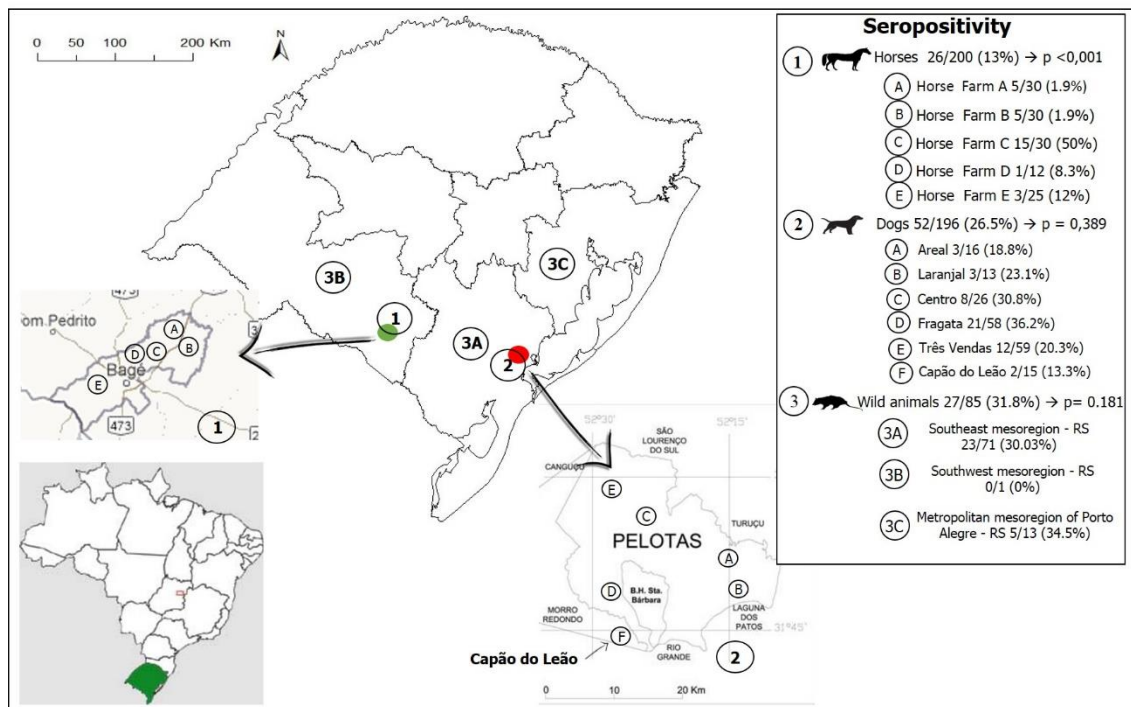


Figure 1: Seropositivity in the ELISA test for IgG anti-*P. lutzii* in animals from RS, Brazil, according to their origin

### 3.2 Artigo 2

#### ***Paracoccidioides* spp. in soil from the Pampa Biome on Southern Brazil**

Josiara Furtado Mendes, Andrea Von Groll, Vanice Rodrigues Poester, Carolina Litchina Brasil, Tchana Martinez Brandolt, Gabriel Baracy Klafke, Anderson Messias Rodrigues, Paula Portella Della Terra, Zoilo Pires de Camargo, Carlos Eduardo Wayne Nogueira, Mário Carlos Araújo Meireles, Melissa Orzechowski Xavier

Será submetido a revista Medical Mycology



***Paracoccidioides* spp. in soil from the Pampa Biome on Southern Brazil**

***Paracoccidioides* spp. at Pampa Biome**

Josiara Furtado Mendes<sup>1</sup>, Andrea Von Groll<sup>2</sup>, Vanice Rodrigues Poester<sup>2,3</sup>, Carolina Litchina Brasil<sup>4</sup>, Tchana Martinez Brandolt<sup>2,3</sup>, Gabriel Baracy Klafke<sup>3</sup>, Anderson Messias Rodrigues<sup>5</sup>, Paula Portella Della Terra<sup>5</sup>, Zoilo Pires de Camargo<sup>5</sup>, Carlos Eduardo Wayne Nogueira<sup>1</sup>, Mário Carlos Araújo Meireles<sup>1</sup>, \*Melissa Orzechowski Xavier<sup>2,3,4</sup>

<sup>1</sup> Post-Graduation Program in Veterinary, Federal University of Pelotas (UFPel), RS, Brazil; <sup>2</sup> Post-Graduation Program in Health Science, Federal University of Rio Grande (FURG), Rio Grande, Brazil. <sup>3</sup> Micology Lab of Medicine Faculty (FAMED-FURG), Rio Grande, Brazil; <sup>4</sup> Post-Graduation Program in Parasitology UFPel, RS, Brazil; <sup>5</sup> Cell Biology Division, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of São Paulo (UNIFESP) São Paulo, Brazil

\* Correspondence to: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Melissa Orzechowski Xavier (Mycology Lab, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande, Health Campus) Visconde de Paranaguá 102, Centro. CEP.: 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil. Tel: (+55) 53-32374636/ 4634; E-mail: [melissaxavierfurg@gmail.com](mailto:melissaxavierfurg@gmail.com)

**Keywords:** Paracoccidioidomycosis, Nested-PCR, ambiental samples, Rio Grande do Sul

**Abstract**

High rates of paracoccidioidomycosis (PCM) disease and infection has been described in South Rio Grande do Sul, Brazil, in the last years. However, data concerning the ecoepidemiology of *Paracoccidioides* spp. in the region are scarce in the literature. Thus, this study aimed to evaluate the presence of *Paracoccidioides* spp. DNA in soil samples from a rural area on South Rio Grande do Sul, Brazil. Thirty pool of soil samples from between geographic coordinates 31°19'53"S and 54°06'25"W were submitted to physicochemical analysis, and to fungal DNA extraction by Norgen Biotek<sup>®</sup> Kit (Canada), followed by Nested-PCR technique with ITS4 and ITS5 as external primers, and PBITS-E and PBITS-T as internal primers. DNA amplification product of about 424 bp compatible with *Paracoccidioides* spp. were detected in ten (33.33%) of the 30 pool of samples. Positive soils were characterized by high humidity with an average of 31.46%, ranging from 21.12 to 52.72%. This study shows for the first time the presence of *Paracoccidioides* spp. DNA at soils from the Brazilian Pampa Biome.

## Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM) is an 8<sup>th</sup> cause of mortality among infectious and parasitic diseases, being one of the most important systemic mycoses in the Brazil. It occurs in several Latin American countries, mainly Brazil, Venezuela and Colombia, and is caused by the thermodynamorphic fungi of the genus *Paracoccidioides*<sup>1</sup>.

It is estimated that 10 million of Latin Americans have already been infected by PCM agents, and that 50% of rural workers have already been exposed to these agents, of which 1-2% have some of the clinical forms of the disease. The annual incidence of PCM ranges from 1 to 3.7 new cases per 100.000 inhabitants, accounting for 1.65 deaths/million in Brazil<sup>2,3,4</sup>. According to a recent study carried out in Brazil, 7.99/1000 inhabitants are hospitalized with a suspicion of PCM per year, which is higher than rates from other important systemic mycoses such as coccidioidomycosis (7.12/1000inh.) and histoplasmosis (2.19/1000inh.)<sup>5</sup>.

PCM has been described since 1942 in Rio Grande do Sul (RS)<sup>6,7,8</sup>, however there are few studies on the distribution of the disease and on the ecology of its etiological agents in this region of southern Brazil. In fact, only less than ten years ago, it was possible to show in the literature that PCM has a high prevalence also in the cities of the extreme south of the state<sup>9</sup>, with about 100 cases diagnosed only in the last two decades of the study. Even today, the great majority of the studies on PCM in RS are restricted to the northern half of the state, more frequently in the metropolitan region of Porto Alegre<sup>10,11</sup>. Studies that cover other areas of RS, such as the Pampa Biome, are still scarce. The Pampa Biome in Brazil is restricted to Rio Grande do Sul, occupying an area of 176,496 km<sup>2</sup><sup>12</sup>, which corresponds to 63% of the RS and 2.07% of the national territory<sup>13</sup>.

Although RS was considered an endemic region of PCM in humans for several decades, data on the ecoepidemiology of fungi of the genus *Paracoccidioides* are scarce, especially in the south region of the state<sup>10,11</sup>. Ecoepidemiological studies are therefore essential for a better understanding of the importance of this mycosis in Pampa Biome in RS, whose prevalence is probably underestimated, since its high frequency has recently been proven in the region<sup>9,14,15,16,17</sup>. Elucidating data on PCM agents in this Biome will help to understand their ecology as a whole, making this neglected disease even more visible in the region and indirectly in the Brazil. Therefore, the objective of this study was to evaluate the presence of DNA of *Paracoccidioides* spp. in soil samples from a municipality of Pampa Biome in RS, and relate it to physicochemical parameters of soils.

## Material and Methods

### Samples and Study Location

The study included three horse farms from the city of Bagé, RS, in which there were animals seropositive for anti-*Paracoccidioides* antibodies detected in previous studies<sup>14,15,16,17</sup>. The city of Bagé is located in the southwestern mesoregion of Rio Grande do Sul, between geographic coordinates 31°19'53"S and 54°06'25"W. It is part of the Brazilian Pampa Biome (Figure 1), and is at an average height of 212 m. It has a subtropical temperate climate, warm summers (ie high temperatures during the day and moderate at night), and fairly rigorous winters with frost occurrence. The average annual temperature is 18°C and monthly temperatures range from close to zero in the winter to 26°C in the summer. Precipitation is generally evenly distributed throughout the year, and the mean annual volume is 1,472 mm, with monthly averages varying from 104 mm to 142 mm<sup>18</sup>.

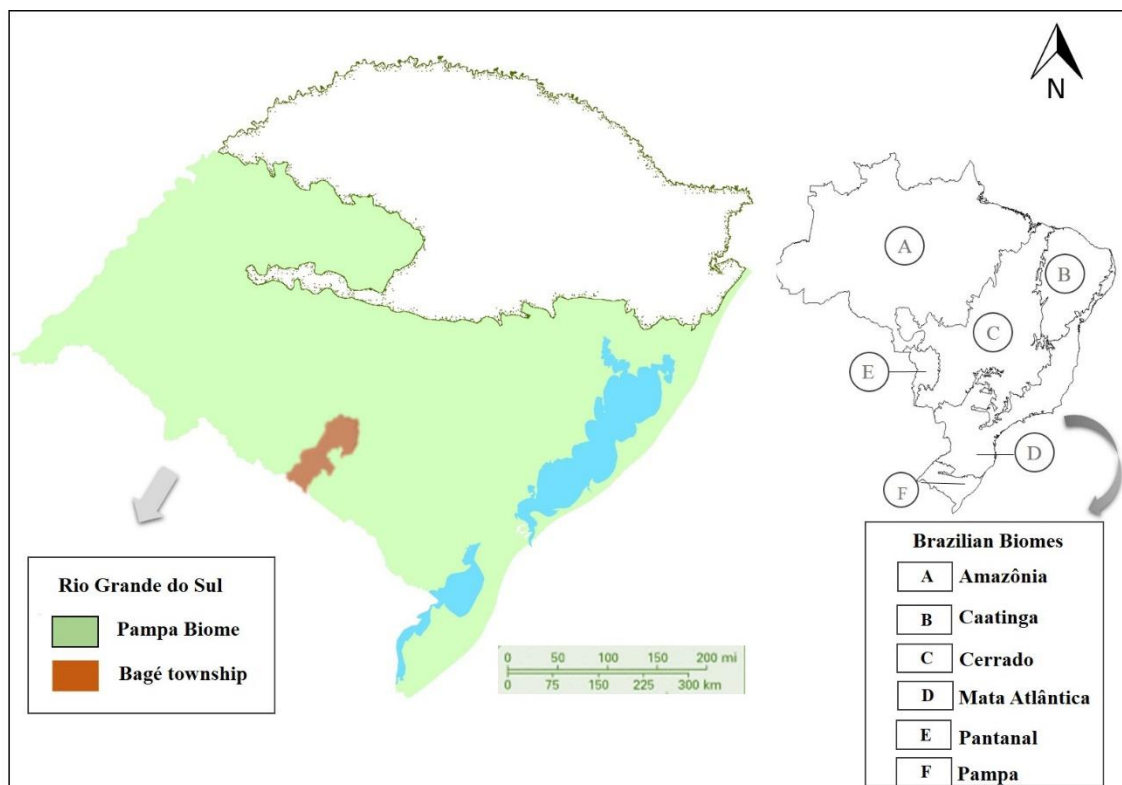


Figure 1: Distribution of Biomes in Brazil, with emphasis on the Pampa Biome, restricted to the southern region of RS; and geographic location of the collection site (city of Bagé, South Rio Grande do Sul, Brazil) at Pampa Biome.

The soil collection points were defined with the aid of GPS (Global Position Satellite), to cover the entire area previously determined. Ten pools of soil samples (300 g each) were collected from each herds (n = 3), being each pool correspondent to 20 sites of collections, totalizing 30 pools of soil samples, referring to 600 collection points. The soil samples collected were located between the geographic coordinates: S 31° 47' 909''/W 052° 04' 151" and S 31° 32' 126''/ W 054° 10' 258" and with a mean distance of ~2.5m (varying from 0.5 to 5m) of water courses. The samples were collected after an intense period of rainfall, and on days with average temperatures ranging from 10°C to 18°C. The soils included in this study had natural vegetation cover and/or sowing (pasture) and wetlands, with dams and small water courses.

Samples were collected in sterile flasks with the aid of a tread, at a depth of 10 cm, according to the soil collection protocol<sup>19</sup>, and stored at room temperature. Then were sent to the Mycology Laboratory of the Medicine Faculty from Federal University of Rio Grande for molecular biology tests, and to the Soil Analysis Laboratory of the Faculty of Agronomy from the Federal University of Pelotas for analysis of the physical (moisture and soil type) and chemical aspects (pH, organic matter, exchangeable aluminum, base saturation) respecting the internal protocol of the laboratory.

### **Detection of fungal DNA in soil samples**

Fungal DNA was extracted from soil samples using a DNA extraction Kit (Norgen Biotek Corp<sup>®</sup>; Canada), following the manufacturer's instructions. DNA was quantified by spectrophotometer measures NanoVue<sup>TM</sup> and confirmed in 0.8% agarose gel. Molecular detection of *Paracoccidioides* spp. DNA was performed by Nested PCR technique, and then, positive samples were submitted to an analysis by Touchdown PCR for gp43.

Nested-PCR were performed using the panfungal primers ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') and ITS5 (5' GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G 3') as external primers and PBITS-E (5' GAG CTT TGA CGT AGA CC 3') and PBITS-T (5' GTA TCC CTA CCT GAT CCG AG 3')<sup>20,21</sup> as internal primers. The reactions were 25µL of the reaction mixture: 18.05 µL ultrapure water, 2.5 µL of 10x buffer, 0,75 µL de Mg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50mM), 0.5 µL of each primer, 0.5 µL of DNTP (10mM) and 0.2 µL of Platinum Taq polymerase (Invitrogen<sup>®</sup>) plus 2 µL of extracted DNA. Amplification was performed in the thermal cycler Eppendorf<sup>®</sup>. The heat cycle for ITS4/ITS5 was an initial cycle at 94°C /5 minutes, followed by 25 cycles at

94°C/1 minute, 60°C/2 minutes and 72°C/2 minutes, and a final cycle at 72°C/7 minutes. For PBITS-E/PBITS-T internal primers the conditions were similar, except for the annealing temperature which was 62°C. The DNA analysis by electrophoresis was performed on a 1.5% agarose gel with a 100 bp marker (Invitrogen®) and visualized on a UV light transilluminator. As positive and negative control, DNA from a clinical isolate of *Paracoccidioides brasiliensis* and DNA from a clinical isolate of *Sporothrix brasiliensis*, respectively, were used.

All positive samples in Nested PCR technique were submitted to specific PCR by Cycle Touchdown using primers gp43 and gp43 R. The reactions were carried out in 25 µL of the reaction mixture: 12.5 µL of PCR buffer, 9.5 µL of ultrapure water, 1.0 of each primer plus 1.0 µL of the fungal DNA to be tested. The thermal cycle was an initial cycle of 95°C for 4 minutes, followed by a cycle of 94°C/1 minute, after 35 cycles of 60°C/1 minute, plus a cycle of 72°C/1 minute and finally a cycle of 72°C/10 minutes. The DNA analysis by electrophoresis was performed on 1.2% agarose gel with 100 bp and 50 bp markers visualized in UV light transilluminator.

### **Data analyses**

Descriptive data analysis and Chi-square test were performed to compare the results between the different farms/herds. Student's t-test for independent samples was used to evaluate the relationship of the physical and chemical parameters of the soils with the presence or absence of *Paracoccidioides* spp. DNA. Statistical analyzes were performed from the SPSS® 20.0 program considering the significance index  $p < 0,05$ .

### **Results**

DNA amplification product of about 424 bp compatible with *Paracoccidioides* spp. were detected in ten (33.33%) of the 30 pool of soil samples processed by Nested-PCR technique (Figure 2), being two (20%) from horse farm 1, six (60%) from horse farm 2 and two (20%) from horse farm 3 ( $p=0.09$ ). Using the specific PCR technique, only two from those 10 samples (20%) were positive, one in horse farm 1 and one in horse farm 2.

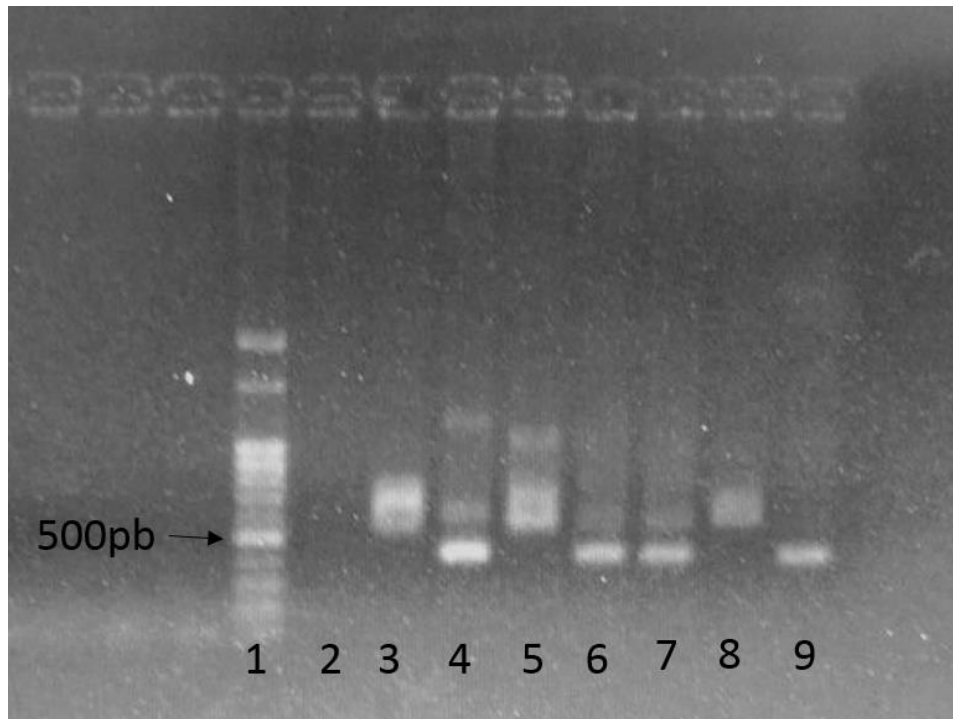


Figure 2: Nested-PCR results of five soil samples: (1: 100bp marker; 2: white; 3: negative control; 4: positive control; 5 and 8: negative samples; 6,7 and 9: positive samples for *Paracoccidioides* spp. with approximately 424 bp).

Soil samples evaluated (n = 30 pools) were characterized by clay texture, with averages of 21.73% of clay (SD  $\pm$  4.66). The mean values of humidity was 31.46%, ranging from 21.12 to 52.72% (SD  $\pm$  7.87); of organic matter was 2.98% (SD  $\pm$  0.59); of base saturation was 66.33% (SD  $\pm$  10.47) and of pH was 5.26 (SD  $\pm$  0.32). Exchangeable aluminum ( $H^+$  Al) presented an average of 4.43 cmol/dm<sup>3</sup> (SD  $\pm$  0.89). Significant difference in these physical and chemical parameters of the evaluated soils for the detection of *Paracoccidioides* spp. were not found (p > 0.05) (Table 1).

Table 1: Physical and chemical parameters of the negative (n = 20) and positive (n = 10) pool of soil samples in the Nested PCR technique for detection *Paracoccidioides* spp. DNA

PARAMETER	SAMPLES	N	MINIMUM	MAXIMUM	AVERAGE	SD	p*
Humidity (%)	<b>Negative</b>	20	21.12	50.62	30.46	7.79	0.87
	<b>Positive</b>	10	23.28	57.72	33.46	8.03	
pH	<b>Negative</b>	20	4.9	7.2	5.24	0.30	0.45
	<b>Positive</b>	10	4.8	5.9	5.28	0.36	
H <sup>+</sup> Al <sup>-</sup> (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	<b>Negative</b>	20	2.8	6.2	4.52	0.75	0.18
	<b>Positive</b>	10	2.5	6.2	4.25	1.14	
Organic matter (%)	<b>Negative</b>	20	1.79	4.83	2.88	0.65	0.34
	<b>Positive</b>	10	2.9	3.59	3.17	0.40	
Basis Saturation (%)	<b>Negative</b>	20	53	89	64.90	10.45	0.95
	<b>Positive</b>	10	53	86	69.20	10.43	

SD: standard deviation; \* Values obtained by T-Student test, considering significance  $p < 0.05$ .

## Discussion

This study proves for the first time the presence of DNA of *Paracoccidioides* spp. in soil of Rio Grande do Sul, Brazil. Considering the estimate that 50% of the rural inhabitants of endemic areas have already been exposed to PCM agents<sup>2</sup>, this finding becomes extremely relevant as approximately 1.6 million RS inhabitants live and work in the rural area of the state. In the Pampa Biome, 46% of these inhabitants work with livestock and 30% with family farming, and due to these activities they can be included in the risk group for PCM, since they act directly with the soil<sup>2,13</sup>.

Regions considered reservoirs of *Paracoccidioides* spp. correspond to sites of high rainfall (1300-2000 mm) and mild temperatures (10-25°C)<sup>10</sup>, with moist soils and proximity to water courses, low levels of exchangeable aluminum (H<sup>+</sup> Al<sup>-</sup>) and low base saturation<sup>21,22,23</sup>. The physical and chemical profiles found in the soils evaluated in this study favored the presence of *Paracoccidioides* spp. according to the parameters described by other authors<sup>10,21,22,23</sup>. Homogeneity among the samples was detected in the evaluated parameters, with no significant difference between the positive and negative soils for the presence of *Paracoccidioides* spp., probably because they came from horse farms, where the soil is constantly managed in order to



obtain the best development of the pastures with the use of acidity correction and fertilization. In fact, all the samples evaluated were within the limits described as ideas for fertile soils<sup>24</sup>, presenting a clayey type and humidity and organic matter rates favorable to fungal growth<sup>21</sup>.

Nowadays, molecular techniques have become important tools in detecting the presence of infectious-parasitic agents in the environment, especially through the proposed amplification of ribosomal DNA. With it uses, it became possible to detect and identify difficult-to-grow microorganisms from different origins of which include samples from the environment<sup>25</sup>, allowing the expansion of knowledge and the mapping of areas at risk of infection. The Nested-PCR technique proved to be effective for the detection of *Paracoccidioides* spp. in soil samples, as previously described<sup>20,21,23</sup>. On the other hand, specific genomic PCR, which has been used to identify fungal isolates from cultures<sup>26</sup>, has revealed low sensitivity to soil samples, detecting only 20% (2/10) of the positive samples in Nested-PCR, possibly due to the small amount of fungal propagules contained in environmental samples.

The positivity of more than 30% of the soil samples from the present study, shows that *Paracoccidioides* spp. is present in the Pampa Biome despite the low temperatures that winter can present, even in the presence of frost. It corroborates with other authors<sup>23,27</sup> which describe that the geographical distribution of *Paracoccidioides* spp. has been expanding in Brazil, and that species of the genus *Paracoccidioides* are not restricted to certain regions as previously believed; and may even be distributed throughout the national territory.

#### **Acknowledgements:**

We thanks to Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), Laboratory of Cellular and Molecular Immunology of UNICAMP and Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

#### **Conflict of interest:**

The authors declare no conflict of interest.

## References

- [1] Theodoro RC, Teixeira MDM, Felipe MSS, Paduan KDS, Ribolla PM. Genus *Paracoccidioides*: Species Recognition and Biogeographic Aspects. *PLoS ONE*. 2012; 07 (5): 1-15.
- [2] Shikanai-Yasuda MA, Telles-Filho Q, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. Guidelines in paracoccidioidomycosis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2006; 39 (3): 297-310.
- [3] Queiroz-Telles F, Fahal AH, Falci DR, Caceres DH, Chiller T, Psqualoto AC. Neglected endemic mycoses. *Lancet Infect Diseases*. 2017; 1-11, [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30306-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30306-7)
- [4] LIFE. Leading International Fungal Education. Available in <http://www.life-worldwide.org/> Acess aug 2017.
- [5] Giacomazzi J, Baethgen L, Carneiro LC, Millington MC, Denning DW, Colombo AL, Pasqualotto AC. The burden of serious human fungal infections in Brazil. *Mycoses*. 2016; 59 (3):145–150.
- [6] Campos EC. Sobre dois casos de granuloma paracoccidióidico no Rio Grande do Sul. *Arq DES Rio Grande do Sul*. 1942; 16 (3) :71-77.
- [7] Clausell DT. Estudo micológico e experimental em três casos de granuloma paracoccidióidico. *Arq DES Rio Grande do Sul*. 1942; 16 (3): 81–98.
- [8] Medina H. Lesões histopatológicas em três casos de granuloma paracoccidióidico. *Arq DES Rio Grande do Sul*. 1942; 16 (3): 99–104.
- [9] Souza SP, Jorge VM, Xavier MO. Paracoccidioidomycosis in southern Rio Grande do Sul: A retrospective study of histopathologically diagnosed cases. *Braz J Microbiol*. 2014; 45 (1): 243-247.
- [10] Londero AT, Ramos CD. Paracoccidioidomicose. Estudo clínico e micológico de 260 casos observados no interior do Estado do Rio Grande do Sul. *J Pneum*. 1990; 16 (4): 129-132.
- [11] Santos VM. Comportamento em cultura e diagnóstico morfológico da *Emmonsia crescens* em tatus. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999; 32 (3): 307.
- [12] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Mapa de Biomas e de Vegetação. 2004. Available in <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomas.shtm> Acess aug 2017.

- [13] BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Biomas. Pampa. Available in <<http://www.mma.gov.br/biomas/pampa>> Access oct 2017.
- [14] Albano APN, Klafke GB, Brandolt TM, Da Hora VP, Minello LF, Camargo ZP, Xavier MO, Meireles MCA. Wild Animals as Sentinels of *Paracoccidioides brasiliensis* in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathologia*. 2014; 207 (3-4): 177-184.
- [15] Albano NA, Klafke GB, Brandolt TM, Da Hora VP, Nogueira CEW, Xavier MO, Meireles MCA. Seroepidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in horses from Rio Grande do Sul, Brazil. *Braz J Microbiol*. 2015; 46 (2): 513-517.
- [16] Teles AJ, Klafke GB, Cabana AL, Albano APN, Xavier MO, Meireles MCA. Serological Investigation of *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Dogs from Southern Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathologia*. 2015; 183 (3-4): 323-328.
- [17] Mendes JF, Klafke GB, Albano APN, Cabana ÂL, Teles AJ, de Camargo ZP, Xavier MO, Meireles MCA. Paracoccidioidomycosis infection in domestic and wild mammals by *Paracoccidioides lutzii*. *Mycoses*. 2017; 60 (6): 402-406.
- [18] Fundação de Economia e Estatística (FEE). Available in <[http://www.fee.rs.gov.br/feedados/consulta/unidades\\_geo.asp](http://www.fee.rs.gov.br/feedados/consulta/unidades_geo.asp)>. Access oct 2017.
- [19] Instituto Agrônomo de São Paulo – IAC. Como retirar amostras de solo. Available in <<http://www.iac.sp.gov.br/produtoseservicos/analisedosolo/retiraramostrasolo.php>> Access nov 2017.
- [20] Theodoro R, Candeias JM, Araújo JP Jr, Bosco S de M, Macoris SA, Padula LO, Franco M, Bagagli E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. *Med mycology*. 2005; 43 (8): 725-729.
- [21] Terçarioli GR, Bagagli E, Reis GM, Theodoro RC, Bosco Sde M, Macoris AS, Richini-Pereira VB. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiol*. 2007. 22 (7): 92.
- [22] Bagagli E, Franco M, Bosco SMG. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillo (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. *Med. Mycol*. 2003; 41(3): 217-233.
- [23] Arantes TD, Theodoro RC, Teixeira MDM, Bosco SDMG, Bagagli E. Environmental Mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil Reveals New Clues into Genetic Diversity, Biogeography and Wild Host Association. *PLoS Negl Trop*. 2016. 10 (4): 1-18.

- [24] Alvarez V VH, Novais RF, Barros NF, Cantarutti RB, Lopes AS. Interpretação dos resultados das análises de solos. In: Ribeiro AC, Guimaraes PTG, Alvarez VV. H. (Ed. Aproximação). Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais. 5th edn. Viçosa, Minas Gerais, 1999: 25- 32.
- [25] Borneman J, Hartin RJ. PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. *Appl Envir Microbiol.* 2000; 66 (10): 4356-4360.
- [26] Gomes GM, Cisalpino OS, Taborda CP, De Camargo ZP. PCR for Diagnosis of Paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 2000; 38 (9): 3478–3480.
- [27] Roberto TN, Rodrigues AM, Hahn RC, de Camargo ZP. Identifying Paracoccidioides phylogenetic species by PCR-RFLP of the alpha-tubulin gene. *Med Mycol.* 2016; 54 (3): 240-247.

### 3.3 Artigo 3

#### ***Paracoccidioides* spp. in soil from an urban area of the southern Brazil**

Josiara Furtado Mendes, Vanice Rodrigues Poester, Andrea Von Groll, Anderson Messias Rodrigues, Paula Portella Della Terra, Zoilo Pires de Camargo, Mário Carlos Araújo Meireles, Melissa Orzechowski Xavier

Será submetido à revista Mycoses

***Paracoccidioides* spp. in soil from an urban area of the southern Brazil**

Josiara Furtado Mendes<sup>1</sup>, Vanice Rodrigues Poester<sup>2,3</sup>, Andrea Von Groll<sup>2</sup>; Anderson Messias Rodrigues<sup>4</sup>, Paula Portella Della Terra<sup>4</sup>, Zoilo Pires de Camargo<sup>4</sup>, Mário Carlos Araújo Meireles<sup>1</sup>; Melissa Orzechowski Xavier<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Post-Graduation Program in Veterinary, Federal University of Pelotas (UFPel), RS, Brazil.

<sup>2</sup>Post-Graduation Program in Health Science, Federal University of Rio Grande (FURG), Rio Grande, Brazil.

<sup>3</sup> Micology Lab of Medicine Faculty (FAMED-FURG), Rio Grande, Brazil;

<sup>4</sup> Cell Biology Division, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of São Paulo (UNIFESP) São Paulo, Brazil

**Short title:** *Paracoccidioides* spp. in urban soil from Brazil

**Keywords:** Paracoccidioidomycosis, PCR, Nested-PCR, Rio Grande do Sul

\* Correspondence to: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Melissa Orzechowski Xavier (Mycology Lab, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande, Health Campus) Visconde de Paranaguá 102, Centro. CEP.: 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil. Tel: (+55) 53-32374636/ 4634; E-mail: [melissaxavierfurg@gmail.com](mailto:melissaxavierfurg@gmail.com)

## SUMMARY

In recent years, a study described almost 100 cases of paracoccidioidomycosis (PCM) diagnosed in southern Brazil, corroborating with data that *Paracoccidioides* spp. has been expanding its endemic areas. This study aimed to report the DNA detection of *Paracoccidioides* spp. in soil samples from an urban area of Rio Grande, a city from Rio Grande do Sul, Southern Brazil. DNA amplification product of about 424 bp, compatible with *Paracoccidioides* spp., was found in nine (56.2%) of the 16 soil samples evaluated by Nested-PCR. This high rate of *Paracoccidioides* spp. DNA detection in urban soils from a city of Southern Brazil shows that the population are commonly expose to the fungus and then, that health professionals needs to be aware about PCM, which may have been underestimated in region.

## INTRODUCTION

Considered the second most common endemic mycosis in Latin America, Paracoccidioidomycosis (PCM), a granulomatous systemic disease, is caused by thermodynamophilic fungi of the genus *Paracoccidioides*. PCM has a major impact on the public health of countries where it occurs [1-3]. It is estimated that ten million Latin Americans people are infected, of which 1-2% will develop PCM. Brazil is responsible for 80% of PCM cases, and despite the diagnostic challenges, the disease is responsible for a hospitalization rate of 7.99 / 1000 inhabitants in the country [1,3].

Studies have shown that areas of endemicity of PCM has been expanded, as well as that distinct species of *Paracoccidioides* do not have a restricted geographical distribution than previously described [4-6]. In addition, PCM cases are no longer restricted to rural workers and are also being described in urban patients without any involvement with agricultural activities [7-9], including in HIV patients [9,10].

Serological epidemiological surveys support this hypothesis that the fungus is no longer restricted to the rural zone due to factors such as increased urbanization, demographic growth and deforestation of forests [5,9,11]. Given that Rio Grande do Sul (RS) is described as an endemic area for PCM, and that serological studies with animals had suggest the presence of *P. brasiliensis* and *P. lutzii* in both rural and urban areas of the state [12-16], the aim of this study was to evaluate the presence of *Paracoccidioides* spp. DNA in soil samples from an urban area of a city in RS, southern Brazil.

## MATERIAL AND METHODS

### Samples and Study Location

Soil samples were collected in Rio Grande city, which is located on the coast of south Rio Grande do Sul, southern Brazil. It has 2,709,522 km<sup>2</sup> of extension at the geographical coordinates: Latitude: 32° 1 '60' 'South, Longitude: 52° 5' 55 " West. The climate is humid subtropical, with warm summers and winters with frost. Average annual temperature is 18.2°C, ranging from temperatures close to zero in winter and 36°C in summer. Air relative humidity is of about 80%; rainfall is abundant throughout the year, with an annual average of 1,379mm and may suffer direct influences of El Nino and La Nina phenomena [17].

Samples were collected systematically, being obtained from the delimitation of an area of approximately 2m<sup>2</sup>, with subsequent determination of a predetermined rectangular square, where the four corners and the center were sampled, as described by Moura et al. [19]. Sixteen samples, in the volume of 50-100 grams of soil, were collected in 12 different districts of the



city. The collection was performed by scraping the soil with the aid of sterile spatulas. Samples were stored in sterile bottles and kept at room temperature in the Laboratory of Mycology of FaMed-FURG until its processing.

### **Detection of fungal DNA in soil samples by Nested PCR**

Extraction of fungal DNA from soil samples was performed using the DNA extraction Norgen Biotek Corp<sup>®</sup> (Canadá), following the manufacturer's instructions. After extraction DNA samples were quantified by spectrophotometer NanoVue<sup>™</sup> and confirmed in 0.8% agarose gel. The molecular detection was performed by Nested-PCR technique using the panfungal primers ITS4 and ITS5 as external primers, and PBITS-E and PBITS-T as internal primers [20, 21]. The reactions were performed in 25 µL of the reaction mixture: 18.05 µL of ultrapure water, 2.5 µL of 10x buffer, 0.75 µL of Mg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mM), 0.5 µL of each primer ITS 4 and IT5, 0.5 µL of DNTP (10 mM) and 0.2 µL of Platinum Taq polymerase (Invitrogen<sup>®</sup>) plus 2 µL of extracted DNA. Amplification was performed in the thermal cycler Eppendorf<sup>®</sup>. The thermal cycle for ITS4/ITS5 was an initial cycle at 94°C/5 minutes, followed by 25 cycles at 94°C/1 minute, 60°C/2 minutes and 72°C/2 minutes, and a final cycle at 72°C/7 minutes. For PBITS-E / PBITS-T internal primers the conditions were similar, except for the annealing temperature which was 62°C. Results were analyzed by electrophoresis on a 1.5% agarose gel with 100 bp marker (Ladder<sup>®</sup>) with an UV light transilluminator. As positive and negative controls, DNA of a clinical isolate of *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) and DNA of a *Sporothrix* sp., respectively, were used. A descriptive analysis of the data was performed using SPSS<sup>®</sup> 20.0 software.

## **RESULTS**

A DNA product of approximately 424pb, compatible with *Paracoccidioides* spp. DNA, was visualized in nine of the 16 samples analyzed, corresponding to 56.3% of positive samples (Figure 1). These nine positive soil samples were from seven of the 12 neighborhoods evaluated (Figure 2).

## **DISCUSSION**

This study represents the first DNA detection of *Paracoccidioides* spp. in soil of urban area in the extreme south of Brazil, corroborating with a study of seroepidemiological investigation conducted by Teles et al. [15] who demonstrated a high rate of PCM infection in

strictly urban dogs of this South region of the RS, Brazil. The high positivity rate in the soil samples found and its wide distribution in the municipality suggests that the local population is exposed to *Paracoccidioides* spp. and consequently at risk of infection. In fact, more than 100 cases of PCM have been described in this region of the southern extreme of the country in a study by Souza et al. [12], being the great majority in the last two decades.

Rains are well distributed over the year in the region of the study, and often it is influenced by the El Niño phenomenon with a change in the precipitation regime, and consequently more frequent and abundant rainfall. Although there are severe winters, with low temperatures and frost occurrence, the annual average temperature of around 18°C, the sandy soil and the high humidity rates throughout the year are compatible with the description of ideal characteristics for *Paracoccidioides* growth and development [17, 20, 21, 22]. In addition, the geographical peculiarity could have contributed to the high positivity rate of soil samples for *Paracoccidioides* DNA, characterized by a coastal city, surrounded by water of the major lagoon of South America (Patos Lagoon) and of a large estuarine lagoon (Mirim Lagoon), and with 250 km of coast from Atlantic Ocean, named Cassino Beach [18].

The confirmation of *Paracoccidioides* spp. presence in an urban area of the southern Brazil, associated with the data of Souza et al. [12] in which the mean period to the disease diagnose was higher than a year, suggests that PCM is a neglected disease in this region, and also that its prevalence in the extreme south of Brazil is underestimated. Further studies with this clinical-epidemiological focus are necessary to confirm it. However, measures that culminate in improve diagnostic support and promote health professionals training for greater clinical suspicion of the disease are necessary.

#### **Acknowledgements:**

We thank to Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), Laboratory of Cellular and Molecular Immunology of UNICAMP, and Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

#### **Conflict of interest:**

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

- [1] Giacomazzi J, Baethgen L, Carneiro LC, Millington MC, Denning DW, Colombo AL, Pasqualotto AC. The burden of serious human fungal infections in Brazil. *Mycoses*. 2016; 59 (3): 145–150.
- [2] Queiroz-Telles F, Fahal AH, Falci DR, Caceres DH, Chiller T, Psqualoto AC. Neglected endemic mycoses. *Lancet Infect Diseases*. 2017; 17 (11): 1-11.
- [3] LIFE. Leading International Fungal Education. Web site. <http://www.life-worldwide.org/>. Accessed August 25, 2017.
- [4] Theodoro RC, Teixeira MDM, Felipe MSS, Paduan KDS, Ribolla PM. Genus *Paracoccidioides*: Species Recognition and Biogeographic Aspects. *PLoS ONE*. 2012; 7 (5): e37694.
- [5] Arantes TD, Theodoro RC, Teixeira MDM, Bosco SDMG, Bagagli E. Environmental Mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil Reveals New Clues into Genetic Diversity, Biogeography and Wild Host Association. *PLoS Negl Trop*. 2016; 10 (4): e0004606.
- [6] Roberto TN, Rodrigues AM, Hahn RC, de Camargo ZP. Identifying *Paracoccidioides* phylogenetic species by PCR-RFLP of the alpha-tubulin gene. *Med Mycol*. 2016; 54 (3): 240-247.
- [7] Carneiro RC, Miranda BG, Neto CC, Tskumu, MK, Fonseca CLC, Mendonça JS. Juvenile paracoccidioidomycosis in urban area: report of two cases. *Braz J Infect Dis* 2010; 14 (1):77-80.
- [8] Restrepo MA. The natural habitat of the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, how to draw the limit between the rural and the urban environment? *Biomedica*. 2014; 34 (1): 5-66.
- [9] Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL, et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017; 50 (5): 715-740.
- [10] Sarti ECFB, Oliveira SMVL, Camargo ZP, Paniago MM. Paracoccidioidal Infection in HIV Patients at an Endemic Area of Paracoccidioidomycosis in Brazil. *Mycopathologia*. 2012; 173 (2-3):145–149.
- [11] Vieira GD, Alves TC, Lima SMD, Camargo LMA, Sousa CM. Paracoccidioidomycosis in a western Brazilian Amazon State: Clinical-epidemiologic profile and spatial distribution of the disease. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014; 47 (1): 63-68.
- [12] Souza SP, Jorge VM, Xavier MO. Paracoccidioidomycosis in southern Rio Grande do Sul: A retrospective study of histopathologically diagnosed cases. *Braz J Microb*. 2014; 45 (1): 243-247.

- [13] Albano APN, Klafke GB, Brandolt TM, *et al.* Wild Animals as Sentinels of *Paracoccidioides brasiliensis* in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathologia*. 2014; 177 (3-4): 207-215.
- [14] Albano APN, Klafke GB, Brandolt TM, *et al.* Seroepidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in horses from Rio Grande do Sul, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 2015; 46 (2): 513-517.
- [15] Teles AJ, Klafke GB, Cabana AL, Albano APN, Xavier MO, Meireles MCA. Serological Investigation of *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Dogs from Southern Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathologia*. 2016;183 (3-4): 323-328.
- [16] Mendes JF, Klafke GB, Albano APN, *et al.* Paracoccidioidomycosis infection in domestic and wild mammals by *Paracoccidioides lutzii*. *Mycoses*. 2017; 60 (6): 402-406.
- [17] INMET, Instituto Nacional de Meteorologia. Temperatura Média Compensada (°C). Web site. <http://www.inmet.gov.br/portal/>. Accessed november18, 2017.
- [18] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Web site. <http://www.ibge.gov.br/home/>. Accessed august 29, 2017.
- [19] Moura MQ, Jeske S, Vieira JN, Corrêa TG, Berne MEA, Villela MM. Frequency of geohelminths in public squares in Pelotas, RS, Brazil. *Rev Bras Parasit Vet.* 2013; 22 (1): 175–178.
- [20] Theodoro RC, Candeias JMG, Araujo JP, *et al.* Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. *Medical Mycology*. 2005; 43 (8): 725–729.
- [21] Terçarioli GR, Bagagli E, Reis GM, *et al.* Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* In soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiol.* 2007; 92 (7): 1-8.
- [22] Arantes TD, Theodoro RC, Macoris SAG, Bagagli E. Detection of *Paracoccidioides* spp. in environmental aerosol samples. *Med Mycol.* 2013; 51 (1): 83-92.
- [23] Bellissimo-Rodrigues F, Bollela VR, Da Fonseca BA, Martinez R. Endemic paracoccidioidomycosis: relationship between clinical presentation and patients' demographic features. *Med Mycol.* 2013; 51 (3): 313-318.

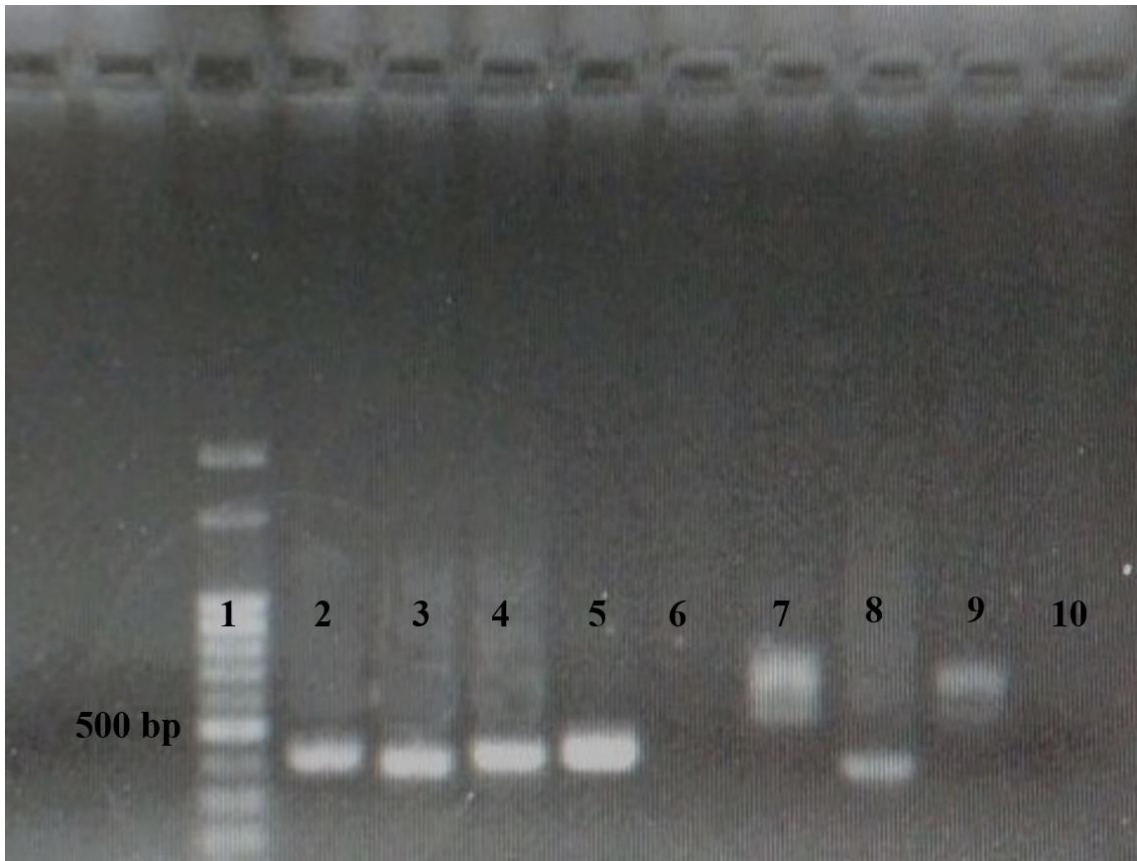


Figure 1: Nested-PCR products from five soil samples (1: 100bp marker; 2,3,4,5: positive samples showing a band of approximately 424bp, 6 and 7: negative samples, 8: positive control, 9: negative control; 10: white).

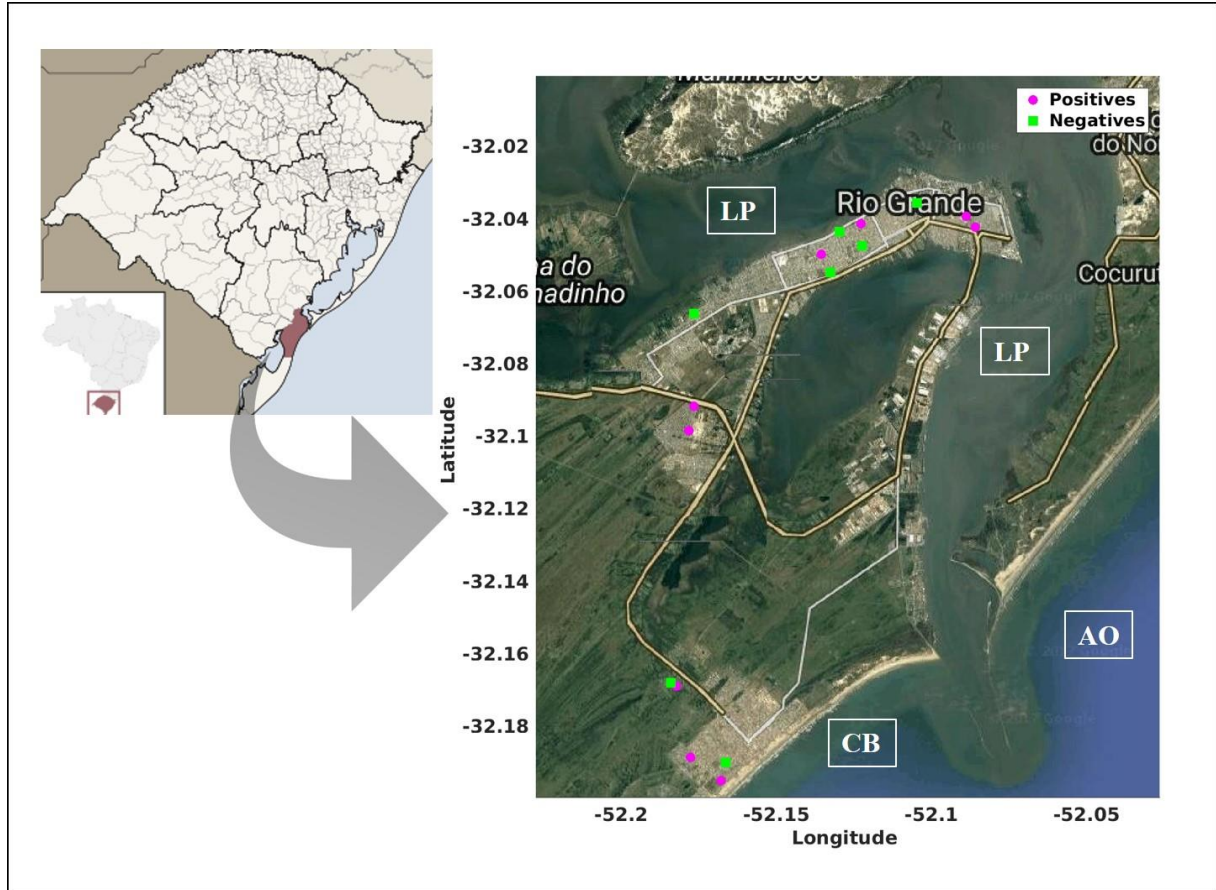


Figure 2: Geographic localization of positive (pink markers; n = 9) and negative samples (green markers; n = 7) for the presence of *Paracoccidioides* spp. DNA in the city of Rio Grande, southern RS, Brazil. CB= Cassino beach; AO = Atlantic Ocean; LP= Lagoa dos Patos.

#### 4 Considerações Finais

- Pela primeira vez a detecção de anticorpos de *P. lutzii* foi comprovada no Rio Grande do Sul, a partir da soropositividade de 21,8% dos animais domésticos e silvestres avaliados como sentinelas provenientes da mesorregião Metropolitana de Porto Alegre, mesorregião Sudoeste e mesorregião Sudeste do RS, tendo sido detectados animais soropositivos tanto na área rural quanto na área urbana.

- DNA de *Paracoccidioides* spp. foi encontrado em solos de municípios do sul do RS, comprovando pela primeira vez a presença do fungo em região de Bioma Pampa, tanto em área rural quanto em área urbana.

- De acordo com as condições físico-químicas, os solos incluídos no estudo para avaliação da presença de DNA de *Paracoccidioides* spp. apresentam condições favoráveis a presença do fungo, caracterizando-se como argilosos, com alta umidade, e índices de pH, matéria orgânica, H+Al<sup>3+</sup> e bases saturadas considerados bons no quesito fertilidade, não tendo sido encontrada diferença estatística quanto a estas características físicas e químicas entre as amostras positivas e negativas para detecção fúngica.

## Referências

ALBANO, A. P. N.; KLAFKE, G. B.; BRANDOLT, T. M.; DA HORA, V. P.; MINELLO, L. F.; JORGE, S.; SANTOS, E. O.; BEHLING, G. M.; CAMARGO, Z. P.; XAVIER, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Wild Animals as Sentinels of *Paracoccidioides brasiliensis* in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mycopathologia**, v. 15, n. 3, p. 177–184, 2014.

ALBANO, A. P. N.; KLAFKE, G. B.; BRANDOLT, T. M.; DA HORA, V. P.; NOGUEIRA, C. E. W.; XAVIER, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Seroepidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in horses from Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 513–517, 2015.

ALMEIDA, Floriano. Estudos comparativos do granuloma coccidióidico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasita brasileiro. **Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, v. 5, s/n, p. 125–141, 1930.

ALVAREZ, V. H.; NOVAIS, R. F.; BARROS, N. F.; CANTARUTTI, R. B.; LOPES, A. S. Interpretação dos resultados das análises de solos. In: RIBEIRO, A. C.; GUIMARAES, P. T. G.; ALVAREZ, V. V. (Eds.). **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais**. 5. ed. Viçosa, Minas Gerais: [s.n.]. p. 25–32, 1999.

ARANTES, T. D.; THEODORO, R. C.; MACORIS, S. A. G.; BAGAGLI, E. Detection of *Paracoccidioides* spp. in environmental aerosol samples. **Medical Mycology**, v. 51, n. 1, p. 83–92, 2013.

ARANTES, T. D.; THEODORO, R. C.; TEIXEIRA, M. D. M.; BOSCO, S. D. M. G.; BAGAGLI, E. Environmental Mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil Reveals New Clues into Genetic Diversity, Biogeography and Wild Host Association. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. 1-18, 2016.

BAGAGLI, E.; FRANCO, M.; BOSCO, S. M. G. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillo (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Medical Mycology**, v. 41, n. 3, p. 217–233, 2003.



BAGAGLI, E.; THEODORO, R. C.; BOSCO, S. M.; MCEWEN, J. G. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4–5, p. 197–207, 2008.

BALABANOV, K.; BALABANOFFN, V. A.; ANGELOV, N. Blastomyose Sud-Américaine Chez Un Laboureur Bulgare Revenu Depuis 30 Ans De Brésil. **Mycopathologia**, v. 24, n. 3, p. 265–270, 1964.

BARROZO, L. V.; MENDES, R. P.; MARQUES, S. A.; BENARD, G.; SILVA, M. E.; BAGAGLI, E. Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil. **International Journal of Epidemiology**, v. 38, n. 6, p. 1642–1649, 2009.

BARROZO, L. V.; BERNARD, G.; SILVA, M. E. S.; BAGLAGLI, E.; MARQUES, S. A.; MENDES, R. P.. First Description of a Cluster of Acute/Subacute Paracoccidioidomycosis Cases and Its Association with a Climatic Anomaly. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 3, p. 640–643, 2010.

BELLISSIMO-RODRIGUES, F.; BOLLELA, V. R.; DA FONSECA, B. A.; MARTINEZ, R. Endemic paracoccidioidomycosis: relationship between clinical presentation and patients' demographic features. **Medical Mycology**, v. 51, n. 3, p. 313-318, 2013.

BENARD, G.; DUARTE, A. J. S. Paracoccidioidomycosis: A Model for Evaluation of the Effects of Human Immunodeficiency Virus Infection on the Natural History of Endemic Tropical Diseases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, n. 4, p. 1032–1039, 2000.

BINKOWSKI, Patrícia. **Conflitos ambientais e significados sociais em torno da expansão da silvicultura de eucalipto na “Metade Sul” do Rio Grande do Sul**. 2009. 212f. Dissertação (Mestrado em Ciências Econômicas) – Faculdade de Ciências Economicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/22662>> Acesso em: 20 nov. 2017.

BOLDRINI, Ilsi. **Bioma Pampa: diversidade florística e fisionômica**. 1 ed. Porto Alegre: Pallotti, 2010. 64p.

BORGES, S. R. C.; SILVA, G. M.; CHAMBELA, M. C.; OLIVEIRA, R. V.; COSTA, R. L.; WANKE, B.; VALLE, A. C. Itraconazole vs. trimethoprim–sulfamethoxazole: A comparative cohort study of 200 patients with paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**, v. 52, n. 3, p. 303–310, 2014.

BORNEMAN, J.; HARTIN, R. J. PCR Primers That Amplify Fungal rRNA Genes from Environmental Samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4356–4360, 2000.

BRADFORD, Marion. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. **Biomás. Pampa**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomás/pampa>>. Acesso em: 20 jul. 2017.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 2, p. 89–117, 1993.

CAMACHO, E.; NIÑO-VEJA, G. A. *Paracoccidioides* spp.: Virulence Factors and Immune-Evasion Strategies. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, p. 19, 2017.

CAMARGO, Z. P.; BERZAGHI, R.; AMARAL, C. C.; SILVA, S.H. Simplified method for producing *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for use in immunodiffusion tests. **Medical Mycology**, v. 41, n. 6, p. 539–542, 2003.

CAMARGO, Z. P.; TABORDA, C.P.; RODRIGUES, E.G.; UNTERKIRCHER, C. *Paracoccidioides* sp isolado das fezes de pinguim da Antártica pertence a espécie *brasiliensis*? **Revista argentina de micología**, v. 15, n. 1, p. 32, 1992.

CAMARGO, Z. P.; TABORDA, C.P.; RODRIGUES, E.G.; TRAVASSOS, L. R. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. **Medical Mycology**, v. 29, n. 1, p. 31–38, 1991.

CAMARGO, Z.; UNTERKIRCHER, C.; CAMPOY, S. P.; TRAVASSOS, L. R. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 10, p. 2147–2151, 1988.

CAMPOS, E. C. Sobre dois casos de granuloma paracoccidióidico no Rio Grande do Sul. **Arquivos do Departamento Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul**, v. 3, s/n, p. 71–77, 1942.

CARRERO, L. L. NIÑO-VEJA, G.; TEIXEIRA, M. M.; CARVALHO, M.J.; SOARES, C.M.; PEREIRA, M.; JESUÍNO, R.S.; MCEWEN, J.G.; MENDOZA, L.; TAYLOR, J.W.; FELIPE, M. S. F.; SAN-BLAS, G. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate

reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, n. 5, p. 605–612, 2008.

CARNEIRO, R.C.; MIRANDA, B.G.; NETO, C.C.; TSKUMU, M. K.; FONSECA, C.L.C.; MENDONÇA, J.S. Juvenile paracoccidioidomycosis in urban area: report of two cases. **Brazilian Journal of Infect Diseases**, v. 10, n. 1, p. 77-80, 2010.

CASADEVALL, A. NAKOUZI, A.; CRIPPA, P. R.; EISNER, M. Fungal Melanins Differ in Planar Stacking Distances. **PLOS ONE**, v. 7, n. 2, p. 1–6, 2012.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage response framework. **Journal of Water and Health**, v. 7, n. 1, p. 2-18, 2009.

CENTRO DE SENSORIAMENTO REMOTO, C. **Monitoramento do desmatamento nos biomas brasileiros por satélite acordo de cooperação técnica Mma/Ibama Monitoramento do Bioma Pampa**. Disponível em: <[http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf\\_chm\\_rbbio/\\_arquivos/relatorio\\_tecnico\\_monitoramento\\_desmate\\_bioma\\_pampa\\_72.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf_chm_rbbio/_arquivos/relatorio_tecnico_monitoramento_desmate_bioma_pampa_72.pdf)>. Acesso em: 15 out 2017.

CLAUSELL, D. T. Estudo micológico e experimental em três casos de granuloma paracoccidióidico. **Arquivo DES Rio Grande do Sul**, v. 3, s/n, p. 81–98, 1942.

COLARES, M. C.; MACANTÔNIO, S. Z.; SEVERO, L. C. Paracoccidioidomicose aguda/subaguda disseminada. Primeiro caso no Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 6, p. 563–567, 1998.

CONTI-DÍAS, Ismael. On the unknown ecological niche of *Paracoccidioides brasiliensis*. Our hypothesis of 1989: present status and perspectives. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 2, p. 131–134, 2007.

CORREDOR, G. G. PERALTA, L. A.; CASTANO, J. H.; ZULUAGA, J. S.; HENAO, B.; ARANGO, M.; TABARES, A. M. R.; MATURE, D.; MCEWEN, J. G.; RESTREPO, A. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. **Medical Mycology**, v. 43, n. 3, p. 275–280, 2005.

CORREDOR, G. G.; CASTAÑO J.H.; PERALTA L.A.; DÍEZ S.; ARANGO M.; MCEWEN J.; RESTREPO, A. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for

paracoccidioidomycosis in Colombia. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 16, n. 4, p. 216–220, 1999.

CORTE, A. C.; ITANO, E.N.; FREIRE, R.L.; CAMARGO, Z.P.; ONO, M.A. Detection of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in horses from northern Region of Paraná State. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 2, p. 441–446, 2009.

CORTE, A. C.; GENNARI, S.M.; LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.A.; ITANO, E.N.; FREIRER.L.; CAMARGO, Z.P.; ONO, M.A. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in dogs from Western Brazilian Amazon. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 7, p. 649–652, 2012.

COSTA, A. N.; BENARD, G.; ALBUQUERQUE, A. L. P.; FUJITA, C. L.; MAGRI, A. S. K.; SALGE, J. M.; SHIKANAI-YASUDA, M. A; CARVALHO, C. R. The lung in paracoccidioidomycosis: new insights into old problems. **Clinics**, v. 68, n. 4, p. 441–448, 2013.

COSTA, E. O.; DINIZ, L. S. M.; FAVA NETTO, C. The prevalence of positive intradermal reactions to paracoccidioidin in domestic and wild animals in São Paulo, Brazil. **Veterinary Research Communications**, v. 19, n. 2, p. 127–130, 1995a.

COSTA, E. O. DINIZ, L.S.M.; FAVA NETTO, C.; ARRUDA, C.; DAGLI, M.L.Z. Delayed hypersensitivity test with paracoccidioidin in captive Latin American wild mammals. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 33, n. 1, p. 39–42, 1995b.

DIAS-MELICIO, L. A.; FERNANDES, R. K.; RODRIGUES, D. R.; GOLIM, M. A.; SOARES, A. M. Interleukin-18 increases TLR4 and mannose receptor expression and modulates cytokine production in human monocytes. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 9, 2015.

DUARTE, A. L. W. P.; BARUFFA, G.; TERRA, H.B.G.; RENCK, D.V.; MOURA, D.; PETRUCCI, C. Paracoccidioidomicose sistêmica com envolvimento do sistema nervoso central. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 4, p. 439–442, 1999.

EISENMAN, H. C.; CHOW, S.; TSÉ, K. K.; MCCLELLAND, E.; CASADEVALL, A. The effect of L-DOPA on *Cryptococcus neoformans* growth and gene expression. **Virulence**, v. 2, n. 4, p. 329–336, 2011.

FARIAS, M.; CONDAS, L.A.Z.; RIBEIRO, M.G.; BOSCO S.M.; MURO M.D.; WERNER J.; THEODORO, R.C.; BAGAGLI, E.; MARQUES, S.A.; FRANCO, M. Paracoccidioidomycosis in a Dog: Case Report of Generalized Lymphadenomegaly. **Mycopathologia**, v. 172, n. 2, p. 147–152, 2011.

FARIAS, M. R.; WERNER, J.; MURO, M.D.; MARQUES, S.A.; MARQUES, M.E.A.; FRANCO, M.F.; RIBEIRO, M.G.; CUSTODIO, C.C.; CONDAS, L.A.Z.; BOSCO, S.M.G.; BAGAGLI, E. Canine Paracoccidioidomycosis: case report of generalized lymphadenitis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 47, n. 14, p. 64, 2005.

FERREIRA, Marcelo. Paracoccidioidomycosis. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 10, n. 4, p. 161–165, 2009.

FONTANA, F. F.; DOS SANTOS, C. T.; ESTEVES, F. M.; ROCHA, A.; FERNANDES, G.F.; DO AMARAL, C.C.; DOMINGUES, M. A.; DE CAMARGO, Z. P.; SILVA-VERGARA, M. L. Seroepidemiological Survey of Paracoccidioidomycosis Infection Among Urban and Rural Dogs from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Mycopathologia**, v. 169, n. 3, p. 159–165, 2010.

FRANCO, M.; BAGAGLI, E.; SCAPOLIO, S.; LACAZ, C. A A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. **Medical Mycology**, v. 38, n. 3, p. 185–191, 2000.

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M.R.; MENDES, R.P.; MARQUES, S.A.; DILLON, N.L.; MOTA, N.G. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification on its clinical forms. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 20, n. 2, p. 129–133, 1987.

FUNDAÇÃO DE ECONOMIA E ESTATÍSTICA (FEE). Disponível em [<http://www.fee.rs.gov.br/>]. **Rio Grande do Sul, Brasil**. Disponível em: [http://www.fee.rs.gov.br/feedados/consulta/unidades\\_geo.asp](http://www.fee.rs.gov.br/feedados/consulta/unidades_geo.asp). Acesso agosto de 2017.

GARCIA, N. M.; DEL NARO, G.M.B.; VACARI, E.M.; MELO, N.T.; ASSIS, C.M.; LACAZ, C.S. *Paracoccidioides brasiliensis*, a new sample isolated from feces of a penguin (*Pygoscelis adeliae*). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 35, n. 3, p. 227-235, 1993.

GEGEMBAUER, G.; ARAUJO, L. M.; PEREIRA, L. M.; RODRIGUES, A. M.; PANIAGO, A. M.; HANH, R. C.; CAMARGO, A. P. Serology of Paracoccidioidomycosis Due to *Paracoccidioides lutzii*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. 1-12, 2014.

GIACOMAZZI, J.; BAETHGEN, L.; CARNEIRO, L.C.; MILLINGTON, M. C.; DENNING, D.W.; COLOMBO, A. L.; PASQUALOTTO, A. C. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, v. 59, n. 3, p. 145–150, 2016.

GOMES, G. M.; CISALPINO, P. S.; TABORDA, C. P.; CAMARGO, Z. P. PCR for Diagnosis of Paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3478–3480, 2000.

GONZALEZ, J. F.; MONTIEL, N. A.; MAASS, R. L. First report on the diagnosis and treatment of encephalic and urinary paracoccidioidomycosis in a cat. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, n. 8, p. 659–662, 2010.

GONZÁLEZ, A.; GOMEZ, B. L.; DIEZ, S.; HERNANDEZ, O.; RESTREPO, A.; HAMILTON, A. J.; CANO, L. E. Purification and Partial Characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* Protein with Capacity To Bind to Extracellular Matrix Proteins. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 4, p. 2486–2495, 2005.

HAHN, R. C.; RODRIGUES, A. M.; FONTES, C. J. F.; NERY, A. F.; TADANO, T.; QUEIROZ- JUNIOR, L. P.; CAMARGO, Z. P. Case Report: Fatal Fungemia due to *Paracoccidioides lutzii*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 2, p. 394–398, 2014.

INMET, Instituto Nacional de Meteorologia. **Temperatura Média Compensada (°C)**. Disponível em <<http://www.inmet.gov.br/portal/>>. Acesso em: 20 nov. 2017.

INSTITUTO AGRONÔMICO DE SÃO PAULO, I. **Como retirar amostras de solo**. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/produtoseservicos/analisedosolo/retiraramostrasolo.php>> Acesso em: 21 nov. 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, I. **Censo 2010**. Disponível em: <<http://www.censo2010.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 20 jul. 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, I. **Mapa de Biomas e de Vegetação**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomas.shtm>>. Acesso em: 08 nov. 2017.

JOHNSON, W. D.; LANG, C. M. Paracoccidioidomycosis (South American Blastomycosis) in a Squirrel Monkey (*Saimiri sciureus*). **Veterinary Pathology**, v. 14, n. 4, p. 368–371, 1977.

KLOETZEL, K.; BUENO, A. C.; QUEIROZ, R. D. E. Involvement of the Tracheobronchial Tree in South American Blastomycosis. **Diseases of the Chest**, v. 44, n. 4, p. 368–373, 1963.

LACAZ, Carlos et al. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1120p.

LIFE. **Leading International Fungal Education**. Disponível em: <<http://www.life-worldwide.org/>>. Acesso em: 20 dez. 2017.

LONDERO, A. T.; RAMOS, C. D. Paracoccidioidomicose. Estudo clínico e micológico de 260 casos observados no interior do Estado do Rio Grande do Sul. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 16, n. 4, p. 129–132, 1990.

LONDERO, A. T.; RAMOS, C. D.; LOPES, J. O. S. Progressive pulmonary paracoccidioidomycosis a study of 34 cases observed in Rio Grande do Sul (Brazil). **Mycopathologia**, v. 63, n. 1, p. 53–56, 1978.

LUTZ, Adolfo. Uma micose pseudococcídica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hifoblastomicoses americanas. **Brasil Med**, v. 22, n. 13, p. 121–124, 1908.

MARQUES, S. H. DA S.; RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, S.; SILVEIRA-GOMES, F.; CAMARGO, Z. P. Occurrence of *Paracoccidioides lutzii* in the Amazon Region: Description of Two Cases. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 4, p. 710 - 714, 2012.

MARQUES, Silvio. Paracoccidioidomicose: atualização epidemiológica, clínica e terapêutica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 2, p. 135–146, 2003.

MATUTE, D. R.; MCEWEN, J.G., MONTES, B.A., SAN-BLAS, G., BAGAGLI, E., RAUSCHER, J.T., RESTREPO, A., MORAIS, F., NINO-VEGA, G., TAYLOR, J.W. Cryptic Speciation and Recombination in the Fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as Revealed by Gene Genealogies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 1, p. 65–73, 2006.

MATUTE, D. R.; QUESADA-OCAMPO, L. M.; RAUSCHER, J. T.; McEWEM, J. G. Evidence for Positive Selection in Putative Virulence Factors within the *Paracoccidioides brasiliensis* Species Complex. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 9, p. 1–10, 2008.

MEDINA, H. Lesões histopatológicas em três casos de granuloma paracoccidióidico. **Arquivo DES Rio Grande do Sul**, v. 3, s/n, p. 99–104, 1942.

MENDES, J. F.; KLAFKE, G. B.; ALBANO, A. P. N.; CABANA Â. L.; TELES, A. J.; CAMARGO, Z. P.; XAVIER, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Paracoccidioidomycosis infection in domestic and wild mammals by *Paracoccidioides lutzii*. **Mycoses**, v. 60, n. 6, p. 402–406, 2017.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; HANNA, S. A.; DA SILVA, J.L.; ANDREOTTI, P. F.; VINCENZI, L. R.; BENARD, G.; LENZI, H.L.; SOARES, C. P. Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 10, p. 882–891, 2004.

MOURA, M. Q.; JESKE, S.; VIEIRA, J. N.; CORRÊA, T. G.; BERNE, M. E. A.; VILLELA, M. M. Frequency of geohelminths in public squares in Pelotas, RS, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 175–178, 2013.

MUÑOZ, J. F.; FARRER, R. A.; DESJARDINS, C. A.; GALLO, J. E.; SYKES, S.; SAKTHIKUMAR, E. M.; WHITSON, E. BAGAGLI, E.; SOARES, C. M. A.; TEIXEIRA, M. M.; TAYLOR, J. W.; CLAY, O. K.; McEWEN, J. G.; CUOMO, C. A. Genome Diversity, Recombination, and Virulence across the Major Lineages of *Paracoccidioides*. **MSphere**, v. 1, n. 5, p. 1–18, 2016.

NAIFF, R. D.; FERREIRA, L.C.L.; BARRET, T.V.; NAIF, M.F.; ARIAS, J.R. Paracoccidioidomicose enzoótica em tatus (*Dasyopus novemcinctus*) no estado do Pará. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 28, n. 1, p. 19–27, 1986.

NEGRONI, R.; COSTA, M.R.I.G.; BIANCHI, O.; GALIMBERTI, R. Preparacion y estudio de un antígeno celular de *Paracoccidioides brasiliensis*, util para pruebas cutaneas. **Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 14, n. 3, p. 265–273, 1976.

OLIVEIRA, G. G.; NAVARRO, I.T.; FREIRE, R.L; BELITARDO, D.R.; SILVEIRA, L.H.; CAMARGO, Z.P.; ITANO, E.N.; ONO, M.A. Serological Survey of Paracoccidioidomycosis in Sheep. **Mycopathologia**, v. 173, n. 1, p. 63–68, 2012.



OLIVEIRA, G. G.; SILVEIRA, L.H.; ITANO, E.N.; SOARES, R.M.; FREIRE, R.L.; WATANABE, M.A.E.; CAMARGO, Z.P.; ONO, M.A. Serological Evidence of *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Chickens from Paraná and Mato Grosso do Sul States, Brazil. **Mycopathologia**, v. 171, n. 3, p. 197–202, mar. 2011.

ONO, M. A.; BRACARENSE, A. P.; MORAIS, H. S.; TRAPP, S. M.; BELITARDO, D. R.; CAMARGO, Z. P. Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. **Medical Mycology**, v. 39, n. 3, p. 277 - 282, 2001.

ONO, M. A.; KISHIMA, M. O.; ITANO, E.N.; BRACARENSE, A.P.; CAMARGO, Z.P. Experimental paracoccidioidomycosis in dogs. **Medical Mycology**, v. 41, n. 3, p. 265–268, 2003.

PANIAGO, A. M. M.; AGUIAR, J.I.; AGUIAR, E.S.; da CUNHA, R.V.; PEREIRA, G.R.; LONDERO, A.T.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis: a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 4, p. 455–459, 2003.

PEÇANHA, P. M.; DE SOUZA, S.; FALQUETO, A.; GRÃO-VELOSO, T. R.; LÍRIO, L.V.; FERREIRA, J. R. C. U. G.; SANTOS, A. R.; COSTA, H.G.; DE SOUZA, L.R.; TUON, F. F. Amphotericin B lipid complex in the treatment of severe paracoccidioidomycosis: a case series. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 4, p. 428–430, 2016.

QUEIROZ-TELLES, F.; FAHAL, A.H.; FALCI, D. R.; CACERES, D. H.; CHILLER, T.; PSQUALOTO, A. C. Neglected endemic mycoses. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. e367–e377, 2017.

QUEIROZ-TELLES, F.; GOLDANI, L. Z.; SCHLAMM, H. T.; GOODRICH, J.M.; ESPINEL- INGROFF, A.; SHIKANAI-YASSUDA, M. A. An open-label comparative pilot study of oral voriconazole and itraconazole for long-term treatment of paracoccidioidomycosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 15, p. 1462-1469, 2007.

RESTREPO, Maria Adelaida. The natural habitat of the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, how to draw the limit between the rural and the urban environment? **Biomedica.**, v. 34, n.1, p. 5-6, 2014.

RESTREPO, M. A.; TOBÓN, A. M. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: MANDELL, G. D.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. Philadelphia: Editora Loyola, 2010. p. 3357–3363.

RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G.; CASTAÑEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Medical Mycology**, v. 39, n. 3, p. 233–241, 2001.

RICCI, G.; MOTA, F.T.; WAKAMATSU, A.; SERAFIM, R.C.; BORRA, R.C.; FRANCO, M. Canine paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**, v. 42, n. 4, p. 379–383, 2004.

RICHINI-PEREIRA, V. B.; BOSCO, S.M.; THEODORO, R.C.; BARROZO, L.; PEDRINI, S.C.; ROSA, P.S.; BAGAGLI, E. Importance of xenarthrans in the eco-epidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **BMC Research Notes**, v. 2, n. 1, p. 228, 2009.

RICHINI-PEREIRA, V. B.; BOSCO, S.M.G.; GRIESE, J.; THEODORO, R.C.; MACORIS, S.A.G.; SILVA, R.J.; BARROZO, L.; TAVARES, P.M.S.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; BAGAGLI, E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. **Medical Mycology**, v. 46, n. 1, p. 35–40, 2008.

ROBERTO, T. N.; RODRIGUES, A. M.; HAHN, R. C.; CAMRAGO, Z. P. Identifying *Paracoccidioides* phylogenetic species by PCR-RFLP of the alpha-tubulin gene. **Medical Mycology**, v. 54, n. 3, p. 240–247, 2016.

RODRIGUES, M. L.; NIMRICHTER, L.; OLIVEIRA, D. L.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Vesicular Trans-Cell Wall Transport in Fungi: A Mechanism for the Delivery of Virulence-Associated Macromolecules? **Lipid insights**, v. 2, n.1, p. 27–40, 2008.

ROSA, Mário. **Geografia de Pelotas**. Pelotas, Brasil: UFPEL, 1985. RUIZ-GAVIRIA, R. Specificity and sensitivity of aquaporin 4 antibody detection tests in patients with neuromyelitis optica: A meta-analysis. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 4, n. 4, p. 345–349, 2015.

SALGADO-SALAZAR, C. JONES, L. R.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G. The human fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: phylogenetic evidence from five mitochondrial markers. **Cladistics**, v. 26, n. 6, p. 613–624, 2010.

SAN-BLAS, G.; NINÕ-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Medical Mycology**, v. 40, n. 3, p. 225–242, 2002.

SANTOS, Vitorino. Comportamento em cultura e diagnóstico morfológico da *Emmonsia crescens* em tatus. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n.3. p. 307, 1999.

SARTI, E. C. F.B.; OLIVEIRA, S.M.V.L.; DE CAMARGO, Z. P.; PANIAGO, A.M.M. Paracoccidioidal Infection in HIV Patients at an Endemic Area of Paracoccidioidomycosis in Brazil. **Mycopathologia**, v. 173, n. 2-3, p. 145-149, 2012.

SEVERO, L. C.; AGOSTINI, A. A.; LONDERO, A. T. Acometimento ósseo na paracoccidioidomicose crônica disseminada. Relato dos Primeiros casos no Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, n. 3, p. 241–244, 1996.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; QUEIROZ-TELLES, F.; KONO, A. S. G.; PANIAGO, A. M. M.; NATHAN, A.; VALLE, A. C. F. D.; BAGAGLI, E.; BENARD, G.; FERREIRA, M. S.; TEIXEIRA, M. M.; SILVA-VERGARA, M. L.; PEREIRA, R.M.; CAVALCANTE, R. S.; HAHN, R.; DURLACHER, R., R.; KHOURY, Z.; CAMARGO, Z. P.; MORETTI, M. L.; MARTINEZ, R. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 715–740, 2017.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; QUEIROZ-TELES, F. ; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; MORETTI, M. L. Guideliness in paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297–310, 2006.

SHOME, S. K.; BATISTA, A. C. Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* in the soil of Recife (Brazil). **Revista de Medicina da Universidade Federal do Ceará**, v. 3, p. 90–94, 1963.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à luz de autores contemporâneos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanaba Koogan, 2004. 830 p.

SILVA, P. Z. DA; OLIVEIRA, F. DE M.; SEVERO, L. C. Paracoccidioidomicose e gastrectomia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 6, p. 747–749, 2003.

SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R.; MALTA, M.E.B.; RAMIREZ, L.E.; FRANCO, F.A. The marsupial *Didelphis albiventris* is an improbable host of *Paracoccidioides brasiliensis* in an endemic area of paracoccidioidomycosis in Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 771–772, 2001.

SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R.; CAMARGO, Z.P.; MALTA, M.H.; MAFFEI, C.M.; CHADU, J.B.. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Medical Mycology**, v. 38, n. 3, p. 193–199, 2000.

SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R. Role of the armadillo *Dasypus novemcinctus* in the epidemiology of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 144, n. 3, p. 131–133, 1999.

SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R.; CHADU, A.; MADEIRA, M.; FREITAS-SILVA, G.; LEITE-MAFFEI, C. M. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. **Medical Mycology**, v. 36, n. 1, p. 37–42, 1998.

SILVEIRA, L. H.; PAES, R.C.S.; MEDEIROS, E.V.; ITANO, E.N.; CAMARGO, Z.P.; ONO, M.A. Occurrence of Antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in Dairy Cattle from Mato Grosso do Sul, Brazil. **Mycopathologia**, v. 165, n. 6, p. 367–371, 2008.

SORAI, F.; NIÑO-VEGA, G.; SAN-BLAS, G. El peculiar mecanismo de degradación de la ornitina decarboxilasa fúngica. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 20, s/n, p. 1–5, 2003.

SOUTO, P. C. S.; BRITO, V. N.; GAMEIRO, J.; Programmed cell death in thymus during experimental paracoccidioidomycosis. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 192, n. 4, p. 225–229, 2003.

SOUZA, S. P. DE; JORGE, V. M.; XAVIER, M. O. Paracoccidioidomycosis in southern Rio Grande do Sul: a retrospective study of histopathologically diagnosed cases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 243–247, 2014.

SPLENDRE, Afonso. Zymonematosi com localizzazione nella cavità della boca osservata in Brasile. **Bulletin De La Societe De Pathologie Exotique**, v. 5, s/n, p. 313–319, 1912.

TARANTINO, Afonso. Micoses Pulmonares. In: TARANTINO, A. B. **Doenças Pulmonares**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2002. p. 416–450.

TEIXEIRA, M. D. M.; THEODORO, R. C.; OLIVEIRA, F. F. M.; MACHADO, G. C.; HAHN, E. B.; BAGAGLI, E.; SAN-BLAS, G.; FELIPE, M. S. S. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. **Medical Mycology**, v. 52, n.1, p. 19–28, 2014.

TEIXEIRA, M. M.; THEODORO, R. C.; DE CARVALHO, M. J.; FERNANDES, L.; PAES, H. C.; HAHN, R. C.; MENDOZA, L.; BAGAGLI, E.; SAN-BLAS, G.; FELIPE, M. S. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 52, n. 2, p. 273–283, 2009.

TELES, A. J.; KLAFKE, G. B.; CABANA, Â.L.; ALBANO, A. P.; XAVIER, M. O.; MEIRELES, M. C. Serological Investigation into *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Dogs from Southern Rio Grande do Sul, Brazil. **Mycopathologia**, v. 181, n. 3, p. 323–328, 2016.

TERÇARIOLI, G. R.; BAGAGLI, E.; REIS, G. M.; THEODORO, R. C.; BOSCO, S. M. G.; MACORIS, S. A. G.; RICHINI-PEREIRA, V. B. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. **BMC Microbiology**, v. 92, n. 7, p. 1–8, 2007.

THEODORO, R. C.; TEIXEIRA, M. M.; FELIPE, M. S. S.; PADUAN, K. S.; RIBOLLA, P. M.; SAN-BLAS, G.; BAGAGLI, E. Genus *Paracoccidioides*: Species Recognition and Biogeographic Aspects. **PLOS One**, v. 7, n. 5, p. 1-15, 2012.

THEODORO, R. C.; BAGAGLI, E.; OLIVEIRA, C. Phylogenetic analysis of PRP8 intein in *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, n. 9, p. 1284–1291, 2008.

THEODORO, R. C.; CANDEIAS, J. M. G.; ARAUJO, J. P.; BOSCO, S. M. G.; MACORIS, S. A. G.; PADULA-JUNIOR, L. .; FRANCOS, M.; BAGAGLI, E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. **Medical Mycology**, v. 43, n. 8, p. 725–729, 2005.

THIND, S. K.; TABORDA, C. P.; NOSANCHUK, J. D. Dendritic cell interactions with Histoplasma and Paracoccidioides. **Virulence**, v. 6, n. 5, p. 424–432, 2015.

THOMPSON, G. R.; RENDON, A.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; QUEIROZ-TELLES, F.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; AZIE, N.; MAHER, R.; LEE, M.; KOVANDA, L.; ENGELHARDT, M.; VAZQUEZ, J. A.; CORNELLY, O. A.; PERFECT,

J. R. Isavuconazole Treatment of Cryptococcosis and Dimorphic Mycoses. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 3, p. 356–362, 2016.

TOBÓN, A. M.; AGUDELO, C. A.; OSORIO, M. L.; ALVAREZ, D.L.; ARANGO, M.; CANO, L. E. Residual Pulmonary Abnormalities in Adult Patients with Chronic Paracoccidioidomycosis: Prolonged Follow-Up after Itraconazole Therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, n. 7, p. 898–904, 2003.

TREJO-CHÁVEZ, A. RAMÍREZ-ROMERO, R.; ANCER-RODRÍGUEZ, J.; NEVÁREZ-GARZA, A.M.; RÓDRÍGUEZ-TOVAR, L.E. Disseminated Paracoccidioidomycosis in a Southern Two-Toed Sloth (*Choloepus didactylus*). **Journal of Comparative Pathology**, v. 144, n. 2, p. 231–234, 2011.

TURISSINI, D. A.; GOMEZ, O. M.; TEIXEIRA, M. M.; MCEWEN, J. G.; MATUTE, D. R. Species boundaries in the human pathogen Paracoccidioides. **Fungal Genetics and Biology**, v. 106, n. Supplement C, p. 9–25, 2017.

UFPEL. Dados oficiais sobre temperaturas e pluviosidade do Centro de Pesquisas e Previsões Meteorológicas da Universidade Federal de Pelotas 2015 (CPPMet-UFPe). Disponível em: <https://wp.ufpel.edu.br/cppmet/dados-observados/> Acesso em: 21 nov. 2017.

UNTEREINER, W. A.; SCOTT, J. A.; NAVEAU, F. A.; SIGLER, L.; BACHEWICH, J.; ANGUS, A. The *Ajellomycetaceae*, a new family of vertebrate-associated *Onygenales*. **Mycologia**, v. 96, n. 4, p. 812–821, 2004.

VALLE, A.C.; COSTA, R.L.; MONTEIRO, P.C. Interpretation and clinical correction of serological test in paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**. V. 39, n. 4, p. 373-377, 2001.

VALLE, A. C. F.; APRIGLIANO, F. F.; MOREIRA, J.S.; WANKE, B. Clinical and endoscopic findings in the mucosae of the upper respiratory and digestive tracts in post-treatment follow-up of paracoccidioidomycosis patients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, n. 5, p. 407–413, 1995.

VALLEJO, M. C.; MATSUO, A. L.; GANIKO, L.; MEDEIROS, L. C.; MIRANDA, K.; SILVA, L. S.; FREYMÜLLER-HAAPALAINEN, E.; SINIGAGLIA-COIMBRA, R.; ALMEIDA, I. C.; PUCCIA, R. The Pathogenic Fungus *Paracoccidioides brasiliensis* Exports Extracellular Vesicles Containing Highly Immunogenic  $\alpha$ -Galactosyl Epitopes. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 3, p. 343–351, 1 mar. 2011.

VALLEJO, M. C.; NAKAYASU, E. S.; MATSUO, A. L.; SOBREIRA, J. P.; LONGO, L. V. G.; GANIKO, L.; ALMEIDA, I. C.; PUCCIA, R. Vesicle and Vesicle-Free Extracellular Proteome of *Paracoccidioides brasiliensis*: Comparative Analysis with Other Pathogenic Fungi. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 3, p. 1676–1685, 2012.

VERLI, F. D.; MARINHO SA, SOUZA CS, FIGUEIREDO MSZ, YURGEL LS. Clinical-epidemiologic profile of paracoccidioidomycosis at the Stomatology Department of São Lucas Hospital, Pontificia Universidade Católica of Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 3, p. 234–247, 2005.

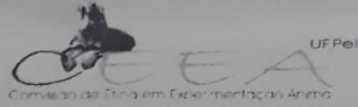
VIEIRA, G. DE D.; ALVES, T. C.; LIMA, S. M. D.; CAMARGO, L. M.A.; SOUSA, C. M. Paracoccidioidomycosis in a western Brazilian Amazon State: Clinical-epidemiologic profile and spatial distribution of the disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 47, n. 1, p. 63–68, 2014.

WANKE, B.; LAZER, M. S.; CAPONE, D. Paracoccidioidomicose. In: AIDÉ, M. A. (Ed.). **Pneumologia aspectos práticos e atuais**. Rio de Janeiro: Ed. Revinter, 2001. p. 147–15.

## **Anexos**



## Anexo I - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal



Pelotas, 10 de dezembro de 2015

**De:** M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

*Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)*

**Para:** Prof. Mário Carlos Araújo Meireles

*Departamento de Veterinária Preventiva – Faculdade de Veterinária*

Senhor Professor:

A CEEA analisou o pedido de **adendo** intitulado: “**Investigação da presença de *Paracoccidioides* spp. em diferentes mesorregiões do Rio Grande do Sul**”, processo nº23110.006863/2015-33, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, visto que irá utilizar amostras já coletadas em procedimentos previamente autorizados por esta Comissão (CEEA 9930/2014 e 7123).

**Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.**

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao COBALTO para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 6863-2015).

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

*Presidente da CEEA*

Ciente em: 12/12/2015

Assinatura do Professor Responsável: \_\_\_\_\_