

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

JULIANA DE ANDRADE E SILVA

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *PARACOCCIDIOIDES* SPP.
RECUPERADOS DE PACIENTES COM PARACOCCIDIOIDOMICOSE EM UM
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE MINAS GERAIS, BRASIL.**

UBERABA – MG

2021

JULIANA DE ANDRADE E SILVA

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *PARACOCCIDIOIDES* SPP.
RECUPERADOS DE PACIENTES COM PARACOCCIDIOIDOMICOSE EM UM
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE MINAS GERAIS, BRASIL.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical e Infectologia – Área de Concentração Parasitologia e Imunologia Aplicadas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Mario León Silva-Vergara

UBERABA – MG

2021

A tese de doutorado intitulada: **EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE PARACOCCIDIOIDES SPP. RECUPERADOS DE PACIENTES COM PARACOCCIDIOIDOMICOSE EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE MINAS GERAIS, BRASIL.**

Defendida por **JULIANA DE ANDRADE E SILVA.**

Foi avaliada e aprovada em ___ de _____ de 2021 pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Marcus de Melo Teixeira

Universidade Federal de Brasília

Rosane Christine Hahn

Universidade Federal de Mato Grosso

Eduardo Bagagli

Universidade Paulista

Kennio Ferreira Paim

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

André Luiz Pedrosa

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Mário León Silva-Vergara

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Este trabalho contou com o apoio financeiro da FAPEMIG (Fundação de Amparo À Pesquisa do Estado de Minas Gerais) APQ 2633 2016, da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e da FUNEPU-UFTM (Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba- Universidade Federal do Triângulo Mineiro).

AGRADECIMENTOS

- À Deus, pois toda força e infinita necessidade de boas energias foi nele que encontrei.
- Minha família, em especial meus pais, Luiz Antônio e Maria Anesia, pois se não fossem eles nada teria acontecido.
- Meu irmão, Leonardo Eurípedes, se não fosse por você, eu realmente não teria continuado. Muito obrigada!
- Meu filho, Arthur, mesmo com a tenra idade me deu exemplos de paciência nos momentos que eu não podia estar com ele.
- Meu orientador, Dr. Mário León, pelo apoio e exemplo de profissionalismo na docência.
- Meu co-orientador, Marcus de Melo Teixeira que sempre solícito com sugestões eficazes para estruturação do trabalho.
- Amigos da Pós Graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília, Bernardo, Lucas, Giovana pelo grande apoio sempre.
- Ao colega Adair da DIP UFTM pelo apoio com os formulários de pacientes.
- Ao técnico do laboratório de Micologia da DIP UFTM, Bruno Siqueira pelo grande apoio sempre.
- Ao fomento FAPEMIG que me forneceu recursos para o trabalho.
- Enfim, agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para que essa etapa tão importante fosse concluída!

RESUMO

O complexo *P. brasiliensis* com suas espécies crípticas e *P. lutzii* causam a paracoccidiodomicose (PCM) e apresentam significativas variações genéticas interespecíficas, além de diferenças morfológicas e de distribuição geográfica. A variabilidade genética intraespecífica destas espécies e sua relação com aspectos clínicos e/ou epidemiológicos da (PCM) é pouco conhecida. Este estudo objetivou genotipar 23 isolados clínicos de *Paracoccidioides* spp. obtidos de pacientes oriundos da região Sudeste do Brasil. Foram sequenciados os loci *GP43*, éxon 2, as regiões ITS1-5.8S-ITS2 e o locus *ARF* e realizadas diferentes análises. As 23 sequências obtidas foram comparadas com as depositadas no GenBank por meio da criação de dois bancos de dados. Um com 152 isolados provenientes de diferentes origens e que dispunham das sequências dos loci *ARF+GP43* denominado G1 e outro com as sequências de *ARF+GP43+ITS* de 22 diferentes isolados denominados G2. Foi observado elevado polimorfismo nos isolados do presente estudo quando comparados com aqueles provenientes de outras regiões do Brasil e de outros países. Dentre estes 23 isolados, 22 (95,66%), foram identificados como S1/*P. brasiliensis* e apenas um foi identificado como PS2/*P. americana*. A maioria apresentou haplótipos (H) ou *sequence types* exclusivos (STs). No G1 foram encontrados 45 haplótipos: 19 em S1/*P. brasiliensis* sendo (13 exclusivos do presente estudo), 15 em *P. lutzii*, seis em PS2/*P. americana* (um exclusivo do presente estudo, H9), três em PS3/*P. restrepiensis* e dois em PS4/*P. venezuelensis*. Foram encontrados haplótipos exclusivos de origem clínica e com áreas geográficas restritas. No G1, a espécie mais polimórfica foi S1/*P. brasiliensis* (19 haplótipos, HD de 0,655 e K de 4,613) seguida de *P. lutzii* (12 haplótipos, HD de 0,649 e K de 2.906), entretanto não foi encontrada a divisão dos isolados S1/*P. brasiliensis* em S1a e S1b. No G2 foram encontrados 31 STs, dos quais 15 eram S1/*P. brasiliensis* (13 exclusivos do presente estudo), oito *P. lutzii*, cinco PS2/*P. americana* (um exclusivo do presente estudo, ST9) e dois PS3/*P. restrepiensis*. No G2, a análise do número de populações mostrou um K=5 e houve a diferenciação entre S1a e S1b, com 20 dos isolados do presente estudo agrupados em S1b. Em ambos grupos o locus *GP43* mostrou-se o mais variável e o mais discriminador de espécies, enquanto a região ITS demonstrou ATs compartilhados por diferentes espécies crípticas de *Paracoccidioides*. A análise de *minimum spanning tree* mostrou dois grandes grupos, um composto exclusivamente por isolados de *P. lutzii* e o outro que incluiu as outras espécies e correlações do grupo fundador (GF) GF7 com o tipo misto da doença e com a origem geográfica e de GF16 com doenças crônicas. Os resultados obtidos

confirmam que S1/*P. brasiliensis* é a espécie predominante na região Sudeste do Brasil e possui alta variabilidade genética intraespecífica.

Palavras chave: Paracoccidioidomicose; S1/*P. brasiliensis*; PS2/*Paracoccidioides americana*; ARF; GP43; ITS, MLST.

ABSTRACT

The *P. brasiliensis* complex with its cryptic species and *P. lutzii* cause paracoccidioidomycosis (PCM) and present significant interspecific genetic variations, in addition to morphological and geographic distribution differences. The intraspecific genetic variability of these species and its relationship with clinical and/or epidemiological aspects of (PCM) is little known. This study aimed to genotype 23 clinical isolates of *Paracoccidioides* spp. obtained from patients from the Southeast region of Brazil. The *GP43* loci, exon 2, the ITS1-5.8S-ITS2 regions and the *ARF* locus were sequenced and different analyzes were performed. The 23 sequences obtained were compared with those deposited in the GenBank through the creation of two databases. One with 152 isolates from different origins and which had the sequences of the loci *ARF+GP43* called G1 and another with the sequences of *ARF+GP43+ITS* from 22 different isolates called G2. High polymorphism was observed in the isolates in this study when compared to those from other regions of Brazil and other countries. Among these 23 isolates, 22 (95.66%) were identified as S1/*P. brasiliensis* and only one was identified as PS2/*P. American*. Most had haplotypes (H) or unique sequence types (STs). In G1 45 haplotypes were found: 19 in S1/*P. brasiliensis* being (13 exclusive to the present study), 15 in *P. lutzii*, six in PS2/*P. American* (one exclusive to the present study, H9), three in PS3/*P. restrepiensis* and two in PS4/*P. Venezuelanensis*. Unique haplotypes of clinical origin and with restricted geographic areas were found. In G1, the most polymorphic species was S1/*P. brasiliensis* (19 haplotypes, HD of 0.655 and K of 4.613) followed by *P. lutzii* (12 haplotypes, HD of 0.649 and K of 2906), however the division of the S1/*P. brasiliensis* isolates was not found in S1a and S1b. In G2, 31 STs were found, of which 15 were S1/*P. brasiliensis* (13 exclusive to the present study), eight *P. lutzii*, five PS2/*P. American* (one exclusive to the present study, ST9) and two PS3/*P. restrepiensis*. In G2, the analysis of the number of populations showed a K=5 and there was a differentiation between S1a and S1b, with 20 of the isolates in the present study grouped in S1b. In both groups, the *GP43* locus was the most variable and the most discriminating of species, while the ITS region showed ATs shared by different cryptic species of *Paracoccidioides*. The minimum spanning tree analysis showed two large groups, one composed exclusively of *P. lutzii* isolates and the other that included the remaining species and correlations of the founder group (GF) GF7 with the mixed type of the disease and with the geographic origin and GF16 with chronic diseases. The results obtained confirm that S1/*P. brasiliensis* is the predominant species in southeastern Brazil and has high intraspecific genetic variability.

Keywords: Paracoccidioidomycosis; S1/*P. brasiliensis*; PS2/*Paracoccidioides americana*; ARF; GP43; ITS, MLST.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Padrões de distribuição das espécies de <i>Paracoccidioides</i> na América do Sul..	17
Figura 2 - Áreas historicamente importantes de alta endemicidade da doença.....	25
Figura 3 - Análise de decomposição dividida do <i>locus ARF</i> (A), <i>locus GP43</i> (B) e <i>ARF + GP43</i> (C) concatenados dos 175 <i>Paracoccidioides</i> spp. estudados	44
Figura 4 - Rede de haplótipos de junção mediana de 175 <i>Paracoccidioides</i> spp. com base em sequências de nucleotídeos concatenadas dos <i>loci GP43 + ARF</i>	45
Figura 5 - Análise filogenética de 45 haplótipos de <i>Paracoccidioides</i> spp.....	49
Figura 6 - Análise da estrutura de 45 isolados de <i>Paracoccidioides</i> spp. de acordo com dados de sequenciamento dos <i>loci (ARF + GP43 + ITS)</i> (A) mostra o número real de subpopulações e (B) mostra que $K = 5$	51
Figura 7 - Número Ótimo de <i>loci</i> (A), dados sobre o número de <i>loci</i> descritos pelo software MLSTest (B).....	52
Figura 8 - Análise de decomposição de divisão dos tipos de alelos (ATs) e tipos de sequencias (STs) presentes nos isolados avaliados	53
Figura 9 - Análise filogenética de 45 isolados de <i>Paracoccidioides</i> spp	57
Figura 10 - Gráfico de escala multidimensional clássico dos 31 STs encontrados em 45 isolados de <i>Paracoccidioides</i> spp.....	59
Figura 11 - Árvore geradora mínima de 23 isolados de <i>Paracoccidioides</i> spp. avaliados por meio do algoritmo goeBURST.....	61
Figura 12 - Árvore geradora mínima de 45 isolados de <i>Paracoccidioides</i> spp. mediante o algoritmo goeBURST.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais dados clínicos epidemiológicos de 23 pacientes com paracoccidioidomicose dos quais foram obtidos os isolados de <i>Paracoccidioides</i> spp.	42
Tabela 2: Principais dados clínicos epidemiológicos de 8 pacientes com PCM associada à infecção por HIV	43
Tabela 3. Polimorfismos de DNA em diferentes grupos para <i>loci GP43 + ARF</i> (G1) em 175 isolados de <i>Paracoccidioides</i> spp.	47
Tabela 4. Polimorfismos de DNA em diferentes grupos para os <i>loci GP43, ARF</i> e ITS1 (G2) de 45 isolados de <i>Paracoccidioides</i> spp.	55
Tabela S1: Dados gerais dos isolados de <i>Paracoccidioides</i> spp. avaliados no presente estudo.....	85

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ARF - fator de ribosilação parcial ADP
- AT - Tipos de alelos
- CC - complexo clonal
- DAPI - 4',6'-diamidino-2-fenilindol
- DLV - variante de *locus* duplo
- DNA - Ácido Desoxirribonucleico
- EBP - *Estrogen Binding Protein*
- GCPSR - *genealogic concordance for phylogenetic species recognition*
- GF - fundador de grupo
- GOEBURST - algoritmo goeBURST
- GP43 - glicoproteína de 43KDa
- GSL - glicosfingolipídios
- G1 - Grupo Um
- G2 - Grupo Dois
- H - número de haplótipos
- Hd - diversidade haplotípica
- HIV - Vírus da Imnodeficiência Humana
- ITS - espaçadores internos transcritos
- k - número médio de diferenças de nucleotídeos
- K - número real de populações
- LBA - lavado broncoalveolar
- LCR - líquido cefalorraquidiano
- L-Dopa - 3,4-diidroxi L- fenilalanina precursora da dopamina
- MAT - *mating type locus*
- MCMC - amostragem por Bayesian Monte- Carlo Markov Chain
- ML - árvore filogenética de máxima verossimilhança sem raiz
- MLST - *Multi-Locus Sequence Typing*
- MP - máxima parcimônia
- Mpb - Mega pares de base
- NJ - análise de vizinho
- p - diversidade de nucleotídeos
- pb - pares de base

PCM - Paracoccidioidomicose

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PGFE - Pulsed Field Gel Electrophoresis

PHI - índice de homoplasia pareada

PS2 - *phylogenetic species 2 - P. americana*

PS3 - *phylogenetic species 3 - P. restrepiensis*

PS4 - *phylogenetic species - P. venezuelensis*

S1 - *species 1 Paracoccidioides brasiliensis*

Rm - número mínimo de recombinações

S- número de sítios polimórficos

SLV - variante de *locus* único

ST - tipos de sequência

theta - método do estimador Watterson

TLV - variante de *locus* triplo

UPGMA - método de grupo de pares não ponderados com média aritmética

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 GENERALIDADES	14
1.2 <i>PARACOCCIDIOIDES</i> SP: TAXONOMIA E BIOLOGIA.....	14
1.3 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE <i>PARACODDIDIOIDES</i> SPP.....	19
1.4 ASPECTOS ECO-EPIDEMIOLÓGICOS DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE E SEUS AGENTES	23
1.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE.....	27
2. JUSTIFICATIVA	30
3. OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4. POPULAÇÃO E MÉTODOS.....	34
4.1 LOCAL DO ESTUDO E DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS.....	35
4.2 ISOLADOS FÚNGICOS.....	35
4.3 EXTRAÇÃO DE DNA E SELEÇÃO DE <i>LOCI</i> -ALVO.....	35
4.4 PCR DOS ISOLADOS DE <i>PARACOCCIDIOIDES</i> SPP	35
4.5 <i>MULTILOCUS SEQUENCE TYPING</i> (MLST).....	36
4.6 ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	36
4.7 goeBURST E ESTRUTURA POPULACIONAL.....	37
4.8 OTIMIZAÇÃO DO NÚMERO DE <i>LOCI</i>	38
4.9 DIVERSIDADE DE NUCLEOTÍDEOS	38
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
4.11 ASPECTOS ÉTICOS.....	39
5. RESULTADOS	40
5.1 DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DOS PACIENTES COM PCM.....	41
5.2 DIVERSIDADE DE HAPLÓTIPOS (<i>GP43+ARF</i>).....	43

5.3 ESTRUTURA DA POPULAÇÃO E NÚMERO DE SEQUENCE TYPES (STS) ENCONTRADOS	50
5.4 <i>MULTILOCUS SEQUENCE TYPING</i> (MLST) <i>ARF</i> + <i>GP43</i> + ITS.....	52
5.5 A ÁRVORE DE ABRANGÊNCIA MÍNIMA	60
6. DISCUSSÃO	65
7. CONCLUSÕES.....	72
8. REFERÊNCIAS	74
9. ANEXOS	84

1. INTRODUÇÃO

1.1 Generalidades

O reino Fungi apresenta aproximadamente 1,5 milhão de espécies e é o segundo maior reino entre os eucariotos. Até o presente momento foram descritas algo em torno de 100.000 espécies fúngicas, as quais incluem mais de 1500 espécies de leveduras (Fell et al. 1992; Boekhout 2005). O gênero *Paracoccidioides* é classificado como o oitavo maior causador entre as infecções crônicas causadas por patógenos eucarióticos (Coutinho et al. 2002; Pinheiro et al. 2020).

Adolpho Lutz descreveu a paracoccidioidomicose como uma doença caracterizada por úlceras que destruíam a mucosa da gengiva e o véu palatino associado ao acometimento ganglionar e qualificando-a como micose pseudococcídica após identificar seu agente causal, um fungo de natureza dimórfica distinta do *Coccidioides immitis* (Benedek 1956).

Miguel Pereira e Gaspar Viana (1911) descreveram o primeiro caso de comprometimento pulmonar da PCM na forma disseminada (Lutz 1908). Em 1919, foi feito o diagnóstico da PCM com acometimento exclusivamente pulmonar (Lacaz 1982) em razão de apresentar semelhança com o *Coccidioides* sp., Floriano Paulo de Almeida (F. P. Almeida 1930), propõe uma nova classificação ao diferenciar o granuloma coccidióico nos Estados Unidos e no Brasil (Bogliolo 1947). Desta forma criou-se novo gênero *Paracoccidioides* dentro do reino Fungi e revalidado assim o nome da espécie criada (Lacaz 1982). Várias propostas de nomes foram feitas para denominar o agente da PCM, antes da aceitação universal de *Paracoccidioides brasiliensis* (Lacaz Cda 1963). O termo paracoccidioidomicose foi então estabelecido em Medellín na Colômbia no ano de 1971 (Lacaz 1982).

1.2 *Paracoccidioides* spp.: taxonomia e biologia

Para se delimitar um fungo clinicamente relevante deve-se reunir um conjunto de informações genótípicas e fenótípicas também relevantes (de Hoog et al. 2015). Os complexos processos de especiação fazem com que os tempos de divergência entre pares de espécies variem entre 0,03 e 33,00 milhões de anos principalmente devido a notável sobreposição geográfica entre essas (de Melo Teixeira et al. 2020). A taxonomia traduz então diferenças reais, relacionadas a manifestações clínicas, virulência, sensibilidade

diferencial ao tratamento com agentes antifúngicos dentre outras diferenças entre as espécies (Pinheiro et al. 2020).

Desde a primeira descrição de *Paracoccidioides* sp em 1908, a espécie foi considerada como única por mais de um século, entretanto diversos estudos que avaliaram aspectos genéticos, morfológicos e de distribuição geográfica, apoiaram a divisão em duas espécies: *P. brasiliensis* e *P. lutzii* (Marques-da-Silva et al. 2012). Tal definição se baseou no reconhecimento filogenético de espécie, com base na concordância em critérios genealógicos (Bocca et al. 2013), principalmente devido o longo período de isolamento genético de 24-32 milhões de anos atrás entre elas (Teixeira et al. 2009); falta de fluxo gênico entre *P. brasiliensis* e *P. lutzii* como evidenciado por análises de recombinação pelas características genômicas totais, como tamanho do genoma e do conteúdo dos genes (Desjardins et al. 2011); e por diferenças morfológicas nas células conidiais (Teixeira et al. 2009; Teixeira Mde et al. 2013). Contudo, ainda existem muitas lacunas no conhecimento desse fungo no que tange a sua taxonomia, reprodução e interação com o hospedeiro (Bocca et al. 2013).

Paracoccidioides pertence ao Filo *Ascomycota*, Classe *Eumycetes*, família *Ajellomycetaceae* e à ordem *Onygenaceae* que inclui os anamorfos *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Emmonsia parva*, *Emmonsia crescens* e *Lacazia loboi* (Herr et al. 2001; San-Blas et al. 2002).

Todos os membros desta família, podem ter evoluído em estreita associação com hospedeiros vertebrados, apresentando fase sapróbica no solo e/ou fezes de aves e uma fase parasítica no tecido hospedeiro (Untereiner et al. 2004; Bagagli et al. 2006). Todos os fungos pertencentes a essa família, exceto *Lacazia loboi*, apresentam pelo menos dois nichos ecológicos, devido ao seu ciclo de vida duplo, ou seja, sapróbico e parasitário (Arantes et al. 2015). *Paracoccidioides* spp. crescem como leveduras à 37°C em tecidos, e como micélios, produzem esporos assexuais infecciosos ou conídios, a 25°C ou no solo (Franco et al. 1987).

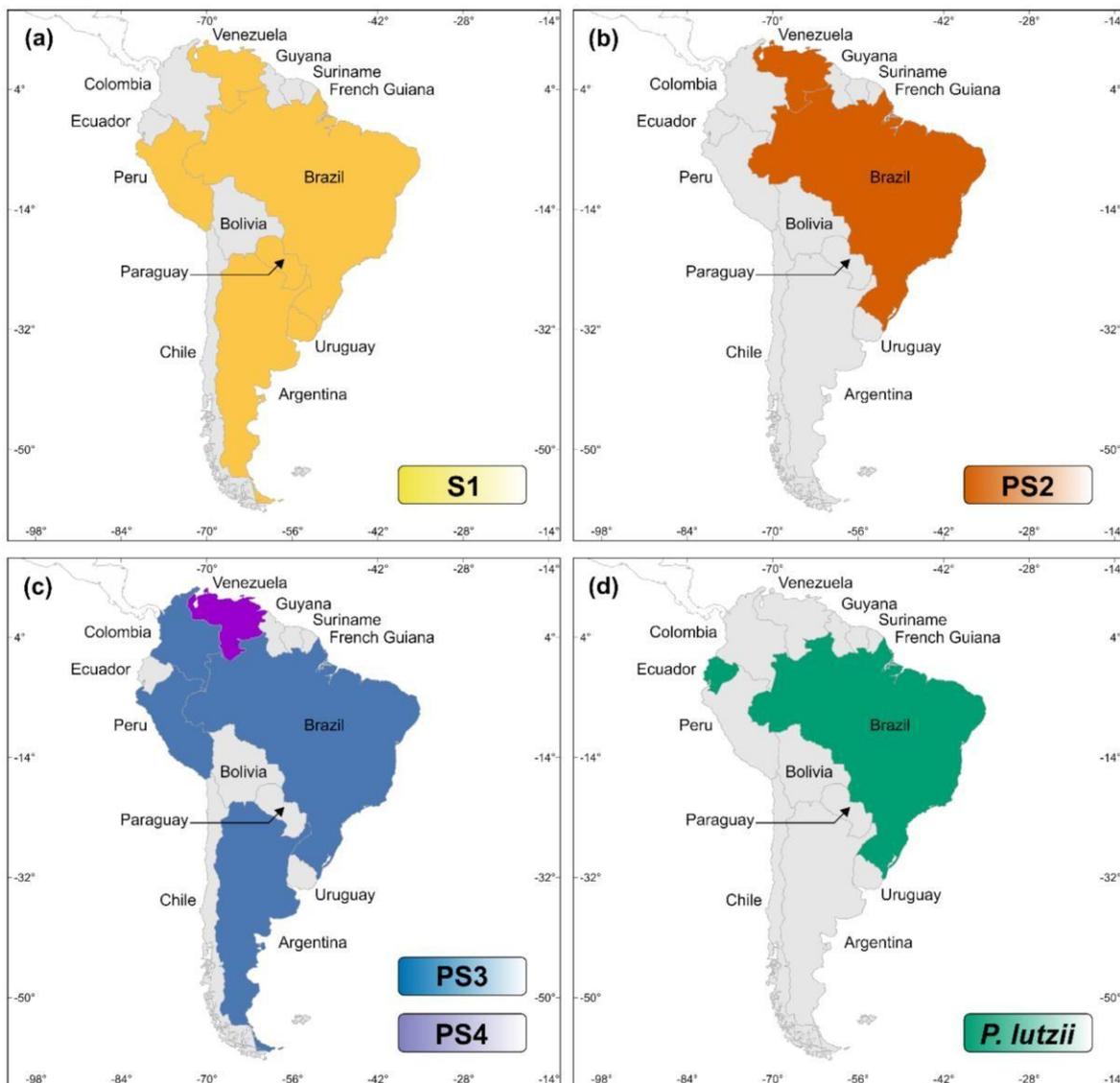
Na atualidade, o complexo *P. brasiliensis*, refere-se à um complexo de espécies composto por pelo menos 5 grupos geneticamente isolados e distintos:

Paracoccidioides brasiliensis (S1) encontrada, principalmente nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, *P. americana* (PS2), espécie menos frequente, e distribuídas na Venezuela e região Sudeste do Brasil, *P. restrepiensis* (PS3) e *P. venezuelensis* (PS4),

ambos distribuídos na Colômbia e Venezuela (Matute et al. 2006b; Teixeira et al. 2009; Barreto et al. 2010; Theodoro et al. 2012).

Paracoccidioides lutzii (anteriormente 'Pb01-like') (Matute et al. 2006b; Teixeira Mde et al. 2013) compreende uma única espécie predominantemente distribuída na região Centro-Oeste mais especificamente no estados do Mato Grosso e do Amazonas no Brasil e também na Amazônia do Equador (Teixeira et al. 2009). No entanto, os dados clínicos e epidemiológicos disponíveis sobre PCM causada por esta espécie ainda são muito limitados (Hahn et al. 2019; Nery et al. 2021). De acordo com estudos filogenéticos em diferentes isolados de *Paracoccidioides* spp. provenientes de diversas áreas endêmicas da América Latina, (Figura 1) os isolados de *P. lutzii* são responsáveis pela alta variabilidade antigênica das espécies (Hahn et al. 2014; Teixeira Mde et al. 2014; Pinheiro et al. 2020).

Figura 1. Padrões de distribuição das espécies de *Paracoccidioides* na América do Sul.



Padrões de distribuição das espécies de *Paracoccidioides* na América do Sul, com base em dados epidemiológicos relatos onde (a) *P. brasiliensis sensu stricto* (S1); (b) *P. americana* (PS2); (c) *P. restrepiensis* (PS3) e *P. venezuelensis* (PS4); (d) *P. lutzii*.

Fonte: (Hrycyk et al. 2018; Cocio et al. 2020; Pinheiro et al. 2020; Teixeira et al. 2020).

De acordo com as evidências atuais, é possível definir que se as espécies são geneticamente separadas, elas podem acumular algumas diferenças morfológicas que resultam na ocupação de novos nichos ecológicos, e em diferentes estratégias de sobrevivência nos ambientes sapróbio ou no hospedeiro invertebrado (Teixeira Mde et al. 2014).

Todas as espécies do gênero *Paracoccidioides* spp são caracterizados pelo desenvolvimento à 28°C em temperatura ambiente e *in vitro* de um micélio hialino septado com clamidioconídios e raramente conídios < 5 micrômetros chamados propágulos. Quando induzidos às temperaturas de 35-37°C, *in vitro*, os propágulos se transformam em leveduras de aspecto ovalado e tamanho variável (4-40 microns). Estas são frequentemente observadas com brotamentos de células filhas em sua periferia que resultam em uma estrutura semelhante a uma roda de leme. Esta é uma de suas principais características na microscopia, o que explica o aparecimento de uma grande quantidade de grumos quando o fungo é cultivado em meio líquido (Brummer et al. 1993).

Apesar de ser capaz de completar seu ciclo de vida no solo, presume-se que a forma micelial, no seu ambiente natural, produza conídios, os quais agem como propágulos infecciosos, que ao serem inalados chegam aos pulmões, onde passam por uma mudança para a forma de levedura e assim se estabelece a infecção (Brummer et al. 1989; Bagagli et al. 2008).

Os hormônios femininos (estrógenos) são capazes de inibir a transição do fungo de micélio para levedura e conídio para levedura, uma vez que atuam em uma etapa crucial no estabelecimento da infecção (Restrepo et al. 1984). A (*Estrogen Binding Protein* – EBP) proteína responsável pela ligação do estrógeno ao citoplasma do fungo traz um efeito protetor nas mulheres (Franco et al. 1987; Franco et al. 1993; Shankar et al. 2011).

O dimorfismo é fundamental para o estabelecimento da infecção, depende basicamente da temperatura e pode ser facilmente reproduzido *in vitro* a partir da simples mudança na temperatura de cultivo do microrganismo. As alterações morfológicas quando o fungo assume a forma de levedura envolvem um aumento na quantidade de quitina, presença de estrogênio, mudanças na membrana celular com diferenças nos glicosíngolipídios (GSL) e aumento da porcentagem de α -1,3-glucana na parede celular (Borges-Walmsley et al. 2002).

A relação entre *Paracoccidioides* spp. e seus hospedeiros, em particular o homem, sugere que a virulência destes microorganismos tem apresentado uma lenta evolução, nos últimos 20-30 milhões de anos, incluídos o dimorfismo termo dependente e a aderência às células do hospedeiro, sob a presença de α -1,3-glucana na composição da parede celular e produção de enzimas como proteases, lipases e fosfolipases (San-Blas and Vernet 1977; Mendes-Giannini et al. 2004).

O polissacarídeo α -1,3-glucana considerado fator de virulência do fungo, localizado na parte externa da parede celular de leveduras de *P. brasiliensis* leva à diminuição da espessura da parede mensurada por microscopia eletrônica e perda da sua virulência em modelos animais, e em cultivos por tempo prolongado. Uma das mudanças deste microorganismo durante sua transição dimórfica envolve a alteração de β -1,3-glucana para α -1,3-glucana. Isolados mais virulentos possuem uma maior porcentagem de α -1,3-glucana em sua parede celular (Borges-Walmsley et al. 2002).

Um importante fator de virulência fúngico é a tolerância à temperatura, uma vez que a maioria dos hospedeiros vertebrados possui uma temperatura corporal mais elevada que a temperatura ambiente. A temperatura corporal elevada é um importante mecanismo de defesa contra fungos, uma vez que a maioria desses cresce melhor à temperatura ambiente (Kurokawa et al. 1999; Casadevall and Pirofski 2012).

Proteína *GP43*, fator de virulência característico de *Paracoccidioides* spp., constitui o mais importante antígeno exocelular na fase leveduriforme (Puccia et al. 1986; Travassos et al. 1995; de Camargo and de Franco 2000; Mendes-Giannini et al. 2000). Está localizada na parede celular que é responsável pela adesão do fungo a componentes da matriz celular como laminina e mostra efeito proteolítico sobre colágeno, elastina e caseína (Mendes-Giannini et al. 1990; Vicentini et al. 1994; Torres et al. 2013).

Em camundongos a *GP43* inibe a capacidade de fagocitose de macrófagos, bem como sua atividade fungicida. A forma como um antígeno é capturado e processado por diferentes células apresentadoras vai depender de diversos fatores como a rota de entrada desse antígeno ou o estado imune do hospedeiro (Popi et al. 2008; Queiroz Junior Lde et al. 2014). A melanina, produzida por *P. brasiliensis* na presença de L-Dopa (Silva et al. 2006), diminui a taxa de fagocitose independente da origem do macrófago. A normalização da fagocitose é estabelecida após a adição de anticorpos específicos anti-melanina ao meio onde se encontra o fungo (Borges-Walmsley et al. 2002).

1.3 Caracterização genética de *Paracoccidioides* spp.

O tamanho inicial do genoma de *P. brasiliensis* foi estimado entre 23 à 31Mpb (; Montoya et al. 1997; Montoya et al. 1999; Feitosa Ldos et al. 2003; A. J. Almeida et al. 2007), com a presença de 4 ou 5 bandas cromossômicas entre 2 à 10Mpb de tamanho (Feitosa Ldos et al. 2003). No entanto, experimentos de microfluorometria por meio de marcação com 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) mostraram valores duas vezes maiores que os obtidos por PGFE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) (Cano et al. 1998).

Desta forma, a ploidia deste fungo ainda não está totalmente esclarecida, pois existem evidências tanto de haploidia ou aneuploidia (A. J. Almeida et al. 2007), quanto de diploidia (Cisalpino et al. 1996; Morais et al. 2000). Por meio de análises morfológicas e moleculares, tais como recombinação, presença do *locus* MAT, presença e expressão de genes e a formação de ascocarpos, tem sido sugerida a ocorrência de reprodução sexuada nas espécies de *Paracoccidioides* (Teixeira Mde et al. 2013) e também a recombinação gênica intraespécie (Costa et al. 2007). Diferente de espécies fúngicas geneticamente próximas, ainda não foi observado um estágio sexual em *P. brasiliensis*.

Entretanto, estudos moleculares mostraram eventos de recombinação em populações isoladas do gênero *Paracoccidioides* que sugerem a existência de um ciclo sexual (Gomes-Rezende et al. 2012). Com base em estudos de genômica comparativa com outros fungos dimórficos existem genes conservados envolvidos na reprodução sexuada, mas a forma teleomórfica desse fungo ainda é desconhecida, o que dificulta sua classificação que continua baseada em estudos de comparação filogenética de sequenciamento do DNA (Leclerc et al. 1994; Teixeira Mde et al. 2013).

Os genomas estruturais de três isolados do gênero *Paracoccidioides* (*Pb01*, *Pb03* e *Pb18*) foram finalizados por meio do projeto denominado “Genômica comparativa de *Coccidioides* e outros fungos dimórficos”. Os resultados do genoma completo de três diferentes isolados *Pb01*, *Pb03* e *Pb18* encontram-se depositados, (Broad Institute, <http://www.broad.mit.edu/tools/data/seq.html>).

O genoma de *Pb01* (mais tarde denominado *P. lutzii*) é composto de 32,94 Mpb, com um total de 9.132 genes. Apresenta o genoma maior, tanto em número de bases quanto em quantidade de genes, comparado aos outros dois isolados analisados, que apresentaram genomas do tamanho de 29,06 e 29,95 Mpb, com número de genes de 7.875 e 8.741 (dados dos isolados *Pb03* e *Pb18*, respectivamente). Estes fatos, além de auxiliar na compreensão das diferenças existentes entre os isolados, favorecem a caracterização de genes e suas regiões promotoras, e o desenvolvimento de novas ferramentas biomoleculares e genéticas para a elucidação de aspectos da biologia de *Paracoccidioides* spp. (Matute et al. 2006b).

A variabilidade genética existente entre os diferentes isolados reforça a diferença na sua virulência (Singer-Vermees et al. 1989; Soares et al. 1995). Recentemente foram descritas três espécies crípticas no complexo *P. brasiliensis*, dentre as quais duas são espécies filogenéticas (PS2, composto por isolados brasileiros e venezuelanos e PS3, restrito a isolados da Colômbia) e a S1 é uma espécie parafilética (distribuída no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela) (Turissini et al. 2017).

Também foi evidenciado que, enquanto S1 e PS2 eram considerados espécies sexuais recombinantes, PS3 demonstrou ser clonal (Matute et al. 2006b; Matute et al. 2006a). A diferenciação de espécies também levou em conta diferenças no fenótipo de crescimento, colônia micelial, produção de conídios, transição micélio-levedura, aspecto microscópico da levedura (brotamento, tamanho e forma das células), virulência e tolerância térmica (Macoris et al. 2006; Richini-Pereira et al. 2008).

A falta de reatividade a antígenos desse fungo encontrada em pacientes com PCM fora das regiões endêmicas do Sul e Sudeste sugeriu que poderia haver mais de uma espécie de *P. brasiliensis* (del Negro et al. 1995; Vidal et al. 2005). Esta nova espécie, no caso *P. lutzii*, tem sido isolada de pacientes com PCM principalmente na região Centro Oeste do Brasil, porém a sua ecologia, limites geográficos e aspectos clínicos relacionados permanecem desconhecidos (Teixeira et al. 2014b; Nobrega de Almeida et al. 2015). *P. lutzii* considerada a mais divergente dentre as espécies é predominante, embora não exclusivamente, dessa região do Brasil (Teixeira et al. 2009; Hahn et al. 2019;).

Atualmente, os agentes etiológicos da PCM humana são englobados em pelo menos 5 espécies: *Paracoccidioides brasiliensis* (Espécie S1), *Paracoccidioides americana* (grupo filogenético PS2), *Paracoccidioides restrepiensis* (grupo filogenético PS3), *Paracoccidioides venezuelensis* (grupo filogenético f PS4), e *Paracoccidioides lutzii* (Espécie Pb01-like) (Teixeira Mde et al. 2014; Turissini et al. 2017).

Paracoccidioides restrepiensis e *P. venezuelensis* são geograficamente restritas à Colômbia e Venezuela respectivamente, enquanto *P. brasiliensis*, *P. americana* e *P. lutzii* têm ocorrência em países da América Latina (Theodoro et al. 2012; Turissini et al. 2017). Eventos de recombinação entre as espécies *P. brasiliensis* S1, PS2 e *P. lutzii* foram detectadas por teste de partição de homogeneidade e método de decomposição enquanto a espécie *P. brasiliensis* PS3 foi considerada clonal (Matute et al. 2006b; Teixeira et al. 2009). *Paracoccidioides lutzii* constitui um genótipo único que é endêmico ao norte da região Centro-Oeste do Brasil e no Equador e está geneticamente distante do antigo complexo de *P. brasiliensis* (Teixeira et al. 2009; Teixeira et al. 2014b; Teixeira et al. 2014a).

Além disso, variações genéticas descritas em regiões codificantes de *P. brasiliensis* indicam que pode haver, ainda, mais espécies filogenéticas além das atualmente descritas (de Macedo et al. 2019). Desde que espécies crípticas distintas foram reconhecidas por meio de técnicas moleculares, detectar outras características biológicas que podem ser associadas com os diferentes genótipos, tornou-se mais fácil e confiável. A ocorrência de diferenças fenotípicas em áreas geográficas já foram descritas entre as espécies de *Paracoccidioides* (Tercarioli et al. 2007; Bagagli et al. 2008; Theodoro et al. 2008b; Richini-Pereira et al. 2009).

Técnicas moleculares tem sido utilizadas para a caracterização genética de *Paracoccidioides* spp dentre elas a de *Southern blot* (Cisalpino et al. 1996), citometria de fluxo (A. J. Almeida et al. 2007), *Pulsed field gel electrophoresis* (PGFE) (Cano et al. 1998), sequenciamento de microssatélites (Matute et al. 2006a), sequenciamento de apenas um *locus* (Theodoro et al. 2008a), sequenciamento *multilocus* (MLST) (Matute et al. 2006b; Carrero et al. 2008; Teixeira et al. 2009) e sequenciamento do genoma inteiro (Desjardins et al. 2011).

O sequenciamento *multilocus* utiliza sequências de nucleotídeos com aproximadamente 500 pares de bases (pb) de diferentes *housekeeping* genes ou de diferentes *loci* para caracterizar a diversidade genética de micro-organismos patogênicos. A escolha dos genes *housekeeping* decorre do pressuposto que eles estão sob moderada a forte pressão seletiva e assim as variações nas sequências são mais neutras. Essa técnica tornou-se popular porque diferentes amostras podem apresentar grande diversidade de sítios polimórficos em suas sequências de nucleotídeos e porque cada novo estudo pode usar e adicionar novos dados aos já existentes. Os dados obtidos pelo *MultiLocus Sequence Typing* (MLST) podem ser utilizados para avaliar vários aspectos como: diferenciação de espécies, reconhecimento de populações dentro de uma determinada espécie, definir se um microorganismo é puramente clonal ou se passou por recombinação, associar características genéticas com as fenotípicas e atribuir a origem de um indivíduo desconhecido (Taylor e Fisher 2003). O conceito filogenético de espécie, que detecta divergência genética entre populações por meio da concordância das genealogias de genes utilizando o MLST, é considerado na atualidade um dos métodos mais apropriados para o reconhecimento das espécies de fungos (Taylor et al. 2000).

Embora não haja um consenso claro sobre se S1, PS2 e PS3 são variantes geográficas de uma única espécie ou espécies separadas distintas (Matute et al. 2006b; Matute et al. 2006a), estes clados ao igual que *P. lutzii* são reprodutivamente isolados na natureza, como revelado pela Análise Decomposição Dividida (Matute et al. 2006b; Teixeira et al. 2009). Uma vez que o isolamento reprodutivo ou genético é o primeiro passo na divergência de espécies (Taylor et al. 2000), pode levar ao reconhecimento de diferenças morfológicas e fisiológicas, que tenham relação com a forma clínica da PCM e com a resposta ao tratamento.

1.4 Aspectos eco-epidemiológicos da paracoccidioidomicose e seus agentes.

Estudos sobre a distribuição de espécies de *Paracoccidioides* têm baseado mais em isolados de pacientes e pouco em isolados ambientais pela raridade do isolamento natural deste microorganismo (Bagagli et al. 2008).

Na atualidade é aceito que *Paracoccidioides* sp. tem o seu habitat (físico e localização geográfica) no solo, porém seu nicho ecológico (soma de todas as interações do microorganismo com os fatores bióticos e abióticos do ambiente) permanece sem ser esclarecido (Franco et al. 2000).

A caracterização do habitat do fungo no estado saprofítico é complexa, principalmente devido à latência prolongada do fungo no ambiente externo (Bagagli et al. 2008) e em função da grande heterogeneidade de solos e climas na América Latina (Ono et al. 2002). *Paracoccidioides* spp. foram isolados no solo em duas ocasiões bem descritas e aceitas na comunidade científica (De Albornoz 1971; Silva-Vergara et al. 1998). Também é encontrado em associação com animais de sangue quente, (com temperatura corporal variando entre 32,7°C e 35,3°C) como os tatus (*Dasyurus novencinctus* e *Cabassous centralis*) (Vergara and Martinez 1998; Corredor et al. 1999) em regiões endêmicas da PCM (Silva-Vergara et al. 2000; Bagagli et al. 2003). Embora este fungo tenha sido raramente isolado de fontes saprobióticas, as espécies do complexo *P. brasiliensis* tem sido habitualmente recuperadas de amostras clínicas humanas e de vísceras de tatu (Franco et al. 2000), já *P. lutzii* ainda não foi isolado do último (Munoz et al. 2014; Pinheiro et al. 2020).

O estudo molecular de isolados de *Paracoccidioides* spp. obtidos de tatus, pode auxiliar na compreensão da ecologia e evolução desse patógeno. Diversos autores avaliaram este marsupial na busca sobre seu papel como hospedeiro no ciclo epidemiológico do fungo (Corredor et al. 1999; Silva-Vergara et al. 2000; Bagagli et al. 2006).

Tatus infectados são comumente encontrados em áreas com sombra, perto de rios e com solos tanto argilosos quanto arenosos, o que sugere que a umidade é um fator importante para a ocorrência do fungo, enquanto que o tipo de solo parece não ter grande influência, apesar da infecção em humanos ser mais prevalente em regiões com solos argilosos (Simoes et al. 2004; Bagagli et al. 2008). Na tentativa de elucidar melhor aspectos ecológicos de *Paracoccidioides* spp. tem sido utilizados testes sorológicos, intradérmicos e/ou moleculares para a caracterização da infecção em cães domésticos (Fontana et al. 2010), primatas (Corte et al. 2007), diversos animais silvestres atropelados, (Costa et al. 2007), mamíferos como golfinho branco do pacífico, no Japão (Minakawa et al. 2016), gatos residentes na área rural (Oliveira et al. 2013), cães da zona rural da Argentina (Canteros et al. 2010) e também no Sul do Brasil (Headley et al. 2017), ovinos da região Sul do Brasil (Oliveira et al. 2012), cabras leiteiras (Ferreira et al. 2013), equinos no Rio Grande do Sul (Albano et al. 2015) dentre outros.

A região Sudeste composta pelos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Minas Gerais, (Figura 2) tem áreas historicamente importantes de alta endemicidade da doença (Martinez 2017). Contudo, existem regiões consideradas endêmicas que ainda não possuem um mapeamento geográfico confiável dos casos.

No sul do Brasil, na Argentina e Paraguai, os quadros agudo-subagudos da PCM são muito raros (Rolon 1976; Colares et al. 1998; Paniago et al. 2003), o que sugere que diferentes aspectos ecológicos, climáticos e/ou geológicos ou relacionados à espécie infectada poderiam influenciar a distribuição geográfica das formas clínicas da doença (Fabris et al. 2014).

Figura 2: Áreas historicamente importantes, consideradas de alta endemicidade da doença.

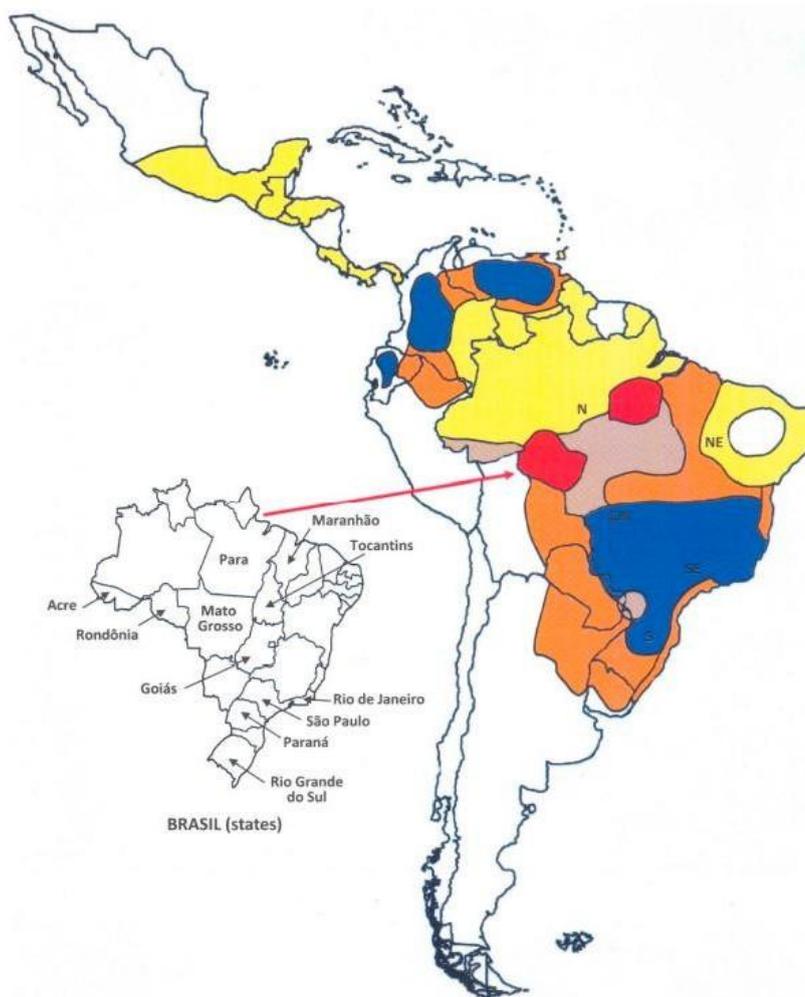


Figura 2: Áreas geográficas da endemicidade da paracoccidioidomicose na América Latina: (◆) Primeiras áreas reconhecidas de alta endemicidade; (◆) alta endemicidade observada desde as últimas décadas do século XX; (◆) área com alguma evidência recente de endemicidade crescente; (◆) áreas de endemicidade moderada; baixa endemicidade; (◆) não há áreas ou casos raros de paracoccidioidomicose relatados nesses países ou regiões.

Fonte: (Martinez 2017).

No Brasil ocorrem aproximadamente 200 mortes por ano em virtude da PCM, sendo os estados mais afetados São Paulo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso e Rondônia (Coutinho et al. 2002; Vieira Gde et al. 2014). A PCM tem se tornado emergente em outras regiões em decorrência de perturbações ambientais e também tem sido sugerida como uma infecção oportunista em portadores de HIV, embora sua frequência não tenha aumentado em relação à população geral (Morejon et al. 2009). Por outro lado, deve se destacar a baixa ocorrência dessa micose na América Central e sua ausência no Chile, Antilhas e Guianas (Wanke e Aide 2009; Ameen 2010).

Apesar da importância desses dados, essa micose da mesma forma que as outras micoses não possui registros oficiais de ocorrência e não recebe atenção adequada por parte das autoridades de saúde dos países onde ela é endêmica, o que permitiria promover avanços principalmente no diagnóstico e tratamento (Hahn et al. 2019). A PCM é considerada uma doença negligenciada com baixa visibilidade pública no Brasil e na América Latina como um todo (Martinez 2010).

Estimativas sobre a incidência anual de novos casos varia em áreas endêmicas de 1 a 3 novos casos por 10^5 habitantes (Blotta et al. 1999; Bellissimo-Rodrigues et al. 2011). A doença ocorre predominantemente em indivíduos do sexo masculino entre a 3^a e a 5^a década de vida. Apesar do contato com o fungo ser muito frequente, acredita-se que, apenas uma minoria irá desenvolver a doença, pois a evolução da infecção está intimamente relacionada com o estado imunológico do indivíduo (Londero et al. 1986; Wanke e Aide 2009).

No Brasil, essa incidência anual da PCM pode variar de 0,71 casos a 3,70 casos por 100 mil habitantes (Martinez 2017). A taxa de letalidade da PCM varia de 2% a 23%; pode atingir 30% quando associada à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Coutinho et al. 2002; Morejon et al. 2009).

Entre 1980 a 1995 a PCM foi responsável por 3.181 casos de mortes no país, o que resulta em uma taxa de mortalidade de 1,45 casos por milhão de habitantes (2,59 para a região Sul, 2,35 para a região Centro-Oeste, 1,81 para o Sudeste, 1,08 para o Norte e 0,20 para o Nordeste). Cerca de 50% dos casos de morte por micoses sistêmicas no Brasil durante o período de 1996 a 2006 foram decorrentes da PCM, além de deixar frequentes sequelas secundárias permanentes que comprometem a qualidade de vida do paciente (Barrozo et al. 2009; Benard et al. 1995; Martinez 2010, 2017; Prado et al. 2009).

No Brasil, o estado de Minas Gerais aparece em décimo primeiro lugar, com taxa de mortalidade de 1,66/milhão de habitantes, pouco acima da média nacional (Coutinho et al. 2002). A prevalência real no estado não está estabelecida devido ao fato de que a notificação de casos da doença não é obrigatória. No entanto, a infecção assintomática é muito frequente como tem sido demonstrada em praticamente todos os estados brasileiros por meio de inquéritos epidemiológicos com paracoccidioidina como intradermoreação. Em alguns destes estudos, a positividade do teste chegou a 60% entre os indivíduos avaliados o que confirma o alto grau da exposição ao fungo (Franco M et al. 1994; Martinez 2010; Wanke e Aide 2009).

A PCM representa a maior causa de mortalidade entre as micoses sistêmicas no Brasil e a oitava causa mais importante de mortalidade em doenças infecciosas crônicas, (Prado et al. 2009), com taxas de 1,65 óbitos por 10⁶ habitantes (Coutinho et al. 2002). A população mais acometida está mais associada à pobreza (Pinheiro et al. 2020) principalmente os residentes nas áreas endêmicas com os trabalhadores rurais, do sexo masculino, entre a 3 e 5 década de vida e sobretudo menos favorecidas (Franco et al. 2000).

Estima-se que aproximadamente 80% dos casos de PCM ocorrem no território brasileiro (Coutinho et al. 2015). Os estados de Rondônia e Mato Grosso, consideradas áreas hiperendêmicas do país com altas taxas de incidência anual de 9-40 casos / 100.000 habitantes (Martinez 2017; Shikanai-Yasuda et al. 2017). Segundo (de Macedo et al. 2019) a região Sudeste deve ser considerada de alta endemicidade para a doença, devido esta fazer fronteira com os estados de São Paulo e Goiás, considerados regiões endêmicas da doença no Brasil (Martinez 2010).

1.5 Manifestações clínicas da Paracoccidioidomicose

O estabelecimento da PCM, seus sintomas e gravidade dependem de fatores intrínsecos do fungo como virulência e composição antigênica, e condições do hospedeiro no que diz respeito à integridade do sistema imune (Calich et al. 2008; Casadevall e Pirofski 2012). Não há evidência de transmissão de PCM de animais para pessoas ou de pessoas entre si. A infecção pode ser contida por células do hospedeiro imunologicamente competente ou, caso contrário, disseminar-se para outros órgãos e tecidos por via linfática ou hematogênica, caracterizando assim a PCM doença. Pode ainda permanecer viável formando um foco quiescente, que pode ser ativado posteriormente, originando sinais e sintomas tardios da PCM ou mesmo recidivar décadas depois da primoinfecção como acontece na maioria dos casos crônicos (Benard et al. 2001; Franco et al. 1987; Franco et al. 1993; Mamoni e Blotta 2006; Theodoro et al. 2008b).

A reativação ocorre quando há desequilíbrio da relação fungo - hospedeiro, podendo a infecção ser controlada e / ou eliminada pelo sistema imunológico inato após a inalação de partículas do fungo, e acredita-se que seja a principal razão da maioria dos indivíduos permanecer assintomática (de Macedo et al. 2019).

O espectro clínico da PCM varia desde infecção assintomática até formas mais graves com disseminação sistêmica principalmente em indivíduos imunocomprometidos.

O momento e as circunstâncias em que ocorre a infecção é desconhecido (Motta et al. 2002). A doença tem sido relatada em crianças de até 3 anos de idade, em idosos e até antes em pessoas estrangeiras que vieram morar em áreas endêmicas onde se infectaram, e ao retornarem a seus países de origem, adoeceram anos ou décadas após terem contraído a infecção (Londero et al. 1986).

A doença desenvolve-se em algumas semanas ou meses após a exposição ao fungo e se caracteriza pelo acometimento pulmonar, mucoso, linfático e cutâneo (Martinez, 2017). Uma vez que ocorre a infecção, esta pode progredir para a forma aguda / subaguda da PCM que ocorre principalmente em adolescentes e adultos jovens. Cursa com acometimento do sistema fagocítico-mononuclear, pele e ossos longos e planos (Martinez and Moya 2009). A forma crônica da PCM ocorre em consequência de uma reativação endógena ou de nova infecção exógena, e representa 80% do total de casos e afeta principalmente homens adultos entre 30 e 50 anos com sintomatologia predominantemente respiratória e frequente envolvimento de mucosas (Restrepo et al. 2008).

A PCM afeta pacientes principalmente indivíduos imunocompetentes e menos os imunocomprometidos (de Macedo et al. 2019). De forma similar com outras doenças granulomatosas crônicas, os pacientes com PCM frequentemente tem agravantes à sua saúde, como o alcoolismo, o tabagismo, desnutrição, tuberculose, neoplasias, e aids dentre outras condições que cursam com imunossupressão (Motta et al. 2002; Martinez 2010; Bellissimo-Rodrigues et al. 2011). As recaídas são frequentes e as complicações e sequelas anatômicas e funcionais ocorrem em pelo menos 20% dos pacientes, entre eles a fibrose pulmonar, insuficiência respiratória crônica e a insuficiência adrenal crônica (Morejon et al. 2009; F. A. Almeida et al. 2017).

Desde 1989, quando foi relatado o primeiro caso de PCM associada com HIV, mais de 200 casos já foram relatados na literatura, embora a frequência destes casos não tenha grande diferença com imunocompetentes. Nesses pacientes a PCM apresentava manifestações clínicas mais agudas, graves e com tendência à disseminação (Benard and Duarte 2000; Morejon et al. 2009; F. A. Almeida et al. 2017).

2. JUSTIFICATIVA

A PCM é uma das micoses sistêmicas mais importantes na América Latina que afeta indivíduos das áreas rurais da Colômbia, Venezuela e principalmente do Brasil, onde ocorre a maioria dos casos descritos. A relevância da PCM reside na cronicidade da doença que exige tratamento prolongado, deixa sequelas permanentes principalmente fibrose pulmonar e representa um alto custo social e médico ainda não quantificado para os países onde ela é endêmica. Como as outras micoses a PCM não é notificada, não se sabe qual o real número de casos. Além disso, a superposição da PCM com a HIV/aids mudou a história natural desta micose a qual cursa com formas clínicas mais agudas, disseminadas e graves. Populações de fungos geneticamente distintas tendem a apresentar diferentes tipos de resposta ao hospedeiro, além de características fenotípicas exclusivas e particulares como diferentes níveis de virulência, resistência a antifúngicos, dentre outras. A identificação destas populações geneticamente diferentes dentro do gênero *Paracoccidioides* pode possibilitar a associação com diferentes fenótipos e/ou formas clínicas, além de contribuir para o conhecimento sobre a distribuição das diferentes espécies de *Paracoccidioides* e conseqüentemente para o mapeamento da distribuição geográfica destas espécies e seus genótipos no Brasil. Além disso, estudos filogenéticos, associados aos caracteres morfo/fisiológicos, das espécies deste gênero podem contribuir para uma melhor compreensão das relações patógeno-hospedeiro.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar aspectos biológicos, epidemiológicos e genéticos de isolados clínicos de *Paracoccidioides* spp.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar os dados clínicos epidemiológicos dos pacientes diagnosticados com paracoccidioidomicose dos quais foram obtidos por cultura os isolados de *Paracoccidioides* spp.
2. Sequenciar por MLST os *loci* *ARF*, *GP43* e ITS dos isolados clínicos de *Paracoccidioides* spp.
3. Definir as espécies de *Paracoccidioides* entre os isolados avaliados.
4. Correlacionar a variabilidade genética dos isolados de *Paracoccidioides* spp. com a forma clínica doença apresentada pelos pacientes.
5. Avaliar a variabilidade genética dos isolados frente às sequências de isolados de diferentes espécies e origens geográficas depositados no GenBank.

4. POPULAÇÃO E MÉTODOS

4.1 Local do estudo e dados clínicos e epidemiológicos

O hospital universitário da Universidade Federal do Triângulo Mineiro atende população de 27 municípios que compõem a macrorregião sul do Triângulo Mineiro e tem cobertura estimada de um milhão de habitantes, o que corresponde a cerca de 11% da população total do estado de Minas Gerais (IBGE 2019). Retrospectivamente, foram revisados os prontuários de pacientes com diagnóstico de PCM confirmado por cultura e outros métodos e internados na enfermaria de Doenças Infecciosas e Parasitárias de 2008 a 2019. Foram obtidos os dados demográficos, epidemiológicos, clínicos e evolutivos mais relevantes no contexto da PCM.

4.2 Isolados fúngicos

De 35 isolados clínicos de PCM inicialmente avaliados, somente 23 puderam ser incluídos neste estudo. Estes isolados foram identificados por métodos micológicos convencionais (Franco M et al. 1994). Destes, 10 foram obtidos por cultura de raspagem de lesão oral, 1 de líquido cefalorraquidiano (LCR), 6 de linfonodo, 3 de lavado broncoalveolar (LBA), 1 de fragmento de pele e 2 de sangue periférico (Tabela 1). Esses isolados foram preservados e mantidos em tubos contendo ágar Fava-Netto e subcultivados a cada 30-60 dias a 37°C (Fava Netto 1972).

4.3 Extração de DNA e seleção de *loci*-alvo

O DNA genômico foi extraído de células leveduriformes conforme descrito anteriormente (Ferrer et al. 2001). A quantificação e integridade do DNA foram avaliadas por meio do espectrofotômetro NanoDrop Lite, Thermo Scientific (SAMBROOK and RUSSELL 2001). Os *loci* *ARF*, *GP43* e ITS foram selecionados por serem os mais utilizados para identificação de isolados de *Paracoccidioides* spp. e assim possuir um maior número de sequências disponíveis em bancos de dados. Para os *loci* *ARF* e *GP43* dos 23 isolados, foram adicionadas 152 sequências de outros isolados de *Paracoccidioides* spp. obtidos de diferentes regiões do Brasil e de outros países, denominado G1 (Tabela 3). Para os *loci* *ARF*, *GP43* e ITS dos 23 isolados, foram adicionados 22 sequências do Brasil e de outros países da América Latina depositados no GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) denominado G2 (Tabela 4).

4.4 PCR dos isolados de *Paracoccidioides* spp.

As amostras de DNA foram utilizadas como molde para as ampliações por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do fator de ribosilação parcial ADP (*ARF*), da glicoproteína de 43 kDa (*GP43* - *GP43* exon 2) e região ITS1-5.8S-ITS2 usando a mistura mestre de OneTaq DNA da polimerase 2X PCR. A mistura continha 5 µL de solução tampão de reação 10X, 1 µL de iniciadores diretos (*ARF-F* 5'CATGGTTGGCCTCGATGCTGCC3', *GP43-E2F* 5'CCAGGAGGCGTGCAGGTGTCCC3' e ITS4 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') e reverso (*ARF-R* 5'GAGCCTCGACGACACGGTCACGATC3', *GP43-E2R* 5'GCCCCCTCCGTCTTCCATGTCC3' e ITS5- 5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3') (10 pM) previamente descritos, 5 µL de solução de trifosfato de desoxinucleosídeo (0.2 mM), 2 µL de solução de cloreto de magnésio (2 mM), 0.5 µL de Taq DNA polymerase (2.5 U), 100 ng de DNA genômico fúngico e água ultrapura em um volume de reação final de 50 µL. As condições de ciclagem foram adaptadas de acordo com outros autores (Carrero et al. 2008; Teixeira et al. 2009; Teixeira et al. 2014b; Marques de Macedo et al. 2016).

4.5 Multilocus sequence typing (MLST)

A análise do polimorfismo genético foi realizada pelas sequências concatenadas dos *loci* *ARF* + *GP43* + ITS. Os produtos de PCR foram purificados usando o kit PCR purification (250) - 28106 (Qiagen) e posteriormente submetidos ao sequenciamento Sanger. As sequências foram editadas manualmente usando o software Chromas-pro v. 1.7.6 disponível em <http://technelysium.com.au/ChromasPro.html>. Apenas sequências de nucleotídeos com pontuação de qualidade *Phred* ≥ 20 foram incluídas para limitar a possibilidade de incorporação de uma base incorreta a 1 em 100 (precisão de 99%). As sequências de consenso obtidas nas leituras direta e reversa foram geradas no software Chromas-pro 1.7.6. (Tamura et al. 2013). Os tipos de alelos (AT) e os tipos de sequência (ST) foram identificados pelo software MLSTest 1.0 (Tomasini et al. 2013).

4.6 Análise filogenética

A análise filogenética foi realizada no software MEGA 7.0 (Kumar et al. 2016; Tamura et al. 2013). As sequências de consenso dos isolados e daquelas obtidas em (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foram alinhadas usando o algoritmo Clustal W2 disponível em (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) (Thompson et al. 1994). As sequências alélicas para cada isolado foram concatenadas e as relações

evolutivas, com 1000 réplicas de *bootstrap*, foram inferidas pela construção de uma árvore filogenética de máxima verossimilhança sem raiz (ML). Além disso, o conjunto de dados foi submetido a análise de vizinho (NJ), máxima parcimônia (MP) e ao método de grupo de pares não ponderados com média aritmética (UPGMA) (Tamura et al. 2013). As espécies e genótipos de *Paracoccidioides* spp. foram confirmadas de acordo com o agrupamento filogenético com cepas de referência de cada espécie pela construção de uma árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) sem raiz.

4.7 goeBURST e estrutura populacional

O *minimum spanning tree* foi gerado usando o algoritmo goeBURST em PHILOVIZ II (<http://www.phyloviz.net/wiki/>) (Francisco et al. 2012). Esta análise foi gerada a partir das sequências concatenadas (*ARF* + *GP43* + ITS) para visualizar as relações das fontes clínicas ou ambientais ou as origens geográficas dos STs com os perfis alélicos. Os diagramas mostram onde a ST difere na variante de *locus* único (SLV), variante de *locus* duplo (DLV) e variante de *locus* triplo (TLV), respectivamente. O conceito de complexo clonal (CC) foi adotado quando uma ligação SLV com o ST fundador foi encontrada. Um fundador de grupo (GF) indica um STs com maior classificação nos gráficos disjuntos, considerando as regras de desempate de número de SLVs, DLVs, TLVs e frequência de ocorrência (Francisco et al. 2009; Francisco et al. 2012).

O número real de populações (K) e sua distribuição de acordo com a fonte e a região geográfica foi calculado usando o algoritmo estatístico Bayesiano (Pritchard et al. 2000) implementado no software STRUCTURE v2.3.4 (<http://pritchardlab.stanford.edu/structure.html>). STRUCTURE usa amostragem por Bayesian Monte- Carlo Markov Chain (MCMC) para identificar o número ideal de clusters K para um determinado conjunto de dados multi *locus*, sem exigir a identificação das subunidades populacionais a priori (Evanno et al. 2005). O modelo de mistura foi selecionado devido à possível presença de indivíduos migrantes entre cada população. Vinte execuções foram realizadas para cada valor de K, variando de 1 a 10. Cada execução consistiu em simulações de MCMC de 200.000 interações e um período de queima de algoritmo de 200.000 gerações (Pritchard et al. 2000).

O número K foi calculado usando o software Structure Harvester disponível em (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>) (vonHoldt et al. 2013). Nesta análise, cada linha vertical representa uma linhagem com seu tipo de sequência

correspondente, e a cor da linha representa a ancestralidade mais provável de cada indivíduo na população. Indivíduos com cores múltiplas têm genótipos misturados das subpopulações previamente definidas.

4.8 Otimização do número de *loci*

Para avaliar qual número de *loci* era a melhor opção na genotipagem por MLST foi utilizado o software MLSTest (Tomasini et al. 2013). Esta opção é útil para reduzir o número de *locus*, analisar e selecionar um bom número de *locus* a fim de obter a diversidade genotípica. Além disso, é útil determinar se a diversidade genotípica aumenta quando mais *loci* são adicionados ao esquema.

4.9 Diversidade de nucleotídeos

O software DNASP 5.10 (Librado e Rozas 2009) foi usado para calcular a extensão do polimorfismo de DNA, incluindo o número de sítios polimórficos (S), diversidade de nucleotídeos (p), número de haplótipos (h), diversidade de haplótipos (Hd) e número médio de diferenças de nucleotídeos (k). O teste de neutralidade D de Tajima, D * de Fu & Li, F * de Fu & Li e Fs de Fu também foram calculados. Os resultados negativos ou positivos desses testes fornecem evidências de seleção purificadora ou balanceadora, respectivamente. O método do estimador Watterson (theta) foi usado para determinar o grau de recombinação dentro da população usando o DNASP 5.10. A presença de recombinação também foi verificada por meio da medida das compatibilidades filogenéticas de sítios polimórficos próximos ao longo de sequências únicas e concatenadas em SplitsTree v. 4.13.1 (<http://www.splitstree.org/>) (Huson and Bryant 2006). Esta análise foi realizada aplicando as distâncias não corrigidas (observadas, 'P') na transformação de caracteres usando o algoritmo vizinho-rede (Huson and Bryant 2006). O índice de homoplasia pareada (PHI) foi usado para avaliar a significância estatística para recombinação.

4.10 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando DNAsp 5.10 (Librado e Rozas 2009), MS Excel (Microsoft Corporation) e SplitsTree v. 4.13.1 (Huson e Bryant 2006). Todos os valores de p menores que 5% ($P < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos.

4.11 Aspectos éticos

Todas as amostras fúngicas utilizadas neste estudo foram retiradas do acervo de culturas do Laboratório de Micologia da instituição. Para o registro dos dados epidemiológicos e clínicos dos pacientes com PCM, um código alfa numérico foi utilizada para identificar a ficha de cada um dos casos. O estudo foi aprovado pelo Comitê Institucional de Ética em Pesquisa com Seres Humanos sob registro protocolo 220 CIBIO/UFTM 50, 18/06/2015.

5. RESULTADOS

5.1 Dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes com PCM

Dentre os 23 pacientes avaliados, 18 (78,3%) eram homens, média de idade de 37,4 anos. A forma crônica estava presente em 10 (43,47%) dos casos, a forma aguda/subaguda em oito (34,83%) e a forma mista em cinco (21,74%) casos (Tabela 1). O diagnóstico de PCM foi feito em 23/23 (100%) dos casos por cultura e adicionalmente em 11/23 (47,83%) por histopatologia, e em 12/23 (52,1%) por exame direto.

Tabela 1: Principais dados clínicos epidemiológicos de 23 pacientes com paracoccidioidomicose dos quais foram obtidos os isolados de *Paracoccidioides* spp.

	Nº de isolados (%)
Gênero	
Masculino	18 (78.3)
Feminino	5 (22.7)
Faixa Etária	
0-13	1 (4.3)
14-30	6 (26.1)
31-40	8 (34.8)
41-50	6 (26.1)
>50	2 (8.6)
Região geográfica	
Minas Gerais (Sudeste)	17 (73.9)
Goiás (Centro-Oeste)	1 (4.3)
São Paulo (Sudeste)	5 (21.7)
Forma Clínica	
Aguda / Subaguda	8 (34.8)
Crônica	10 (43.5)
Mista (associada a HIV)	5 (21.7)
Recidiva da PCM	
Homens	4 (57.4)
Mulheres	3 (42.6)
Óbito	
Aguda / Subaguda	1 (33.3)
Mista	2 (66.7)
HIV (Co-infecção)	
Homens	6 (75)
Mulheres	2 (25)

Nº de isolados – número de isolados; PCM – paracoccidioidomicose.

Fonte: A autora, 2021.

Os pacientes com as formas aguda e mista foram tratados com anfotericina B seguida de itraconazol enquanto que os pacientes com a forma crônica receberam itraconazol. Dos 23 pacientes, 8 (34,78%) eram coinfectados com HIV (Tabela 2).

Tabela 2: Principais dados clínicos epidemiológicos de 8 pacientes com PCM associada à infecção por HIV.

Paciente	Gênero	Idade	Ano Diagnóstico	Procedência	Forma Clínica	Espécie	Desfecho
1	M	47a	2013	São Paulo	Mista	<i>P. brasiliensis</i>	Cura
2	F	26a	2013	São Paulo	Mista	<i>P. brasiliensis</i>	Cura
3	F	30a	2009	Minas Gerais	Crônica	<i>P. brasiliensis</i>	Cura
4	M	42a	2017	São Paulo	Crônica	<i>P. americana</i>	Cura
5	M	28a	2008	Minas Gerais	Mista	<i>P. brasiliensis</i>	Óbito
6	M	36a	2010	Minas Gerais	Mista	<i>P. brasiliensis</i>	Cura
7	M	31a	2011	Minas Gerais	Aguda/Subaguda	<i>P. brasiliensis</i>	Óbito
8	M	50a	2010	Minas Gerais	Crônica	<i>P. brasiliensis</i>	Cura

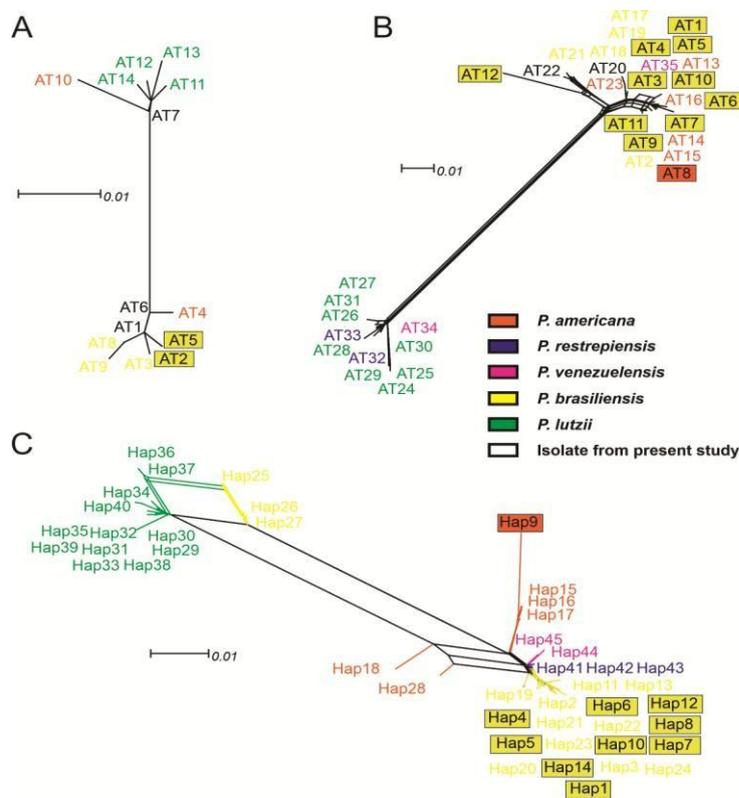
F – feminino; M – masculino; a – anos.

Fonte: A autora, 2021.

5.2 Diversidade de haplótipos (*GP43+ARF*)

Dentre os 175 isolados do G1 (Tabela 3), o *locus* mais variável foi *GP43*. Além disso, a grande maioria (33/35) dos *allele types* (ATs) foram espécie-específicos. Dentre os ATs encontrados, 11 (AT1, AT3-AT12) estavam presentes exclusivamente em isolados do presente estudo (Figura 3B). O *locus ARF* também apresentou ATs exclusivos de *P. lutzii* (AT11-AT14), *P. americana* (AT4 e AT10) e AT5 e AT3 foram encontrados exclusivamente em isolados do presente estudo (Tabela 3 e Figura 3A).

Figura 3 - Análise de decomposição dividida do *locus ARF* (A), *locus GP43* (B) e *ARF + GP43* (C) concatenados dos 175 *Paracoccidioides* spp. estudados.

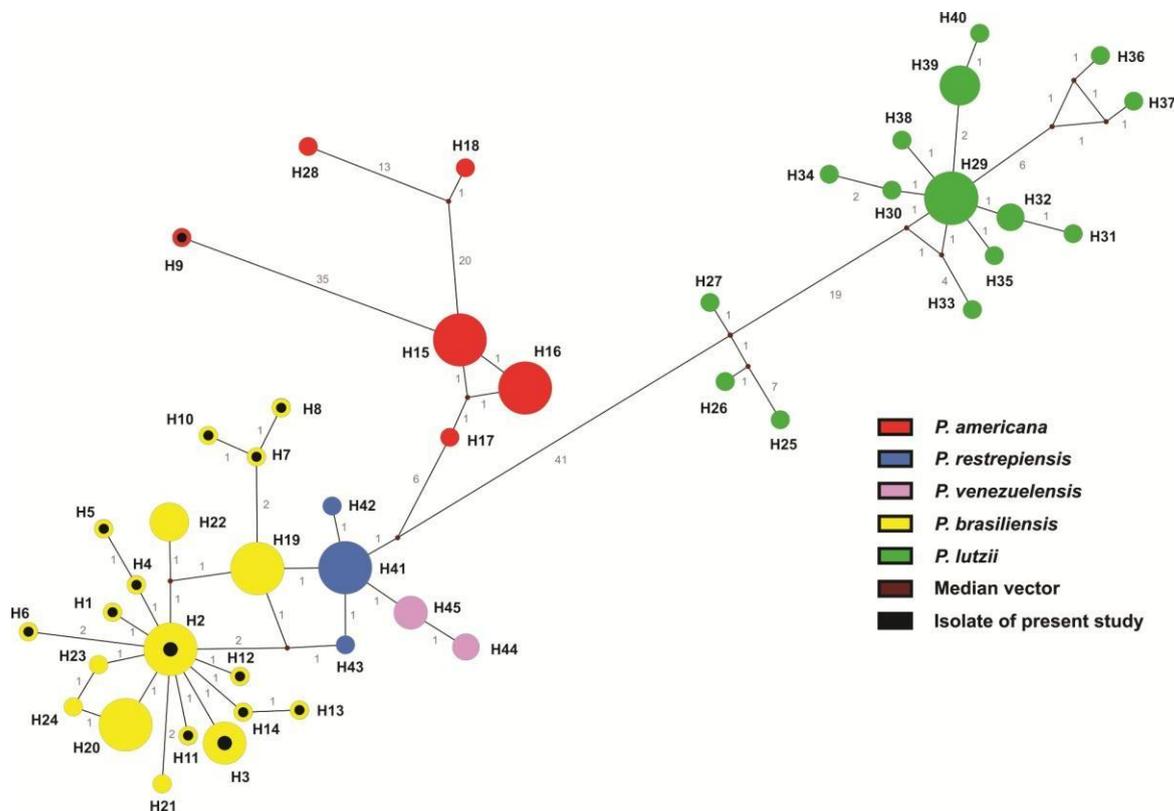


Esse isolamento aplica o algoritmo de vizinhança usando o modelo de parâmetro P incorreto e evidenciando a diversidade e ambiguidades de ramificação atribuíveis a eventos de recombinação. A observação de que os isolados estão ligados uns aos outros por múltiplas vias e estão formando uma rede interconectada em vez de uma única árvore bifurcada é sugestiva de recombinação. O teste phi para recombinação implementado no software SplitsTree mostra evidências significativas ($p < 0,0001$) para recombinação no *ARF + GP43*. Nas análises de *locus* único são demonstrados os tipos de alelos (ATs) encontrados. Nas sequências concatenadas são demonstrados os haplotipos (H) encontrados. As espécies são diferenciadas pelas seguintes cores: PS2/*P. americana* (vermelha), PS3/*P. restrepiensis* (azul), PS4/*P. venezuelensis* (rosa), S1/*P. brasiliensis* (amarela) e *P. lutzii* (verde). Os ATs e H exclusivos de uma espécie específica são mostrados pela cor indicativa da espécie. Os ATs e H exclusivos dos isolados do presente estudo são marcados por um quadro.

Fonte: A Autora, 2021.

Os *loci* concatenados (*GP43+ARF*) apresentaram 45 haplótipos (H) (Tabela 4, Figuras 3C e 4). Destes, 19 em S1/*P. brasiliensis* (13 exclusivos do presente estudo), 15 em *P. lutzii*, seis em PS2/*P. americana* (um exclusivo do presente estudo, H9), três em PS3/*P. restrepiensis* e dois em PS4/*P. venezuelensis* (Figuras 4 e 5).

Figura 4 - Rede de haplótipos de junção mediana de 175 *Paracoccidioides* spp. com base em sequências de nucleotídeos concatenadas dos loci *GP43* + *ARF*.



As espécies são diferenciadas pelas seguintes cores: PS2/*P. americana* (vermelha), PS3/*P. restrepiensis* (azul), PS4/*P. venezuelensis* (rosa), S1/*P. brasiliensis* (amarela) e *P. lutzii* (verde). Cada círculo representa um haplótipo único (H) e a circunferência é proporcional à frequência do haplótipo (H2: 55 isolados; H41: 77; H29: 14; H19: 7; H15: 8; H16: 7; H20: 8; H3: 5; H39: 4; H22: 4; H45: 3; H44: 2; H32: 2 e o restante é composto por um isolado cada). Pontos marrons (vetores medianos) são intermediários ausentes hipotéticos. Fonte: A autora, 2021.

Quando comparados os diferentes grupos (Tabela 3), a espécie mais polimórfica foi S1/*P. brasiliensis* com 19 haplótipos, diversidade haplotípica (H_d) de 0,655 e diversidade de nucleotídeos (K) de 4,61 (Tabela 3). A menos polimórfica foi PS4/*P. venezuelensis* (dois haplótipos, H_d de 0,6 e K de 0,6). Os isolados de outras origens, diferente dos clínicos, mostraram-se mais variáveis. No geral, isolados do Brasil apresentaram-se mais polimórficos que os de outros países ($H_d = 0.857 - 0.0$ e $\pi = 0.00582 - 0.0$).

No Brasil, os isolados mais polimórficos foram os provenientes de SP ($Hd = 0.933$ e $\pi = 0.00872$). Os isolados de pacientes com a forma crônica ($Hd = 0.945$ e $\pi = 0.00659$) também se mostraram mais polimórficos que os obtidos de pacientes com as outras formas clínicas ($Hd = 0.848 - 0.900$ e $\pi = 0.00454 - 0.00488$) (Tabela 3). Os 23 isolados do presente estudo mostraram ser bastante polimórficos quando comparados com isolados provenientes de outras regiões do Brasil e de outros países. Eles foram em sua maioria S1/*P. brasiliensis* 22 (95,66%), com apenas um (4,34%) PS2/*P. americana* (isolado 13, H9). Estes isolados apresentaram 14 diferentes haplótipos, a maioria (12/14) composto apenas por um isolado e 10 foram exclusivos do presente estudo, nove em S1/*P. brasiliensis* e um em PS2/*P. americana* (H9). A grande maioria (19/23) se agrupou com isolados S1a e S1b, divisão que não foi visualizada na análise de haplótipos (Figuras 3 e 4, Tabela 3).

Mediante os testes de neutralidade D de Tajima, D de Fu & Li, F de Fu & Li e Fs de Fu foi possível evidenciar seleção purificadora ou expansão populacional para os 23 isolados do presente estudo e para os de PS2/*P. americana*. Diferentes testes de recombinação (estimador Watterson (θ), Rm e PHI) sugerem a hipótese de recombinação nas populações compostas por todos os isolados do G1 e para todos os de S1/*P. brasiliensis* (Tabela 3).

Tabela 3. Polimorfismos de DNA em diferentes grupos para *loci GP43 + ARF (G1)* em 175 isolados de *Paracoccidioides* spp.

(número de isolados)	C	S	π	k	h	Hd	D	FD	FF	FS	Theta-w	Rm	PHI
<i>ARF</i> (175)	376	24	0.01155	4.216	12	0.718	-0.0903	-1.98850	-1.47232	2.537	4.182	0	1.0
<i>GP43</i> (175)	438	88	0.04068	16.55	33	0.843	0.0677	-1.07524	-0.66457	3.110	15.333	5	0.8297
Todos isolados (175)	814	115	0.02707	21.032	45	0.866	-0.0334	-1.73709	-1.13430	1.883	20.038	6	<0.0001
PS1/ <i>P. brasiliensis</i> (79)	791	79	0.00592	4.613	20	0.655	-2.3272	-1.73279	-2.37732	-2.600	15.349	3	<0.0001
PS4/ <i>P. venezuelensis</i> (5)	779	1	0.00077	0.600	2	0.600	1.2247	1.22474	1.15728	0.626	0.480	0	&
PS3/ <i>P. restrepiensis</i> (26)	779	2	0.00020	0.154	3	0.151	-1.5131	-2.20378	-2.31853	-2.176	0.524	0	&
PS2/ <i>P. americana</i> (18)	811	26	0.00436	3.399	5	0.680	-2.2623	-3.26020	-3.44508	2.101	7.559	0	&
<i>P. lutzii</i> (29)	788	24	0.00370	2.906	12	0.649	-1.8720	-1.76207	-2.11326	-3.506	6.111	0	1.0
Presente Estudo (23)	805	32	0.00553	4.308	11	0.866	-1.9830	-3.02217	3.16250	-1.714	8.670	0	1.0
Clínicos (67)	805	42	0.00614	4.779	24	0.864	-1.5873	-2.73456	-2.74854	-7.397	8.797	3	0.9076
Tatus (13)	779	18	0.00467	3.641	6	0.769	1.5797	-1.88677	-2.06207	0.415	5.800	0	1.0
Outras fontes (4)	779	18	0.01220	9.500	4	1.000	-0.3313	-0.33131	-0.34183	0.274	9.818	0	1.0
Argentina (8)	779	6	0.00312	2.429	5	0.857	0.2306	0.34334	0.35004	-0.731	2.314	0	1.0
Brasil (49)	805	40	0.00677	5.271	19	0.873	-1.5080	-2.28123	-2.38595	-3.842	8.971	2	0.8407
Colômbia (20)	779	0	0	0	1	0	-	-	-	-	-	0	&
Venezuela (21)	779	13	0.00582	4.533	3	0.733	-1.2457	-1.25472	-1.35825	2.726	5.693	0	&
Aguda (14)	780	15	0.00454	3.538	10	0.848	-1.0186	-1.45921	-1.53548	-3.859	4.717	1	0.3694
Crônica (64)	803	37	0.00659	5.131	19	0.945	-1.2424	-2.02798	-2.07107	-2.777	7.825	2	0.9008
Mista (5)	780	7	0.00488	3.800	4	0.900	0.9127	0.91278	0.95142	0.051	3.360	0	1.0
MG (19)	782	20	0.00480	3.743	8	0.836	-1.4568	-1.9161	-2.06879	-0.301	5.722	1	0.5885
SP (23)	802	31	0.00872	6.791	10	0.933	-0.8280	-1.10752	-1.19532	0.681	8.399	2	0.6419
Outros estados (6)	779	8	0.00368	2.867	5	0.830	-1.0718	-1.06267	-1.14524	-1.372	3.504	0	&

C- comprimento; S - número de sítios polimórficos; π - diversidade de nucleotídeos; k - número médio de diferenças de nucleotídeos; h - número de haplótipos; Hd - diversidade de haplótipos; D - D de Tajima; FD - Fu e Li's D; FF - Fu e Li's F; Fs - Fs de Fu; * - $p < 0,05$; Rm - Número mínimo de eventos de recombinação; Theta w - Theta (por sequência) de S; # - quatro ou mais sequências são necessárias para calcular os testes. O polimorfismo de DNA foi avaliado excluindo sítios com lacunas. Os tipos de sequência repetidos de diferentes regiões não são incluídos no número total; Phy - Índice de Homoplasia Pareada; & - há poucos caracteres informativos para usar o Teste de Phi conforme implementado aqui.

Fonte: A autora, 2021.

A análise filogenética foi inferida pelos métodos: de máxima verossimilhança (ML), neighbour-joining (NJ), máxima parcimônia (MP) e grupos de pares não ponderados com aritmética (UPGMA) por meio das sequências concatenadas dos *loci GP43 + ARF*. Essas sequências concatenadas apresentaram 45 haplotipos diferentes. A árvore com a maior probabilidade de log (-2206,5961) é mostrada. A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de galhos medidos em número de substituições por local. A análise envolveu 45 sequências de nucleotídeos. As posições de códon incluídas foram 1^a + 2^a + 3^a + Não codificantes. Houve um total de 814 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7. Os números em cada ramificação indicam valores de bootstrap > 50% com base em 1.000 replicados por cada um dos quatro algoritmos (ML / NJ / MP / UPGMA) que apresentaram topologias semelhantes. As cinco espécies principais de *Paracoccidioides* são marcados com cinco cores diferentes. Quando o número de isolados que compõem o haplótipo for menor ou igual a três os isolados estão descritos, quando esse número é maior que três ele é apenas relatado entre parênteses. Em seguida é relatado o número do haplótipo em negrito (H), país dos quais os isolados foram originados, estados de origem, tipo de apresentação clínica e fonte da amostra. O país de origem do isolado foi abreviado de acordo com o código alfa-2 da ISO 3166 ± 1. AR: Argentina, Antartica: AQ, BR: Brasil, CO: Colômbia, EQ: Equador, PY: Paraguai, PE: Peru, UY: Uruguai, VE: Venezuela.

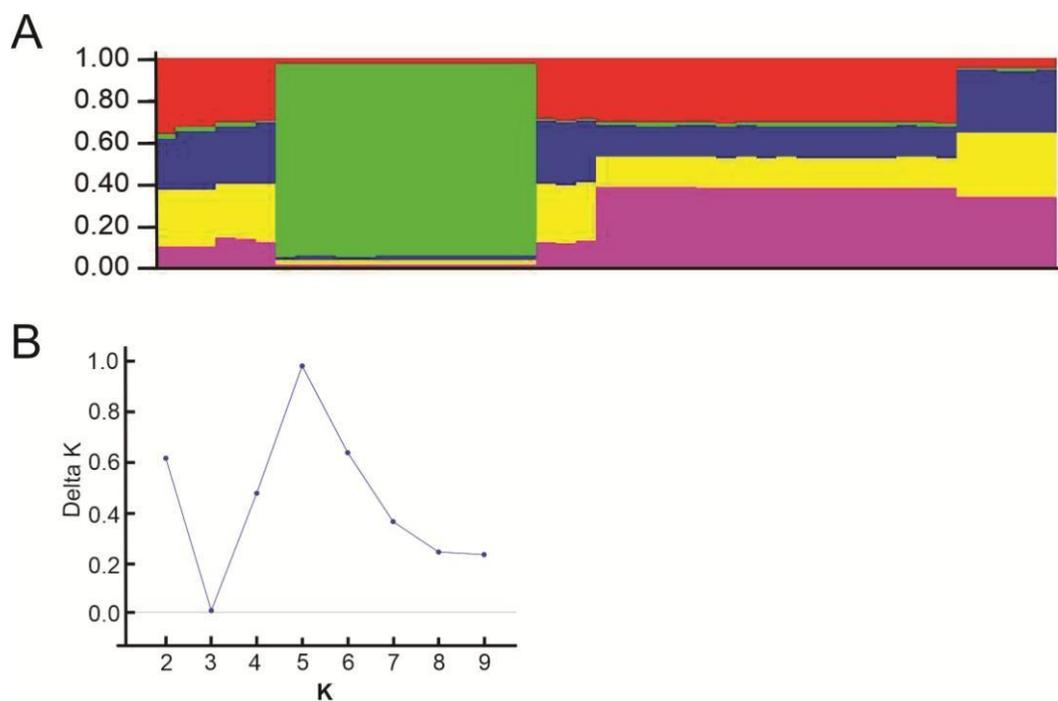
Fonte: A Autora, 2021.

A maioria dos haplótipos possui isolados com origem clínica 41/45 (91%). Também foram encontrados haplótipos com isolados exclusivos de tatu H21 (isolado B8) e de solo (H2 e H44), com este último haplótipo (isolados V1 e V2) apenas descritos na Venezuela. Isolados obtidos de fezes de pinguins e de ração para cães foram descritos apenas em um haplótipo cada, H22 e H15 respectivamente. A maioria dos haplótipos 36/45 (80%) é oriundo do Brasil. Contudo, foram encontrados haplótipos exclusivos da Argentina (H23, H24 e H43) e da Venezuela (H44 e H45). Na distribuição por estados, MG apresenta o maior número de haplótipos (11), dos quais nove foram exclusivos deste estado (Figura 5).

5.3 Estrutura da população e número de sequence types (STs) encontrados

A análise das populações no conjunto de dados G2 (Tabela 4) mostrou cinco populações (K = 5) com uma mistura entre estas populações (Fig. 6 A e B).

Figura 6 - Análise da estrutura de 45 isolados de *Paracoccidioides* spp. de acordo com dados de sequenciamento dos *loci* (*ARF* + *GP43* + *ITS*) (A) mostra o número real de subpopulações e (B) mostra que $K = 5$.

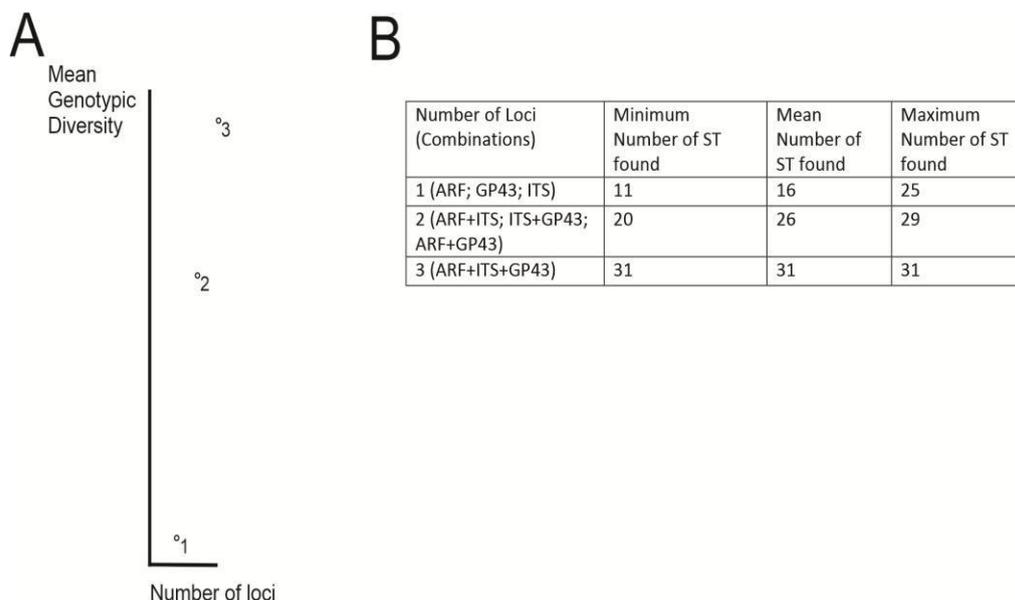


Cada cepa é representada por uma linha vertical, que é particionada em segmentos coloridos que representam as frações de associação estimadas dos fungos em K . A mesma cor indica que os isolados pertencem ao mesmo grupo. Cores diferentes para o mesmo isolado indicam a porcentagem do genótipo compartilhada com cada grupo. Indivíduos com múltiplas cores foram considerados como um possível migrante ou descendente de um imigrante recente de outra população.

Fonte: A autora, 2021.

Pela combinação de três *loci* (*ARF* + *GP43* + *ITS*), o número máximo de STs encontrado foi de 31 (Figura 7).

Figura 7 - Número Ótimo de *Loci* (A), dados sobre o número de *loci* descritos pelo software MLSTest (B).

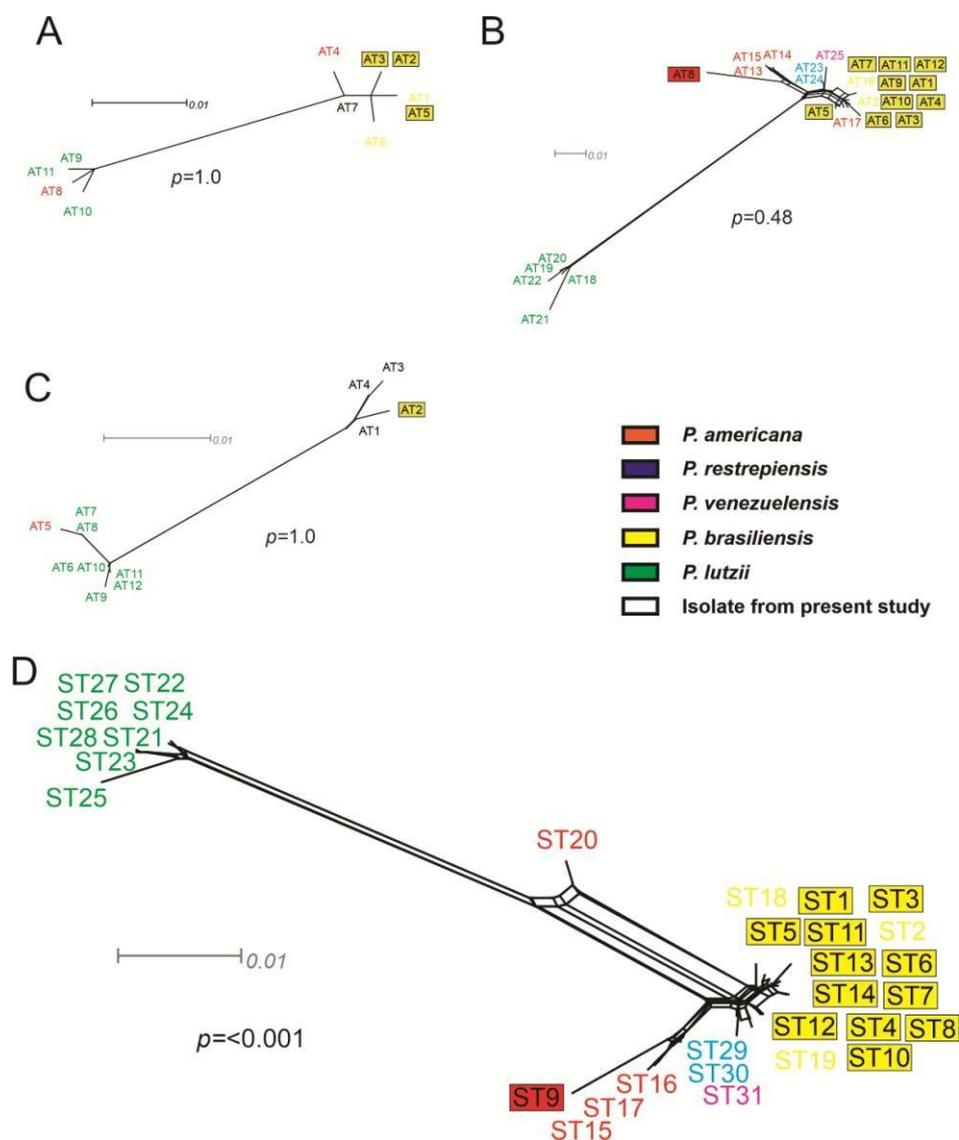


Fonte: A autora, 2021.

5.4 MultiLocus Sequence Typing (MLST) *ARF* + *GP43* + *ITS*

Na avaliação dos 45 isolados nos quais foram obtidas as sequências dos três *loci*, do G2, o *locus* mais variável foi *GP43*, no qual todos os ATs encontrados foram espécie-específicos (Tabelas 4 e S1). Dentre estes ATs, 11 foram exclusivos de isolados do presente estudo, o AT8 foi exclusivo de PS2/*P. americana* e o restante de S1/*P. brasiliensis* (Figura 8b). Os *loci ITS* e *ARF* apresentaram ambos ATs espécie-específicos como compartilhados entre as espécies, além de ATs exclusivos de isolados do presente estudo (Figura 8a).

Figura 8 - Análise de decomposição de divisão dos tipos de alelos (ATs) e tipos de seqüências (STs) presentes nos isolados avaliados.



Esse isolamento aplica o algoritmo de vizinhança usando o modelo de parâmetro P incorreto e evidenciando a diversidade e ambiguidades de ramificação atribuíveis a eventos de recombinação. (A) ATs do locus *ARF*, (B) ATs do locus *GP43*, (C) ATs do locus *ITS* e (D) STs dos loci concatenados (*ARF* + *GP43* + *ITS*). A observação de que os isolados estão ligados uns aos outros por múltiplas vias e formam uma rede interconectada em vez de uma única árvore bifurcada é sugestiva de recombinação. O teste phi para recombinação implementado no software SplitsTree apresentou evidências significativas ($p < 0,0001$) para recombinação no conjunto de dados concatenados (*ARF* + *GP43* + *ITS*). Os STs pertencentes às espécies de *Paracoccidioides* também foram separados por meio da decomposição dividida e são destacados a seguir: PS2/*P. americana*: vermelho; *P. lutzii*: verde; PS3/*P. restrepiensis*: azul; S1/*P. brasiliensis*: amarelo e PS4/*P. venezuelensis*: rosa.

Fonte: A autora, 2021.

Dentre os 31 STs, 15 foram evidenciados em *S1/P. brasiliensis* e destes, 13 (ST1, ST3-ST8, ST10-ST14) foram exclusivos do presente estudo (Tabela 4, Figura 8D).

Tabela 4. Polimorfismos de DNA em diferentes grupos do *loci GP43, ARF e ITS (G2)* de 45 isolados de *Paracoccidioides* spp.

(número de isolados)	C	S	π	k	h	Hd	D	FD	FF	FS	Theta-w	Rm	PHI
<i>ARF</i> (45)	376	18	0.01291	4.711	11	0.762	0.4624	0.47040	0.55348	-0.512	4.116	0	1.0
<i>GP43</i> (45)	438	81	0.04225	17.282	25	0.931	-0.3977	-0.83588	-0.80707	3.110	18.524	4	0.48
<i>ITS</i> (45)	504	17	0.00870	4.384	12	0.638	0.4054	0.39649	0.47255	2.517	3.888	0	1.0
<i>ARF+GP43+ITS</i> (45)	1329	119	0.02094	26.851	26	0.949	-0.1926	-0.57834	-0.5215	0.657	27.214	6	<0.0001
PS1/ <i>P. brasiliensis</i> (26)	1293	18	0.00246	3.169	12	0.871	-1.2964	-1.17983	1.42404	-3.520	4.717	1	0.3291
PS3/ <i>P. restrepiensis</i> (5)	1288	3	0.00093	1.200	2	0.400	-1.0484	-1.04849	-1.05189	1.688	1.440	0	&
PS2/ <i>P. americana</i> (5)	1323	49	0.01607	20.700	5	1.000	-1.0376	-1.00617	-1.09653	0.561	23.520	1	0.8413
<i>P. lutzii</i> (8)	1302	17	0.00494	6.393	7	0.964	-0.1287	0.52279	0.41201	-1.355	6.556	0	1.0
Presente Estudo (23)	1316	33	0.00341	4.395	11	0.866	2.0048	-3.06841	-3.20788	-1.636	8.941	0	1.0
Clínicos (41)	1329	116	0.02225	28.526	26	0.948	0.0317	-0.00087	0.01292	0.130	27.112	6	<0.0001
Outras Fontes (4)	1288	9	0.00349	4.500	3	0.833	-0.8294	-0.82943	-0.82344	1.343	4.909	0	&
Brasil (37)	1329	114	0.02317	29.710	23	0.937	0.2232	0.12583	0.19024	1.094	27.308	7	<0.0001
Colombia (3)	1288	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	&
Outros países (4)	1288	20	0.00802	10.333	4	1.000	-0.5410	-0.54105	-0.56062	0.372	10.909	1	1.0
Aguda (9)	1291	15	0.00332	4.278	8	0.972	-1.0852	-0.93673	-1.08862	-3.176	5.519	1	0.3694
Mista (5)	1289	7	0.00295	3.800	4	0.900	0.9127	0.9127	0.95142	0.051	3.360	0	1.0
Crônica (22)	1324	94	0.02110	27.139	14	0.922	0.0801	0.57457	0.49380	2.484	25.786	4	0.049
GO (5)	1301	84	0.02735	35.200	5	1.000	1.0417	-1.00459	-1.09955	1.160	40.320	0	1.0
MG (17)	1291	9	0.00203	2.610	7	0.831	-0.4303	0.06424	-0.08474	-0.776	2.662	0	1.0
MT (4)	1300	7	0.00270	3.500	3	0.833	-0.8173	-0.81734	-0.79606	0.961	3.818	0	&
SP (9)	1313	30	0.00824	10.611	7	0.917	-0.1940	-0.20415	-0.22627	0.406	11.038	3	0.0156

C – comprimento; S - número de sítios polimórficos; π - diversidade de nucleotídeos; k - número médio de diferenças de nucleotídeos; h - número de haplótipos; Hd - diversidade de haplótipos; D - D de Tajima; FD - Fu e Li's D; FF - Fu e Li's F; Fs - Fs de Fu; * - $p < 0,05$; Rm - Número mínimo de eventos de recombinação; Theta w - Theta (por sequência) de S; Vtnr - Variância de teta (sem recombinação); Vnfr - Variância de teta (recombinação livre); # - quatro ou mais sequências são necessárias para calcular os testes. O polimorfismo de DNA foi avaliado excluindo sítios com lacunas. Os tipos de sequência repetidos de diferentes regiões não são incluídos no número total; Phy - Índice de Homoplasia Pareada; & - há poucos caracteres informativos para usar o Teste de Phi conforme implementado aqui.

Fonte: A autora, 2021.

conjunto de dados concatenados dos 3 *loci* (*ARF* + *GP43* + *ITS*). A árvore com a maior probabilidade de log (-2826.3688) é mostrada. Houve um total de 1329 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7. A análise envolveu 23 sequências de nucleotídeos obtidas no presente estudo e 22 obtidas no banco de dados GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Os números em cada ramificação indicam valores de bootstrap > 50% com base em 1000 réplicas de cada um dos quatro algoritmos (ML / NJ / UPGMA / MP) que apresentaram topologias semelhantes. Os cinco grupos principais são marcados com cinco cores diferentes. Os isolados são descritos de acordo com o nome, número do tipo de sequência (ST), seguido do país de isolamento, forma clínica da PCM e origem do isolado. Os países são abreviados de acordo com o código alfa-2 da ISO 3166 ± 1 AR: Argentina, Antártica: AQ, BR: Brasil, CO: Colômbia, EQ: Equador, PY: Paraguai, PE: Peru, UY: Uruguai, VE: Venezuela. Os isolados do Brasil foram divididos por estados do país: Minas Gerais (MG), São Paulo (SP), Goiás (GO) e Mato Grosso (MT). Os isolados do presente estudo (n = 23) são assinalados com um (•). Fonte: A autora, 2021.

Com base em suas relações genéticas, os STs obtidos podem ser separados em cinco grupos principais que compreendem as espécies dentro do gênero (Fig. 9). O grupo principal, que contém 26 isolados e 15 STs, e inclui a espécie *S1/P. brasiliensis*. Este grupo contém isolados de diferentes países e provenientes de diferentes fontes. Neste grupo estão incluídos a maioria dos isolados do presente estudo 22/23 (95,65%), e nele pode-se encontrar uma subdivisão com dois subgrupos principais A e B (Figure 9).

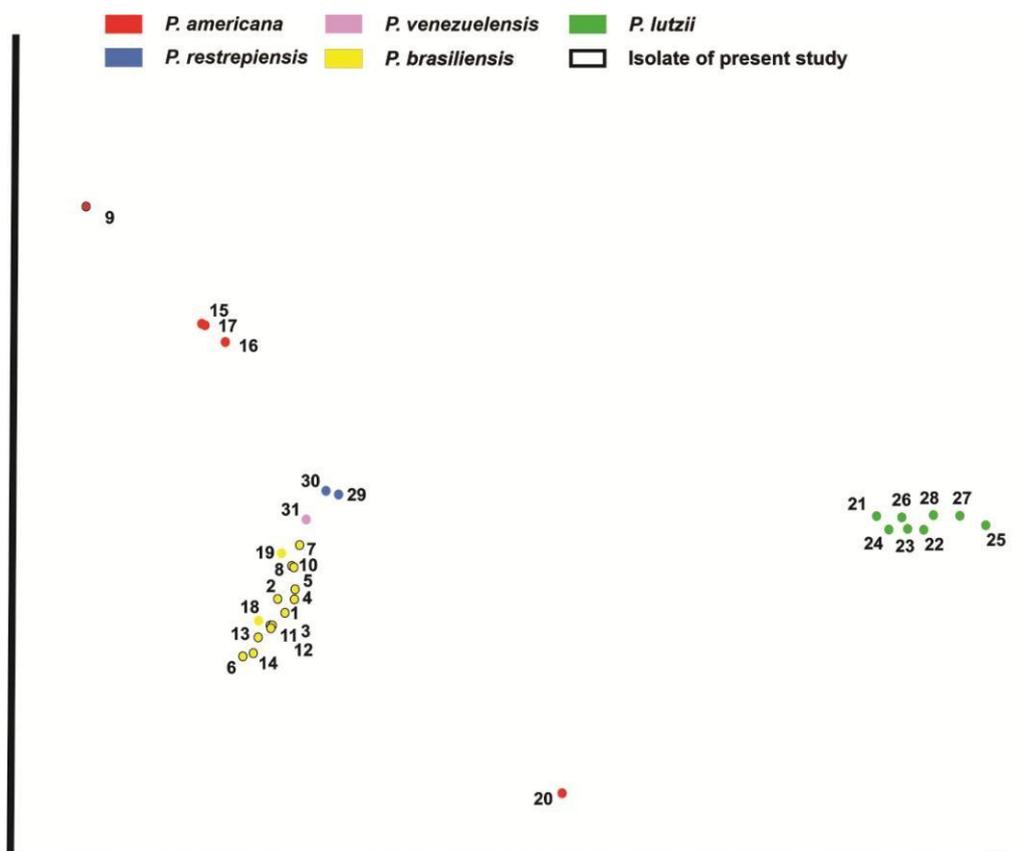
O subgrupo A possui uma origem monofilética e apenas o isolado B17 (ST2, S1b) não é originário do presente estudo, mas também é oriundo do estado de MG. O subgrupo B possui uma origem polifilética e nele foram agrupados três isolados do presente estudo (ST7, ST8 e ST10) obtidos de pacientes com a forma mista da doença. O ST7 difere do ST8 pela inserção de uma citosina na posição 303 do *locus ARF*. Já o ST10 difere do ST7 pela inserção de uma adenina na posição 186 do *locus GP43*.

O segundo grupo principal, contém oito STs com oito isolados e consiste de isolados de *P. lutzii* dos estados de Mato Grosso (MT) e Goiás (GO) do Brasil. Os isolados de *S1/P. brasiliensis*, *PS2/P. americana* e *PS3/P. restrepiensis* tiveram origens polifiléticas e não foram completamente diferenciados por agrupamento por similaridade genética com os *loci* concatenados.

Na Escala Multidimensional Clássica (Figura 10) foi avaliada a variabilidade de agrupamento entre alguns STs de diferentes espécies e pode ser evidenciado que os isolados de *P. lutzii* formaram um grupo bem definido e mostraram grande diferença em relação às demais espécies, enquanto *S1/P. brasiliensis*, *PS3/P. restrepiensis* e *PS4/P.*

venezuelensis não formaram grupos bem definidos. Nessa análise também foi possível observar que o ST20 mostrou-se bastante diferente dos demais STs incluídos em PS2/*P. americana*.

Figura 10 - Gráfico de escala multidimensional clássico dos 31 STs encontrados em 45 isolados de *Paracoccidioides* spp.



Os eixos X e Y explicam as variabilidades de 89,8% e 5,1%, respectivamente. Ambos os eixos explicam 94,9% da variabilidade. Os principais clusters identificados são destacados a seguir: PS2/*P. americana* (vermelho); *P. Lutzii* (verde); PS3/*P. restrepiensis* (azul); S1/*P. Brasiliensis* (amarelo); PS4/*P. venezuelensis* (rosa) e isolados do presente estudo destacados em preto.

Fonte: A autora, 2021.

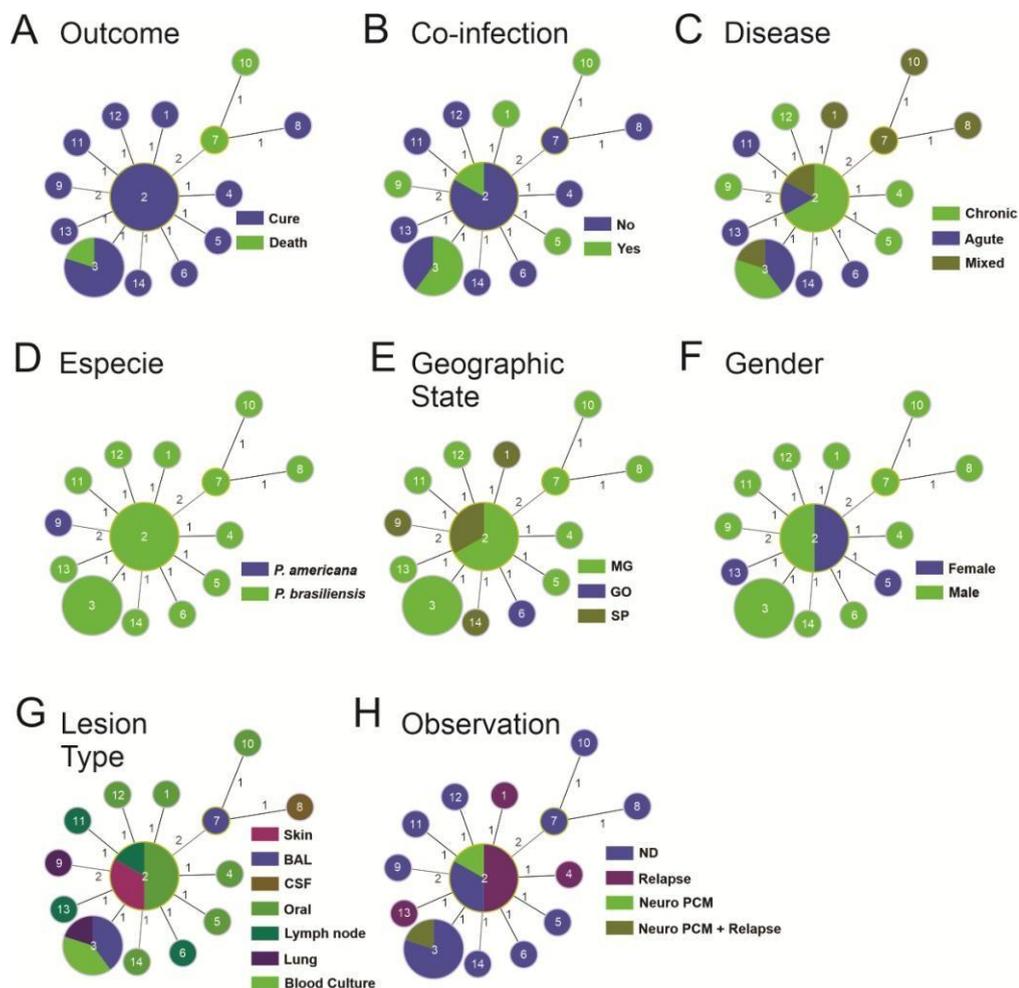
Quando os isolados foram avaliados por espécie, a mais polimórfica foi PS2/*P. americana*, seguida por *P. lutzii* e a menos variável foi PS3/*P. restrepiensis* com apenas dois STs. Deve-se observar que a e PS4/*P. venezuelensis* não foi avaliada porque apenas um isolado tinha todas as sequências dos três *loci* (Figura 10).

Ao comparar a variabilidade em relação à origem dos isolados, os isolados clínicos ($Hd = 0,948$ e $\pi = 0,0222$), mostraram-se mais variáveis que os isolados de outras fontes ($Hd = 0,833$ e $\pi = 0,00349$). Com relação à origem geográfica, também foi possível observar que isolados do Brasil ($Hd = 0,937$ e $\pi = 0,02317$) foram mais polimórficos do que os de outros países ($Hd = 0,899 - 0,0$ e $\pi = 0,00802 - 0,0$). No Brasil, os isolados de GO foram os mais polimórficos e os de MG os menos. Os isolados da forma crônica ($Hd = 0,972$ e $\pi = 0,021$) também foram mais polimórficos do que os isolados de outras formas clínicas ($Hd = 0,900 - 0,922$ e $\pi = 0,00295 - 0,00332$) (Tabela 3). Mediante os testes de neutralidade D de Tajima, D de Fu & Li, F de Fu & Li e Fs de Fu foi possível evidenciar seleção purificadora ou expansão populacional para os 23 isolados do presente estudo. Diferentes testes de recombinação (estimador Watterson (θ), R_m e PHI) sugerem a hipótese de recombinação em diferentes grupos (Tabela 3).

5.5 A árvore de abrangência mínima

Nos 23 isolados do presente estudo o principal grupo fundador foi GF2. Todos seus descendentes, com exceção de ST9 apresentaram variação de *locus* único (SLV) (ST1, ST3, ST4, ST5, ST6, ST11, ST12, ST13 e ST14). Esses STs foram separados por dois alelos do segundo grupo, que foi composto por GF7 e seus descendentes ST10 e ST8. Nessa análise foi encontrada apenas o complexo clonal CC7. Foi evidenciada correlação entre a origem do isolado em MG, a forma mista da PCM e gênero masculino com CC7 (Figuras 11C, 11E e 11F).

Figura 11 - Árvore geradora mínima de 23 isolados de *Paracoccidioides* spp. avaliados por meio do algoritmo goeBURST.



A distribuição dos STs foi comparada com a suscetibilidade ao resultado (A), Coinfecção (B), tipo de doença (C), espécie de *Paracoccidioides* (D), estado brasileiro de procedência (E), sexo (F), tipo de lesão (G) e observação do paciente (H). Dois clusters principais foram identificados do fundador do grupo (GF) (destacado por uma linha amarela) GF2 que incluiu 20 isolados e um grupo menor representado por GF7 e seus descendentes que incluiu 3 isolados. Cada círculo representa um ST exclusivo. Os números apresentados nas ramificações representam pelo menos uma e no máximo duas diferenças nos alelos, respectivamente.

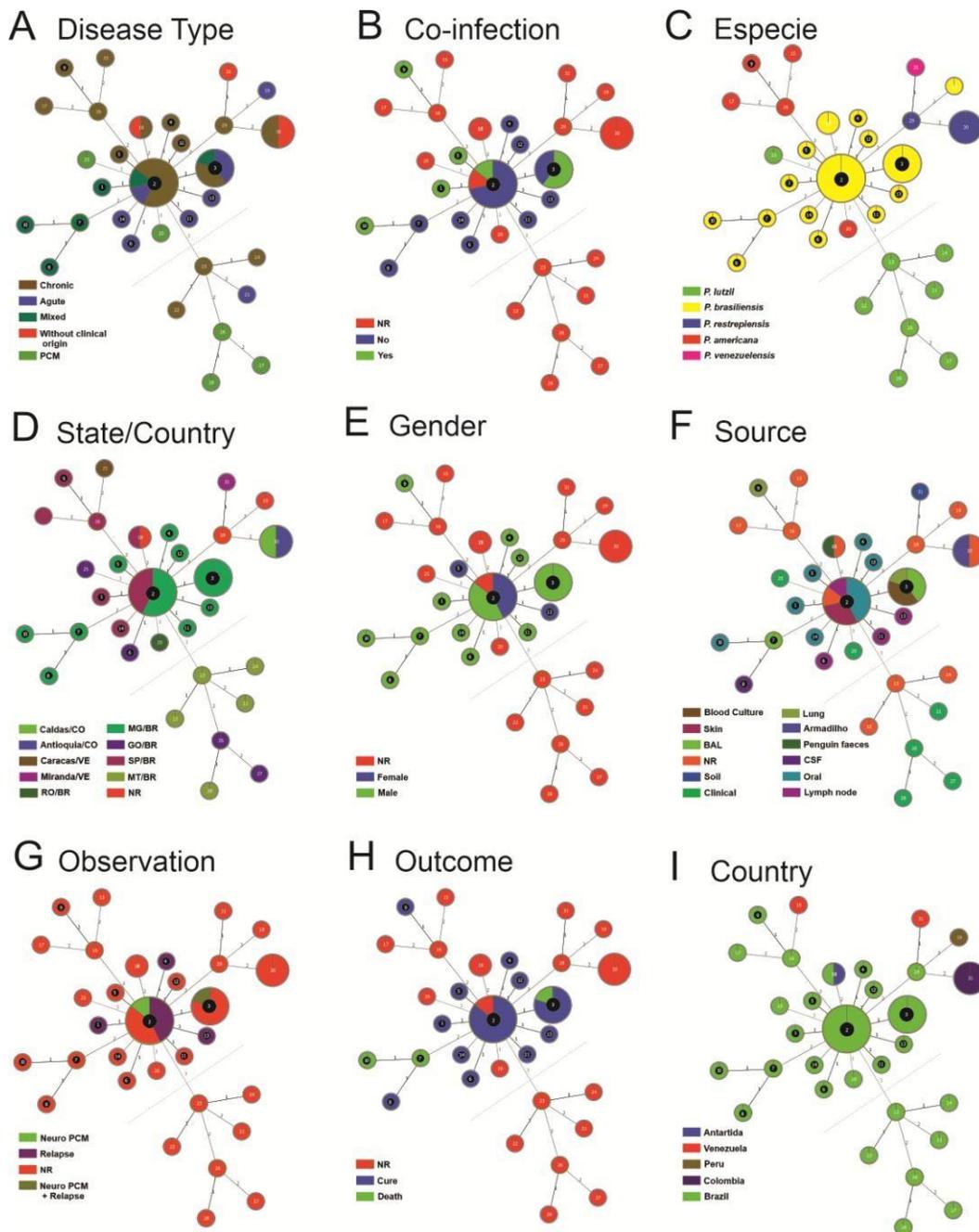
Fonte: A autora, 2021.

Do conjunto de 45 isolados e 31 STs, cinco grupos fundadores principais (GF2, GF7, GF16, GF23, GF26 e GF29), um complexo clonal (CC7), e dois grandes grupos foram observados. O menor grupo é composto por sete ATs, todos da região Centro-Oeste do Brasil e exclusivamente de *P. lutzii*. O grupo maior é composto por 24 STs

originários de diferentes países e contém isolados de todas as espécies de *Paracoccidioides*. (Fig. 12).

Em relação à origem geográfica, todos os isolados do estado de MG foram agrupados em GF2 ou CC7 no G2. Isolados de pacientes que foram a óbito somente foram encontrados em CC7 e ST3. Os isolados GF16 eram provenientes de pacientes tinham doenças crônicas e todos do GF7 tinham doença mista e origem no estado de MG (figura 12A e D). Pacientes com recidiva da doença foram encontrados apenas em GF2 e seus descendentes com variação de *locus* único (SLV).

Figura 12 - Árvore geradora mínima de 45 isolados de *Paracoccidioides* spp. mediante o algoritmo goeBURST.



A distribuição dos STs foi comparada com o tipo de doença (A), Coinfecção (B), espécie de *Paracoccidioides*, (C), estado / país (D), sexo (E), fonte do isolado (F), observação do paciente (G), desfecho (H) e país de isolamento (I). Dois clusters principais foram identificados (separados por uma linha pontilhada). Um, composto exclusivamente por isolados de *P. lutzii* e outro composto por isolados de todas as espécies (Fig. 6C). O maior grupo é composto pelo fundador do grupo (GF) (destacado por uma linha amarela) GF2 e inclui 24 STs, de diferentes países e um grupo menor é representado por GF23 e seus descendentes que inclui 7 STs, todos da região Centro-Oeste do Brasil. Cada círculo representa um ST exclusivo. Os números apresentados nas ramificações representam pelo menos um e no máximo três diferenças nos alelos, respectivamente. Os isolados do presente estudo são destacados no centro por um círculo em cor preta. Fonte: A autora, 2021.

6. DISCUSSÃO

A relevância do estudo da epidemiologia das espécies do gênero *Paracoccidioides* que inclui análise molecular dos isolados radica na potencial definição de sua relação com sua distribuição geográfica, formas clínicas, resposta terapêutica e preferência por hospedeiros, dentre outros, tal como tem sido descrito para vários fungos que causam doenças em humanos (Heitman et al. 2011).

No contexto epidemiológico e da história natural da PCM, importantes fatores como a migração frequente dos pacientes por motivos laborais e o longo período de latência entre o período infecção/doença dificultam a definição do momento e do local exato onde ela ocorre e a associação do genótipo identificado com o local geográfico onde o paciente adoece (Theodoro et al. 2012; Cocio et al. 2020).

Neste estudo, foram avaliados 23 isolados de *Paracoccidioides* spp. obtidos de pacientes com diversas formas clínicas de PCM. A caracterização molecular destes isolados por meio de MLST, permitiu evidenciar que a espécie mais frequente foi *S1/P. brasiliensis* (22/23). Este achado está de acordo com diversos autores que têm descrito o predomínio desta espécie filogenética na América do Sul e no Brasil, principalmente nos estados do Sudeste e Sul, onde a PCM apresenta alta endemicidade (Shikanai-Yasuda et al. 2017; Hrycyk et al. 2018; Cocio et al. 2020).

Na evolução taxonômica, *S1/P. brasiliensis*, recentemente foi proposto de estar constituída por duas linhagens, S1a e S1b (Munoz et al. 2016), fato este posteriormente referendado por outros autores (Cocio et al. 2020; Mavengere et al. 2020; Bagagli et al. 2021). A linhagem S1b foi associada à maioria dos isolados de *Paracoccidioides* spp. e tida por diferentes autores como a linhagem mais recombinante e variável (Munoz et al. 2016; Turissini et al. 2017; Teixeira et al. 2020).

A análise das sequências de *GP43* e de *ARF* (G1), aqui realizada, impediu estabelecer uma clara divisão entre S1a e S1b, porque isolados de ambos subtipos foram agrupados em um mesmo Haplotipo (H2). Entretanto, quando foram acrescentadas as sequências de ITS (G2), foi possível identificar um grupo monofilético composto apenas por isolados S1b e no qual foi agrupado a maioria dos isolados do presente estudo (20/23). O predomínio do tipo S1b ajuda a explicar a grande variabilidade genética encontrada, que mesmo com número menor de isolados, foi maior que a de isolados descritos em outros estados brasileiros e países latino-americanos onde a PCM é endêmica (Tabelas 3 e 4) (Munoz et al. 2016; Cocio et al. 2020; Mavengere et al. 2020).

A hipótese mais plausível para a não diferenciação entre S1a e S1b mediante a análise das sequências de *GP43* e *ARF* aqui descrita poderia, ser em parte sustentada porque a maioria dos estudos que evidenciou esta divisão, basearam-se na avaliação do genoma completo ou então incluíram um maior número de *loci* (Munoz et al. 2016; Mavengere et al. 2020; Teixeira et al. 2020; Bagagli et al. 2021). Recentemente, outros autores conseguiram verificar esta divisão por meio da análise das sequências do exon 2 da *GP43* em quatro isolados clínicos humanos (PSM, PbD, 8652 e 3051) de *P. brasiliensis* advindas de pacientes da Faculdade de Medicina de Botucatu, São Paulo, Brasil (HC / UNESP), (Hrycyk et al. 2018; Cocio et al. 2020).

O outro isolado, identificado como PS2/*P. americana* (isolado 13, H9, ST9) era proveniente de cultura de fragmento de pulmão de um paciente do sexo masculino, 42 anos, natural de Ribeirão Preto/SP, recentemente diagnosticado com infecção pelo HIV e que apresentou simultaneamente PCM na sua forma crônica com grave comprometimento pulmonar, mas que respondeu bem ao tratamento específico. Isolados desta espécie foram previamente descritos em diferentes estados do Brasil, Venezuela, Uruguai e Argentina, a maioria foi obtida de pacientes com forma crônica da PCM (Cocio et al. 2020; de Macedo et al. 2019; Roberto et al. 2016; Theodoro et al. 2012).

PS2/*P. americana* também foi identificada em tatus (*Dasypus novemcinctus*) em diferentes locais (Corredor et al. 2005; Bagagli et al. 2021) e em um cão fêmea da raça Doberman com linfadenomegalia generalizada (de Farias et al. 2011; Theodoro et al. 2012; de Macedo et al. 2019). Diversos autores sugerem que esta espécie seja menos virulenta que a S1/*P. brasiliensis*, pelo fato de ter sido recuperada de pacientes com formas clínicas leves (Matute et al. 2006a). Por outro lado algumas evidências sugerem que isolados de PS2/*P. americana* podem apresentar virulência de forma semelhante ao descrito para S1/*P. brasiliensis* (Theodoro et al. 2008a; de Macedo et al. 2019).

O sequenciamento genômico de PS2/*P. americana* evidencia menor frequência de introgressões e trocas genéticas quando comparadas com outras espécies do complexo *P. brasiliensis* (Mavengere et al. 2020). Em estudo fenotípico de células leveduriformes autores observaram que *P. brasiliensis sensu stricto* (S1) e *P. americana* (PS2), possuem células de leveduras menores que *P. restrepiensis* (PS3), mas sem diferenças de tamanho de célula com as cepas de *P. venezuelensis* (PS4) e *P. lutzii* (Cocio et al. 2020). Na análise com *GP43*, *ARF* e ITS (G2), o isolado 769 foi agrupado entre PS2/*P. americana* e *P. lutzii* (Figura 7). Sobre este isolado foram descritas peculiaridades genômicas e compartilhamento de alelos com S1/*P. brasiliensis* e PS2/*P.*

americana, o que pode corresponder a um híbrido ou à presença de polimorfismos ancestrais em seu genoma (Teixeira et al. 2009; Theodoro et al. 2012). Este fato poderia ser corroborado pela sobreposição de nichos ecológicos entre as duas espécies e pelas evidências atuais de reprodução sexuada no gênero *Paracoccidioides* (Torres et al. 2010; Arantes et al. 2016).

Quando avaliadas as sequências de *ARF+GP43*, isolado 769 foi agrupado com isolados S1/*P. brasiliensis* (de Macedo et al. 2019) e também com isolados de *P. lutzii* (Teixeira et al. 2009). Entretanto, na análise com outro conjunto de isolados, as sequências de *ARF* agruparam este isolado com *P. lutzii* e as sequências de *GP43* com *P. brasiliensis* (Teixeira et al. 2014b). Em conjunto, este achado pode explicar em parte por que o 769 agrupou entre *P. lutzii* e PS2/*P. americana* nos isolados do presente estudo.

O locus *GP43* apresentou o maior polimorfismo e a melhor capacidade de discriminação entre as espécies, com a maioria dos ATs exclusivas de uma única espécie. Este locus codifica a glicoproteína *GP43*, considerado o principal epítipo imunodominante conhecido e utilizado no diagnóstico da PCM e também a molécula melhor caracterizada para a identificação do fungo (Puccia et al. 2008; Torres et al. 2013).

O gene *PbGP43* é composto por dois exons separados por um intron de 78 pb e aparentemente tem uma única cópia (Puccia et al. 2008). A variabilidade na sequência do exon 2 foi descrita em diferentes isolados desde a década de 90 quando começaram a ser descritas as primeiras correlações entre estas sequências com a origem dos isolados e a virulência em modelos animais (Sano et al. 1998; Puccia et al. 2008). Estudos deste locus com mais isolados e a inserção de mais locus permitiram subsidiar a posterior definição do conceito de espécies filogenéticas de *Paracoccidioides* spp. (Matute et al. 2006b; Turissini et al. 2017).

Os ATs 20 e 22 de *GP43* foram compartilhados por S1/*P. brasiliensis* e *P. lutzii* em G1. O AT20 foi encontrado nos isolados MS1 e ED01 de origens clínica e provenientes de Mato Grosso do Sul e Goiás, respectivamente. Contudo o MS1 já foi definido como *Paracoccidioides* sp. (Teixeira et al. 2014a), *P. lutzii* (de Macedo et al. 2019; Misas et al. 2020) e S1/*P. brasiliensis* (Mavengere et al. 2020; Munoz et al. 2016), enquanto que ED01 foi bem caracterizado como *P. lutzii* (Munoz et al. 2016; de Macedo et al. 2019).

De forma similar o AT22 foi encontrado nos isolados EPM104 e 5979 ambos de origem clínica e provenientes do Sul do Paraná e Goiás, respectivamente. Este último também foi classificado de diferentes maneiras, *Paracoccidioides* sp. (Teixeira et al. 2014a) e *P. lutzii* (de Macedo et al. 2019; Teixeira Mde et al. 2013), enquanto EPM104 foi caracterizado como *P. lutzii* (de Macedo et al. 2019; Roberto et al. 2016).

Os isolados MS1 e 5979 do presente estudo agruparam com os isolados de *P. lutzii* de maneira polifilética (Figura 5) de forma similar ao observado por Macedo e colaboradores em 2019. A variabilidade genética destes isolados poderia ser explicada pela falta de consenso em sua identificação e por apresentarem o compartilhamento de ATs entre as espécies *P. lutzii* e S1/*P. brasiliensis* como evidenciado por outros autores e corroborado no presente estudo. (Teixeira Mde et al. 2013; Teixeira Mde et al. 2014; Roberto et al. 2016; de Macedo et al. 2019).

A região ITS apresentou a menor variabilidade e ATs compartilhados entre S1/*P. brasiliensis*, PS3/*P. restrepiensis* e PS4/*P. venezuelensis* na análise de G2. Este locus tem sido utilizado por outros autores para identificação de diferentes microrganismos (Schoch et al. 2014; Pinheiro et al. 2020;). Entretanto para outros microrganismos fúngicos sabe-se que ele possui pequena variabilidade interespecífica, que pode ser de um ou poucos nucleotídeos entre espécies *sibling/cryptic* e variabilidade intraespecífica ainda menor (Kiss 2012). Esta característica poderia justificar seu menor polimorfismo e o maior compartilhamento de ATs por diferentes espécies de *Paracoccidioides*, principalmente entre as geneticamente mais próximas como S1/*P. brasiliensis*, PS3/*P. restrepiensis*, PS4/*P. venezuelensis* e PS2/*P. americana*, anteriormente englobadas dentro do clado de espécies S1/PS2/PS3 (Teixeira et al. 2009).

O compartilhamento dos ATs também poderia ajudar a explicar a não diferenciação das espécies e/ou a origem polifilética das mesmas em algumas das análises aqui realizadas. Essa possibilidade de discordância na separação de espécies filogenéticas esta descrita na técnica de *genealogic concordance for phylogenetic species recognition* (GCPSR). Esta técnica foi utilizada para diferenciar espécies de outros gêneros de fungos e definir que diferentes loci podem apresentar genealogias variáveis dentro de uma mesma espécie devido à recombinação. No entanto, as genealogias dos diferentes loci devem ser concordantes entre duas espécies devido à deriva genética e ao isolamento (Dettman et al. 2003; Taylor et al. 2000; Teixeira et al. 2009).

de STs (31), fatos que suportam a utilização da região ITS tanto na identificação das espécies como na avaliação da variabilidade genética dos isolados por meio do MLST (Schoch et al. 2014; Cocio et al. 2020; Hrycyk et al. 2018; Pinheiro et al. 2020).

A análise de populações em G2 demonstrou um $k=5$ e uma significativa mistura genética entre elas. No presente estudo foi utilizado o modelo de *admixture model* devido à possível presença de indivíduos migrantes entre cada população, como utilizado e sugerido por diversos autores (Bagagli et al. 2021; Munoz et al. 2016; Teixeira et al. 2020). O número de populações e seu relativo alto grau de mistura é compatível com as cinco espécies já definidas e com a ocorrência de trocas genéticas (Turissini et al. 2017; Bagagli et al. 2021; Mavengere et al. 2020; Teixeira et al. 2020).

A avaliação da variabilidade genética por meio do *minimum spanning tree* utilizando o software PHYLOViZ tem sido utilizada como ferramenta de inferência filogenética em diferentes microrganismos como *Cryptococcus* spp. (Andrade-Silva et al. 2018; Vilas-Boas et al. 2020), *Babesia microti* (Goethert et al. 2018), *Mycobacterium tuberculosis* (Shi et al. 2018), *Helicobacter pylori* (Mendoza-Elizalde et al. 2016), *Leptospira* spp. dentre outros (Mason et al. 2016).

A análise de isolados de *Paracoccidioides* spp. mediante este instrumento permite sugerir que o GF2 poderia desempenhar um papel importante na distribuição dos STs de *Paracoccidioides* spp. no conjunto de 45 isolados (G2) e nos 23 isolados do presente estudo. Esta hipótese pode ser sustentada no fato de sua posição central na análise, ao elevado número de componentes e à ligação com diferentes CC e GF (Francisco et al. 2009; Francisco et al. 2012)

Preliminarmente e embora com número reduzido de isolados, foi possível evidenciar algumas correlações entre os GF7 com o tipo misto da PCM e com a origem geográfica dos pacientes no estado de MG tanto no G1 como em G2. Previamente haviam sido descritas diferenças morfológicas entre as espécies de *Paracoccidioides* e sua correspondente área geográfica (Teixeira et al. 2014b; Teixeira et al. 2014a; Turissini et al. 2017; Teixeira et al. 2020). Adicionalmente, também já foram relatadas diferenças de virulência entre as espécies (Matute et al. 2008; Tamayo et al. 2016) com perfis genéticos distintos e variável capacidade de infecção em camundongos (Molinari-Madlum et al. 1999). Contudo, a correlação entre isolados clínicos com a origem geográfica dos pacientes deve ser interpretada com cautela, uma vez que estes isolados podem ser resultado de uma infecção passada adquirida em uma região diferente do local onde o paciente é oriundo ou foi diagnosticado (Tracogna et al. 2019).

Quando os *loci* *ARF*, *GP43* e a região ITS foram concatenados foi observado um aumento significativo na variabilidade genética e também foi encontrado maior número de STs (31), fatos que suportam a utilização da região ITS tanto na identificação das espécies como na avaliação da variabilidade genética dos isolados por meio do MLST (Schoch et al. 2014; Cocio et al. 2020; Hrycyk et al. 2018; Pinheiro et al. 2020). A análise de populações em G2 demonstrou um $k=5$ e uma significativa mistura genética entre elas. No presente estudo foi utilizado o modelo de admixture model devido à possível presença de indivíduos migrantes entre cada população, como utilizado e sugerido por diversos autores (Bagagli et al. 2021; Munoz et al. 2016; Teixeira et al. 2020). O número de populações e seu relativo alto grau de mistura é compatível com as cinco espécies já definidas e com a ocorrência de trocas genéticas (Turissini et al. 2017; Bagagli et al. 2021; Mavengere et al. 2020; Teixeira et al. 2020).

A avaliação da variabilidade genética por meio do minimum spanning tree utilizando o software PHYLOViZ tem sido utilizada como ferramenta de inferência filogenética em diferentes microrganismos como *Cryptococcus* spp. (Andrade-Silva et al. 2018; Vilas-Boas et al. 2020), *Babesia microti* (Goethert et al. 2018), *Mycobacterium tuberculosis* (Shi et al. 2018), *Helicobacter pylori* (Mendoza-Elizalde et al. 2016), *Leptospira* spp. dentre outros (Mason et al. 2016).

A análise de isolados de *Paracoccidioides* spp. mediante este instrumento permite sugerir que o GF2 poderia desempenhar um papel importante na distribuição dos STs de *Paracoccidioides* spp. no conjunto de 45 isolados (G2) e nos 23 isolados do presente estudo. Esta hipótese pode ser sustentada no fato de sua posição central na análise, ao elevado número de componentes e à ligação com diferentes CC e GF (Francisco et al. 2009; Francisco et al. 2012)

Preliminarmente e embora com número reduzido de isolados, foi possível evidenciar algumas correlações entre os GF7 com o tipo misto da PCM e com a origem geográfica dos pacientes no estado de MG tanto no G1 como em G2. Previamente haviam sido descritas diferenças morfológicas entre as espécies de *Paracoccidioides* e sua correspondente área geográfica (Teixeira et al. 2014b; Teixeira et al. 2014a; Turissini et al. 2017; Teixeira et al. 2020). Adicionalmente, também já foram relatadas diferenças de virulência entre as espécies (Matute et al. 2008; Tamayo et al. 2016) com perfis genéticos distintos e variável capacidade de infecção em camundongos (Molinari- Madlum et al. 1999). Contudo, a correlação entre isolados clínicos com a origem geográfica dos pacientes deve ser interpretada com cautela, uma vez que estes isolados podem ser resultado de uma infecção passada adquirida em uma região diferente do local onde o paciente é oriundo ou foi diagnosticado (Tracogna et al. 2019).

Apesar da região geográfica dos pacientes com PCM aqui avaliados ser contígua às áreas onde *P. lutzii* tem sido descrito e da suspeita de casos de PCM causados por esta espécie, nenhum dos isolados foi caracterizado como tal. De forma semelhante na região do Sudeste do Brasil foi relatado apenas um isolamento desta espécie em 50 isolados avaliados, sendo 46 clínicos e quatro ambientais (Cocio et al. 2020). Outro estudo com 40 amostras clínicas e ambientais de diferentes origens geográficas da América do Sul relatou *P. lutzii* em 20% das amostras, principalmente naquelas provenientes da região Centro Oeste do Brasil, (Roberto et al. 2016) onde os relatos de ocorrência são esparsos e ainda incipientes quanto ao mapeamento geográfico de sua distribuição. De forma semelhante às outras espécies, o habitat natural de *P. lutzii* ainda não foi elucidado nem foi isolada de tatus como nas outras (Marques-da-Silva et al. 2012; Sarmiento Tatagiba et al. 2018; Hrycyk et al. 2018; Pinheiro et al. 2020).

Embora com um número reduzido de isolados, que inicialmente eram 35 mas que por dificuldade técnicas com a pureza do DNA extraído e contaminações, os resultados obtidos no presente estudo permitiram evidenciar uma maior ocorrência de S1b/*P. brasiliensis*, conforme descrito para a região Sudeste do Brasil. Também foi observada presença de significativa variabilidade intraespecífica e uma possível correlação entre o perfil molecular com a forma clínica e origem geográfica dos pacientes com PCM. Além disso também foi caracterizado um isolado da espécie PS2/*P. americana* proveniente de indivíduo HIV positivo oriundo de São Paulo onde esta espécie tem sido mais descrita. Por fim, os resultados do presente estudo podem contribuir para o melhor mapeamento geográfico da distribuição das espécies do gênero *Paracoccidioides* no Brasil.

A avaliação de maior número de isolados em conjunto com a análise de dados de sequências depositadas no GenBank de origem geográfica diferente poderão contribuir para sustentar as hipóteses que visam correlacionar espécies e seus perfis moleculares com a distribuição geográfica das formas clínicas, sua virulência, variabilidade na resposta terapêutica e preferência por determinado tipo de hospedeiros, dentre outras. Sem dúvida estes fatos constituem uma das principais lacunas no contexto da PCM e seus agentes etiológicos e sua elucidação teria um impacto muito positivo no manejo clínico dos pacientes.

7. CONCLUSÕES

1. O MLST permitiu evidenciar e diferenciar 2 espécies entre os isolados: S1/*P. brasiliensis* (22) e PS2/*P. americana* (1).
2. O sequenciamento dos *loci* *GP43*, *ARF*, e região ITS de isolados clínicos *Paracoccidioides brasiliensis* permitiu evidenciar significativa variabilidade genética.
3. A análise do *locus* *GP43* e *ARF* (G1) não permitiu estabelecer clara diferenciação entre S1a e S1b pois ambas subespécies agruparam em apenas um haplótipo.
4. Em G2 a maioria dos isolados do estudo (19/23) foi agrupada em um grupo monofilético (A) possivelmente composta apenas de isolados S1b.
5. A variabilidade intraespecífica observada sugere potencial correlação do perfil molecular com a forma clínica e origem geográfica dos pacientes com PCM.

8. REFERÊNCIAS

- Albano, A. P., et al. (2015), 'Seroepidemiology of *Paracoccidioides* infection in horses from Rio Grande do Sul, Brazil', **Braz J Microbiol**, 46 (2), 513-7.
- Almeida, A. J., et al. (2007), 'Genome size and ploidy of *Paracoccidioides* reveals a haploid DNA content: flow cytometry and *GP43* sequence analysis', **Fungal Genet Biol**, 44 (1), 25-31.
- Almeida, F. A., et al. (2017), 'Paracoccidioidomycosis in Brazilian Patients With and Without Human Immunodeficiency Virus Infection', **Am J Trop Med Hyg**, 96 (2), 368-72.
- Almeida, F.P. (1930), 'Comparative studies of coccidioid granuloma in the United States and Brazil. New genus for Brazilian parasite.', **Ann Fac Med Univ São Paulo**, 5, 125-41.
- Ameen, M. (2010), 'Cutaneous markers of HIV infection and progression', **Curr HIV Res**, 8 (6), 450-5.
- Andrade-Silva, L. E., et al. (2018), 'Genotypic analysis of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates from Brazil reveals the presence of VNB isolates and a correlation with biological factors', **PLoS One**, 13 (3), e0193237.
- Arantes, T. D., et al. (2015), '*Paracoccidioides* AND *Paracoccidioides lutzii*, A SECRET LOVE AFFAIR', **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 57 Suppl 19, 25-30.
- Arantes, T. D., et al. (2016), 'Environmental Mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil reveals New Clues into Genetic Diversity, Biogeography and Wild Host association', **PLoS Negl Trop Dis**, 10 (4), e0004606.
- Bagagli, E., et al. (2006), 'Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen', **Infect Genet Evol**, 6 (5), 344-51.
- Bagagli, E., et al. (2008), '*Paracoccidioides*: phylogenetic and ecological aspects', **Mycopathologia**, 165 (4-5), 197-207.
- Bagagli, E., et al. (2003), 'High frequency of *Paracoccidioides* infection in armadillos (*Dasyus novemcinctus*): an ecological study', **Med Mycol**, 41 (3), 217-23.
- Bagagli, E., et al. (2021), '*Paracoccidioides* Isolated from Nine-Banded Armadillos (*Dasyus novemcinctus*) Reveal Population Structure and Admixture in the Amazon Basin', **J Fungi (Basel)**, 7 (1).
- Barreto, L., et al. (2010), 'Expression of *Paracoccidioides* CHS3 in a *Saccharomyces cerevisiae* chs3 null mutant demonstrates its functionality as a chitin synthase gene', **Yeast**, 27 (5), 293-300.
- Barrozo, L. V., et al. (2009), 'Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil', **Int J Epidemiol**, 38 (6), 1642-9.
- Bellissimo-Rodrigues, F., Machado, A. A., and Martinez, R. (2011), 'Paracoccidioidomycosis epidemiological features of a 1,000-cases series from a hyperendemic area on the southeast of Brazil', **Am J Trop Med Hyg**, 85 (3), 546-50.
- Benard, G. and Duarte, A. J. (2000), 'Paracoccidioidomycosis: a model for evaluation of the effects of human immunodeficiency virus infection on the natural history of endemic tropical diseases', **Clin Infect Dis**, 31 (4), 1032-9.
- Benard, G., et al. (2001), 'Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis', **Cytokine**, 13 (4), 248-52.
- Benard, G., et al. (1995), 'Responses of T and B lymphocytes to a *Paracoccidioides* cell wall extract in healthy sensitized and nonsensitized subjects', **Am J Trop Med Hyg**, 53 (2), 189-94.

- Benedek, T. (1956), 'Budding and mycelium formation in the life cycle of *Coccidioides immitis* Rixford and Gilchrist, 1896-in vivo, with a review of the literature', **Mycopathol Mycol Appl**, 7 (3-4), 251-6.
- Blotta, M. H., et al. (1999), 'Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region', **Am J Trop Med Hyg**, 61 (3), 390-4.
- Bocca, A. L., et al. (2013), 'Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues', **Future Microbiol**, 8 (9), 1177-91.
- Boekhout, T. (2005), 'Biodiversity: gut feeling for yeasts', *Nature*, 434 (7032), 449-51.
- Bogliolo, L. (1947), 'On the morphology and on the way of reproduction of the *Paracoccidioides* (splendor) almeida, 1930, in its parasitic cycle', **Pathologica**, 39 (636), 97-114.
- Borges-Walmsley, M. I. and Walmsley, A. R. (2000), 'cAMP signalling in pathogenic fungi: control of dimorphic switching and pathogenicity', **Trends Microbiol**, 8 (3), 133-41.
- Borges-Walmsley, M. I., et al. (2002), 'The pathobiology of *Paracoccidioides*', **Trends Microbiol**, 10 (2), 80-7.
- Brummer, E., Castaneda, E., and Restrepo, A. (1993), 'Paracoccidioidomycosis: an update', **Clin Microbiol Rev**, 6 (2), 89-117.
- Brummer, E., et al. (1989), 'Intracellular multiplication of *Paracoccidioides* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages', **Infect Immun**, 57 (8), 2289-94.
- Calich, V. L., et al. (2008), 'Innate immunity to *Paracoccidioides* infection', **Mycopathologia**, 165 (4-5), 223-36.
- Cano, M. I., et al. (1998), 'Electrophoretic karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides*', **J Clin Microbiol**, 36 (3), 742-7.
- Canteros, C. E., et al. (2009), '[Genetic characterization of the fungus involved in the first case of coccidioidomycosis described by Alejandro Posadas in 1892]', **Medicina (B Aires)**, 69 (2), 215-20.
- Canteros, C. E., et al. (2010), '[Endemic fungal pathogens in a rural setting of Argentina: seroepidemiological study in dogs]', **Rev Iberoam Micol**, 27 (1), 14-9.
- Carrero, L. L., et al. (2008), 'New *Paracoccidioides* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen', **Fungal Genet Biol**, 45 (5), 605-12.
- Casadevall, A. and Pirofski, L. A. (2012), 'Immunoglobulins in defense, pathogenesis, and therapy of fungal diseases', **Cell Host Microbe**, 11 (5), 447-56.
- Cisalpino, P. S., et al. (1996), 'Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides*', **J Biol Chem**, 271 (8), 4553-60.
- Cocio, T. A., et al. (2020), 'Phylogenetic Species of *Paracoccidioides* spp. Isolated from Clinical and Environmental Samples in a Hyperendemic Area of Paracoccidioidomycosis in Southeastern Brazil', **J Fungi (Basel)**, 6 (3).
- Colares, S. M., et al. (1998), '[Acute/subacute disseminated paracoccidioidomycoses. First case in Rio Grande do Sul]', **Rev Soc Bras Med Trop**, 31 (6), 563-7.
- Corredor, G. G., et al. (1999), 'Isolation of *Paracoccidioides* from the nine-banded armadillo *Dasybus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia', **Rev Iberoam Micol**, 16 (4), 216-20.
- Corredor, G. G., et al. (2005), 'The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides*. Molecular identification of the isolate', **Med Mycol**, 43 (3), 275-80.

- Corte, A. C., et al. (2007), 'Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Parana State, Brazil', **Mycopathologia**, 164 (5), 225-8.
- Costa, M., et al. (2007), 'Transcriptome profiling of *Paracoccidioides* yeast-phase cells recovered from infected mice brings new insights into fungal response upon host interaction', **Microbiology (Reading)**, 153 (Pt 12), 4194-207.
- Coutinho, Z. F., et al. (2015), 'Hospital morbidity due to paracoccidioidomycosis in Brazil (1998-2006)', **Trop Med Int Health**, 20 (5), 673-80.
- Coutinho, Z. F., et al. (2002), 'Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995)', **Cad Saude Publica**, 18 (5), 1441-54.
- De Albornoz, M. B. (1971), 'Isolation of *Paracoccidioides* from rural soil in Venezuela', **Sabouraudia**, 9 (3), 248-53.
- de Camargo, Z. P. and de Franco, M. F. (2000), 'Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis', **Rev Iberoam Micol**, 17 (2), 41-8.
- de Farias, M. R., et al. (2011), 'Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly', **Mycopathologia**, 172 (2), 147-52.
- de Hoog, G. S., et al. (2015), 'Name changes in medically important fungi and their implications for clinical practice', **J Clin Microbiol**, 53 (4), 1056-62.
- de Macedo, P. M., et al. (2019), 'Clinical features and genetic background of the sympatric species *Paracoccidioides* and *Paracoccidioides americana*', **PLoS Negl Trop Dis**, 13 (4), e0007309.
- de Melo Teixeira, M., et al. (2020), 'Genomic diversity of the human pathogen *Paracoccidioides* across the South American continent', **Fungal Genet Biol**, 103395.
- del Negro, G. M., et al. (1995), 'Lack of reactivity of paracoccidioidomycosis sera in the double immunodiffusion test with the *gp43* antigen: report of two cases', **J Med Vet Mycol**, 33 (2), 113-6.
- Desjardins, C. A., et al. (2011), 'Comparative genomic analysis of human fungal pathogens causing paracoccidioidomycosis', **PLoS Genet**, 7 (10), e1002345.
- Dettman, J. R., Jacobson, D. J., and Taylor, J. W. (2003), 'A *multilocus* genealogical approach to phylogenetic species recognition in the model eukaryote *Neurospora*', **Evolution**, 57 (12), 2703-20.
- Evanno, G., Regnaut, S., and Goudet, J. (2005), 'Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study', **Mol Ecol**, 14 (8), 2611-20.
- Fabris, L. R., et al. (2014), 'Decreasing prevalence of the acute/subacute clinical form of paracoccidioidomycosis in Mato Grosso do Sul State, Brazil', **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 56 (2), 121-5.
- Fava Netto, C. (1972), 'The serology of paracoccidioidomycosis: present and future trends in paracoccidioidomycosis', *Proc First Pan Am Symp Medellin, Colombia. Sci Publ. Washington DC: Pan American Health Organization*, 254, 209-213.
- Feitosa Ldos, S., et al. (2003), 'Chromosomal polymorphism, syntenic relationships, and ploidy in the pathogenic fungus *Paracoccidioides*', **Fungal Genet Biol**, 39 (1), 60-9.
- Fell, J. W., et al. (1992), 'Partial rRNA sequences in marine yeasts: a model for identification of marine eukaryotes', **Mol Mar Biol Biotechnol**, 1 (3), 175-86.
- Ferreira, J. B., et al. (2013), 'Evaluation of *Paracoccidioides* Infection in dairy goats', **Mycopathologia**, 176 (1-2), 95-9.

- Ferrer, C., et al. (2001), 'Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections', **J Clin Microbiol**, 39 (8), 2873-9.
- Fontana, F. F., et al. (2010), 'Seroepidemiological survey of paracoccidioidomycosis infection among urban and rural dogs from Uberaba, Minas Gerais, Brazil', **Mycopathologia**, 169 (3), 159-65.
- Francisco, A. P., et al. (2009), 'Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach', **BMC Bioinformatics**, 10, 152.
- Francisco, A. P., et al. (2012), 'PHYLOViZ: phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods', **BMC Bioinformatics**, 13, 87.
- Franco M., et al. (1994), *Paracoccidioidomycosis*, ed. CRC Press Boca Raton 410.
- Franco, M., et al. (2000), 'A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides* from soil', **Med Mycol**, 38 (3), 185-91.
- Franco, M., et al. (1987), 'Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms', **Rev Soc Bras Med Trop**, 20 (2), 129-32.
- Franco, M., et al. (1993), 'Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis', **Curr Top Med Mycol**, 5, 115-49.
- Goethert, H. K., et al. (2018), 'Zoonotic *Babesia microti* in the northeastern U.S.: Evidence for the expansion of a specific parasite lineage', **PLoS One**, 13 (3), e0193837.
- Gomes-Rezende, J. A., et al. (2012), 'Functionality of the *Paracoccidioides* mating alpha-pheromone-receptor system', **PLoS One**, 7 (10), e47033.
- Hahn, R. C., et al. (2014), 'Fatal fungemia due to *Paracoccidioides lutzii*', **Am J Trop Med Hyg**, 91 (2), 394-8.
- Hahn, R. C., et al. (2019), 'Clinical and epidemiological features of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*', **PLoS Negl Trop Dis**, 13 (6), e0007437.
- Headley, S. A., et al. (2017), '*Paracoccidioides*-associated dermatitis and lymphadenitis in a dog', **Mycopathologia**, 182 (3-4), 425-34.
- Heitman, J., et al. (eds.) (2011), *Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast* (Washington, DC.: ASM Press).
- Herr, R. A., et al. (2001), 'Phylogenetic analysis of *Lacazia loboi* places this previously uncharacterized pathogen within the dimorphic Onygenales', **J Clin Microbiol**, 39 (1), 309-14.
- Hrycyk, M. F., et al. (2018), 'Ecology of *Paracoccidioides*, *P. lutzii* and related species: infection in armadillos, soil occurrence and mycological aspects', **Med Mycol**, 56 (8), 950-62.
- Huson, D. H. and Bryant, D. (2006), 'Application of phylogenetic networks in evolutionary studies', **Mol Biol Evol**, 23 (2), 254-67.
- IBGE (2019), 'Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades. Internet. Available from: <http://www.cidades.ibge.gov.br>. '
- Kiss, L. (2012), 'Limits of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequences as species barcodes for Fungi', **Proc Natl Acad Sci USA**, 109 (27), E1811; author reply E12.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016), 'MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets', **Mol Biol Evol**, 33 (7), 1870-4.
- Kurokawa, Y., et al. (1999), 'A notable example of an evolutionary conserved gene: studies on a putative DNA helicase TIP49', **DNA Seq**, 10 (1), 37-42.
- Lacaz, C. D. S. (1982), **Rev Esc Enferm USP**, 16 (1), 3-4.

- Lacaz Cda, S. (1963), '[Mycoses: classification and frequency]', **Rev Paul Med**, 62, 189-92.
- Leclerc, M. C., Philippe, H., and Gueho, E. (1994), 'Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons', **J Med Vet Mycol**, 32 (5), 331-41.
- Librado, P. and Rozas, J. (2009), 'DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data', **Bioinformatics**, 25 (11), 1451-2.
- Londero, A. T., Ramos, C. D., and Matte, S. W. (1986), '[Actinomycotic mycetomas in Rio Grande do Sul--report of 4 cases]', **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 81 (1), 73-7.
- Lutz, A. (1908), 'A pseudococcidic mycosis localized in the mouth and observed in Brazil. A contribution to the knowledge of American hyphoblastomycoses.', **Brasil Med**, 22, 121-41.
- Macoris, S. A., et al. (2006), 'Virulence attenuation and phenotypic variation of *Paracoccidioides* isolates obtained from armadillos and patients', **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 101 (3), 331-4.
- Mamoni, R. L. and Blotta, M. H. (2006), 'Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis', **Cytokine**, 35 (3-4), 207-16.
- Marques-da-Silva, S. H., et al. (2012), 'Occurrence of *Paracoccidioides lutzii* in the Amazon region: description of two cases', **Am J Trop Med Hyg**, 87 (4), 710-4.
- Marques de Macedo, P., et al. (2016), 'Acute Paracoccidioidomycosis Due to *Paracoccidioides* S1 Mimicking Hypereosinophilic Syndrome with Massive Splenomegaly: Diagnostic Challenge', **PLoS Negl Trop Dis**, 10 (4), e0004487.
- Martinez, R. (2010), 'Paracoccidioidomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease', **Rev Soc Bras Med Trop**, 43 (4), 480.
- Martinez, R. and Moya, M. J. (2009), 'Primary complex of paracoccidioidomycosis and hypereosinophilia', **J Bras Pneumol**, 35 (12), 1259-62.
- Mason, M. R., et al. (2016), 'Distribution and Diversity of Pathogenic *Leptospira* Species in Peri-domestic Surface Waters from South Central Chile', **PLoS Negl Trop Dis**, 10 (8), e0004895.
- Matute, D. R., et al. (2008), 'Evidence for positive selection in putative virulence factors within the *Paracoccidioides* species complex', **PLoS Negl Trop Dis**, 2 (9), e296.
- Matute, D. R., et al. (2006a), 'Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides*', **J Clin Microbiol**, 44 (6), 2153-7.
- Matute, D. R., et al. (2006b), 'Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides* as revealed by gene genealogies', **Mol Biol Evol**, 23 (1), 65-73.
- Mavengere, H., et al. (2020), '*Paracoccidioides* Genomes Reflect High Levels of Species Divergence and Little Interspecific Gene Flow', **mBio**, 11 (6).
- Mendes-Giannini, M. J., Moraes, R. A., and Ricci, T. A. (1990), 'Proteolytic activity of the 43,000 molecular weight antigen secreted by *Paracoccidioides*', **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 32 (5), 384-5.
- Mendes-Giannini, M. J., et al. (2004), 'Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell', **Microbes Infect**, 6 (10), 882-91.
- Mendes-Giannini, M. J., et al. (2000), 'Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi', **Med Mycol**, 38 Suppl 1, 113-23.

- Mendoza-Elizalde, S., et al. (2016), 'Diversification of the vacAs1m1 and vacAs2m2 Strains of *Helicobacter pylori* in *Meriones unguiculatus*', **Front Microbiol**, 7, 1758.
- Minakawa, T., et al. (2016), 'Detection of Multiple Budding Yeast Cells and a Partial Sequence of 43-kDa Glycoprotein Coding Gene of *Paracoccidioides* from a Case of Lacaziosis in a Female Pacific White-Sided Dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*)', **Mycopathologia**, 181 (7-8), 523-9.
- Misas, E., et al. (2020), 'Updates and Comparative Analysis of the Mitochondrial Genomes of *Paracoccidioides* spp. Using Oxford Nanopore MinION Sequencing', **Front Microbiol**, 11, 1751.
- Molinari-Madlum, E. E., Felipe, M. S., and Soares, C. M. (1999), 'Virulence of *Paracoccidioides* isolates can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis', **Med Mycol**, 37 (4), 269-76.
- Montoya, A. E., et al. (1997), 'Electrophoretic karyotype of clinical isolates of *Paracoccidioides*', **Fungal Genet Biol**, 21 (2), 223-7.
- Montoya, A. E., et al. (1999), 'Electrophoretic karyotype of environmental isolates of *Paracoccidioides*', **Med Mycol**, 37 (3), 219-22.
- Morais, F. V., et al. (2000), 'Polymorphism in the gene coding for the immunodominant antigen *gp43* from the pathogenic fungus *Paracoccidioides*', **J Clin Microbiol**, 38 (11), 3960-6.
- Morejon, K. M., Machado, A. A., and Martinez, R. (2009), 'Paracoccidioidomycosis in patients infected with and not infected with human immunodeficiency virus: a case-control study', **Am J Trop Med Hyg**, 80 (3), 359-66.
- Motta, T. R., et al. (2002), 'Evaluation of DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers (RAPD) as genetically associated elements to differentiate virulent and non-virulent *Paracoccidioides* isolates', **FEMS Immunol Med Microbiol**, 33 (3), 151-7.
- Munoz, J. F., et al. (2014), 'Genome update of the dimorphic human pathogenic fungi causing paracoccidioidomycosis', **PLoS Negl Trop Dis**, 8 (12), e3348.
- Munoz, J. F., et al. (2016), 'Genome Diversity, Recombination, and Virulence across the Major Lineages of *Paracoccidioides*', **mSphere**, 1 (5).
- Nascimento, F. R., et al. (2002), 'Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility', **J Immunol**, 168 (9), 4593-600.
- Nery, A. F., et al. (2021) Puzzling paracoccidioidomycosis: Factors associated with the severity of *Paracoccidioides lutzii* infections. **Int J Infect Dis**.
- Nobrega de Almeida, J., Jr., et al. (2015), 'Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for differentiation of the dimorphic fungal species *Paracoccidioides* and *Paracoccidioides lutzii*', **J Clin Microbiol**, 53 (4), 1383-6.
- Oliveira, G. G., et al. (2013), 'Serological survey of paracoccidioidomycosis in cats', **Mycopathologia**, 176 (3-4), 299-302.
- Oliveira, G. G., et al. (2012), 'Serological survey of Paracoccidioidomycosis in sheep', **Mycopathologia**, 173 (1), 63-8.
- Ono, M. A., et al. (2002), 'Inhibition of *Paracoccidioides* by pesticides: is this a partial explanation for the difficulty in isolating this fungus from the soil?', **Med Mycol**, 40 (5), 493-9.
- Paniago, A. M., et al. (2003), '[Paracoccidioidomycosis: a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul]', **Rev Soc Bras Med Trop**, 36 (4), 455-9.

- Pinheiro, B. G., et al. (2020), 'Molecular Tools for Detection and Identification of *Paracoccidioides* Species: Current Status and Future Perspectives', **J Fungi (Basel)**, 6 (4).
- Popi, A. F., et al. (2008), 'B-1 cells facilitate *Paracoccidioides* infection in mice via IL-10 secretion', **Microbes Infect**, 10 (7), 817-24.
- Prado, M., et al. (2009), 'Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006', **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 104 (3), 513-21.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., and Donnelly, P. (2000), 'Inference of population structure using multilocus genotype data', **Genetics**, 155 (2), 945-59.
- Puccia, R., McEwen, J. G., and Cisalpino, P. S. (2008), 'Diversity in *Paracoccidioides*. The PbGP43 gene as a genetic marker', **Mycopathologia**, 165 (4-5), 275-87.
- Puccia, R., et al. (1986), 'Exocellular components of *Paracoccidioides*: identification of a specific antigen', **Infect Immun**, 53 (1), 199-206.
- Queiroz Junior Lde, P., et al. (2014), 'Serological and antigenic profiles of clinical isolates of *Paracoccidioides* spp. from Central Western Brazil', **Mycoses**, 57 (8), 466-72.
- Restrepo, A., et al. (2008), 'Pulmonary paracoccidioidomycosis', **Semin Respir Crit Care Med**, 29 (2), 182-97.
- Restrepo, A., et al. (1984), 'Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis', **Infect Immun**, 46 (2), 346-53.
- Richini-Pereira, V. B., et al. (2009), 'Molecular approaches for eco-epidemiological studies of *Paracoccidioides*', **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 104 (4), 636-43.
- Richini-Pereira, V. B., et al. (2008), 'Molecular detection of *Paracoccidioides* in road-killed wild animals', **Med Mycol**, 46 (1), 35-40.
- Roberto, T. N., et al. (2016), 'Identifying *Paracoccidioides* phylogenetic species by PCR-RFLP of the alpha-tubulin gene', **Med Mycol**, 54 (3), 240-7.
- Rolon, P. A. (1976), '[Paracoccidioidomycosis: an epidemic in the Republic of Paraguay, the center of South America]', **Mycopathologia**, 59 (2), 67-80.
- SAMBROOK, J. and RUSSELL, D. W. (2001), **Molecular cloning : a laboratory manual** (3rd edn.; N.Y.: Cold Spring Harbor).
- San-Blas, G. and Vernet, D. (1977), 'Induction of the synthesis of cell wall alpha-1,3-glucan in the yeastlike form of *Paracoccidioides* strain IVIC Pb9 by fetal calf serum', **Infect Immun**, 15 (3), 897-902.
- San-Blas, G., Nino-Vega, G., and Iturriaga, T. (2002), '*Paracoccidioides* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics', **Med Mycol**, 40 (3), 225-42.
- Sano, A., et al. (1998), 'Pathogenicities and GP43kDa gene of three *Paracoccidioides* isolates originated from a nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*)', **Mycopathologia**, 144 (2), 61-5.
- Sarmento Tatagiba, L., et al. (2018), 'A case of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii* presenting sarcoid-like form', **Med Mycol Case Rep**, 19, 6-8.
- Schoch, C. L., et al. (2014), 'Finding needles in haystacks: linking scientific names, reference specimens and molecular data for Fungi', *Database (Oxford)*, 2014.
- Shankar, J., et al. (2011), 'Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis', **Clin Microbiol Rev**, 24 (2), 296-313.

- Shi, T., et al. (2018), 'Genetic diversity of drug resistant Mycobacterium Tuberculosis in local area of Southwest China: a retrospective study', **BMC Infect Dis**, 18 (1), 565.
- Shikanai-Yasuda, M. A., et al. (2017), 'Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis', *Rev Soc Bras Med Trop*, 50 (5), 715-40.
- Silva-Vergara, M. L., et al. (1998), 'Isolation of a *Paracoccidioides* strain from the soil of a coffee plantation in Ibia, State of Minas Gerais, Brazil', **Med Mycol**, 36 (1), 37-42.
- Silva-Vergara, M. L., et al. (2000), 'Isolation of *Paracoccidioides* from armadillos (*Dasyus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil', **Med Mycol**, 38 (3), 193-9.
- Silva, E., Gomes, P., and Soares-da-Silva, P. (2006), 'Increases in transepithelial vectorial Na⁺ transport facilitates Na⁺-dependent L-DOPA transport in renal OK cells', **Life Sci**, 79 (8), 723-9.
- Simoes, L. B., Marques, S. A., and Bagagli, E. (2004), 'Distribution of paracoccidioidomycosis: determination of ecologic correlates through spatial analyses', **Med Mycol**, 42 (6), 517-23.
- Singer-Vermes, L. M., et al. (1989), 'Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides* isolates in susceptible inbred mice', **J Med Vet Mycol**, 27 (2), 71-82.
- Soares, C. M., et al. (1995), 'Characterization of *Paracoccidioides* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis', **J Clin Microbiol**, 33 (2), 505-7.
- Tamayo, D., et al. (2016), 'Identification and Analysis of the Role of Superoxide Dismutases Isoforms in the Pathogenesis of *Paracoccidioides* spp', **PLoS Negl Trop Dis**, 10 (3), e0004481.
- Tamura, K., et al. (2013), 'MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0', **Mol Biol Evol**, 30 (12), 2725-9.
- Taylor, J. W. and Fisher, M. C. (2003), 'Fungal *multilocus* sequence typing--it's not just for bacteria', **Curr Opin Microbiol**, 6 (4), 351-6.
- Taylor, J. W., et al. (2000), 'Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi', **Fungal Genet Biol**, 31 (1), 21-32.
- Teixeira, M. M., et al. (2014a), '*Paracoccidioides* species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence', **PLoS Pathog**, 10 (10), e1004397.
- Teixeira, M. M., et al. (2014b), '*Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications', **Medical Mycology**, (52), 19-28.
- Teixeira, M. M., et al. (2009), 'Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus', **Mol Phylogenet Evol**, 52 (2), 273-83.
- Teixeira, M. M., et al. (2020), 'Genomic diversity of the human pathogen *Paracoccidioides* across the South American continent', **Fungal Genet Biol**, 140, 103395.
- Teixeira Mde, M., et al. (2013), 'Molecular and morphological data support the existence of a sexual cycle in species of the genus *Paracoccidioides*', **Eukaryot Cell**, 12 (3), 380-9.
- Teixeira Mde, M., et al. (2014), '*Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications', **Med Mycol**, 52 (1), 19-28.
- Tercarioli, G. R., et al. (2007), 'Ecological study of *Paracoccidioides* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection', **BMC Microbiol**, 7, 92.
- Theodoro, R. C., Bagagli, E., and Oliveira, C. (2008a), 'Phylogenetic analysis of PRP8 intein in *Paracoccidioides* species complex', **Fungal Genet Biol**, 45 (9), 1284-91.

- Theodoro, R. C., et al. (2008b), 'Dimorphism, thermal tolerance, virulence and heat shock protein 70 transcription in different isolates of *Paracoccidioides*', **Mycopathologia**, 165 (6), 355-65.
- Theodoro, R. C., et al. (2012), 'Genus *paracoccidioides*: Species recognition and biogeographic aspects', **PLoS One**, 7 (5), e37694.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994), 'CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice', **Nucleic Acids Res**, 22 (22), 4673-80.
- Tomasini, N., et al. (2013), 'MLSTest: novel software for multi-locus sequence data analysis in eukaryotic organisms', **Infect Genet Evol**, 20, 188-96.
- Torres, I., et al. (2010), 'Presence and expression of the mating type *locus* in *Paracoccidioides* isolates', **Fungal Genet Biol**, 47 (4), 373-80.
- Torres, I., et al. (2013), 'Inhibition of PbGP43 expression may suggest that *gp43* is a virulence factor in *Paracoccidioides*', **PLoS One**, 8 (7), e68434.
- Tracogna, M. F., et al. (2019), '[Clinical and epidemiological characteristics of patients with paracoccidioidomycosis diagnosed in a hospital of Resistencia, Chaco]', **Rev Argent Microbiol**, 51 (2), 144-47.
- Travassos, L. R., et al. (1995), 'Biochemistry and molecular biology of the main diagnostic antigen of *Paracoccidioides*', **Arch Med Res**, 26 (3), 297-304.
- Turissini, D. A., et al. (2017), 'Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*', **Fungal Genet Biol**, 106, 9-25.
- Untereiner, W. A., et al. (2004), 'The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales', **Mycologia**, 96 (4), 812-21.
- Vergara, M. L. and Martinez, R. (1998), 'Role of the armadillo *Dasypos novemcinctus* in the epidemiology of paracoccidioidomycosis', **Mycopathologia**, 144 (3), 131-3.
- Vicentini, A. P., et al. (1994), 'Binding of *Paracoccidioides* to laminin through surface glycoprotein *gp43* leads to enhancement of fungal pathogenesis', **Infect Immun**, 62 (4), 1465-9.
- Vidal, M. S., et al. (2005), 'Atypical serological response marked by a lack of detectable anti-*gp43* antibodies in a patient with disseminated paracoccidioidomycosis', **J Clin Microbiol**, 43 (6), 3014-6.
- Vieira Gde, D., et al. (2014), 'Paracoccidioidomycosis in a western Brazilian Amazon State: clinical-epidemiologic profile and spatial distribution of the disease', **Rev Soc Bras Med Trop**, 47 (1), 63-8.
- Vilas-Boas, A. M., et al. (2020), 'High genetic variability of clinical and environmental *Cryptococcus gattii* isolates from Brazil', **Med Mycol**.
- vonHoldt, B. M., et al. (2013), 'Identification of recent hybridization between gray wolves and domesticated dogs by SNP genotyping', **Mamm Genome**, 24 (1-2), 80-8.
- Wanke, B. and Aide, M. A. (2009), 'Chapter 6--paracoccidioidomycosis', **J Bras Pneumol**, 35 (12), 1245-9.

9. ANEXOS

Tabela S1 - Dados gerais dos isolados de *Paracoccidioides* spp. avaliados no presente estudo.