



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Ecologia de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii* e sua associação com o tatu *Dasypus novemcinctus* nos estados de São Paulo e Mato Grosso, Brasil.

MARLUCE FRANCISCA HRYCYK

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada (BGA) do Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor. Área de concentração: *Biologia de Parasitas e Microrganismos*.

Nome do orientador: Eduardo Bagagli

**BOTUCATU- SP
2018**



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Ecologia de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*
e sua associação com o tatu *Dasypus novemcinctus* nos estados de
São Paulo e Mato Grosso, Brasil.

MARLUCE FRANCISCA HRYCYK

EDUARDO BAGAGLI

SANDRA DE MORAES GIMENES BOSCO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada (BGA) do Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor. Área de concentração: *Biologia de Parasitas e Microrganismos*.

Nome do orientador: Eduardo Bagagli

**BOTUCATU- SP
2018**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Hrycyk, Marluce Francisca.

Ecologia de *Paracoccidioides brasiliensis* e
Paracoccidioides lutzii e sua associação com o tatu *Dasyurus*
novemcinctus nos estados de São Paulo e Mato Grosso, Brasil.
/ Marluce Francisca Hrycyk. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Eduardo Bagagli
Coorientador: Sandra de Moraes Gimenes Bosco
Capes: 21201005

1. Ecologia. 2. Filogenia. 3. *Paracoccidioides*
brasiliensis. 4. *Paracoccidioidomicose*. 5. Tatus.

Palavras-chave: Ecologia; Filogenia; *Paracoccidioides spp.*;
Paracoccidioidomicose; Tatus.

Agradecimentos

À minha família, Márcio Hrycyk, Najila Hrycyk e Olavo Hrycyk pela caminhada que fizemos juntos para a realização do meu sonho. Sem duvidar ou questionar, vocês simplesmente estiveram comigo, me acompanharam durante todo o tempo, demonstrando amor e apoio incondicional. Amo vocês.

Professor Dr. Eduardo Bagagli, agradeço o seu profissionalismo, liderança exercida, competência, paciência e enorme generosidade. Com essa atitude, você elevou o grupo (do Laboratório), nos estimulou a crescer e não ter medo de errar. Foi uma honra tê-lo como meu orientador nesse período de formação tão importante na minha vida. Muito obrigada, minha gratidão.

A professora Dra. Sandra de Moraes Gimenes Bosco, minha Co-orientadora que colocou seus conhecimentos e o Laboratório de Micologia Médica a disposição durante o meu doutoramento. Obrigada.

Ao professor Dr. Silvio Luiz Oliveira, com os seus ensinamentos, paciência, amizade e parceria tornou possível os ensaios com experimentação animal. Você Silvio, foi imprescindível para que os ensaios de virulência se concretizassem. Obrigada.

Agradeço aos Professores que compõem a Banca Avaliadora. As sugestões, críticas e correções são essenciais para melhoria desse trabalho.

Ao pessoal de campo que estiveram à frente na captura dos tatus e que auxiliaram na coleta de amostras de solo: Sr. Antonio Benedito Delboino, Sr. Ismail (Baia), Danilo Meneckelli, Denis Ferreira Egewarth, Marcio Hrycyk e Marcelo Hrycyk. Como foi importante a participação de cada um para o sucesso das atividades de campo.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biologia de Fungos, Mariana, Thales Domingos Arantes, Gabriel Capella, Juliano Giacobino, Hans Gracia Garces, Danielle Hamae Yamauchi, Luiza Ikeda Seixas Cardoso, Patrícia Leão e do Laboratório de Micologia Média: Tarsila Francklim e Jéssica Luana Chechi: agradeço à companhia, a colaboração, a paciência, a amizade, pois em todos os momentos que precisei vocês me ajudaram. Obrigada, obrigada e obrigada.

Agradeço a disponibilidade e atenção sempre que precisei dos funcionários (Ana Claudia Acerra, Aline Missio, Luiz Henrique Alquati, Larissa Ragozo C. de Oliveira, Ivana G. Castilho, Luiz Severino dos Santos (Lula), Rafael Scrapim Capra e professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu. Obrigada, obrigada e obrigada.

Agradeço o carinho, os “seminários” na copa, o bate papo descontraído, os sonhos feitos pelo Lula, as pipocas, os bolos, os cafés... Vocês moram no meu coração.

Agradeço imensamente a Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT/Alta Floresta) por oferecer apoio financeiro através de afastamento para qualificação profissional e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT) pela concessão de bolsa de estudos.

Gabriel Moraes Gasparoto, Engenheiro Florestal, muito obrigada por seus serviços de Geoprocessamento aplicados na elaboração dos mapas (área de coleta).

Dedicatória

Aos meus pais, Pedro Francisco do Carmo e Maria Alcida de Araújo Carmo pelo amor incondicional. É uma alegria tê-los comigo. Eu amo vocês.

In memoriam ao meu sogro Emílio Hrycyk que participou de algumas etapas da minha caminhada como estudante. Nós te amamos. Saudades...

“Eu não tenho paredes. Só tenho horizontes...”

Mario Quintana

“O caminho se constrói ao caminhar”

Osho

“Quando eu sei alguma coisa, fico limitado por aquilo, quando eu não sei, todas as possibilidades estão em aberto”

Monja Coen

RESUMO

Paracoccidioides spp. são fungos que vivem no ambiente (solo) e em associação com tecidos de hospedeiros mamíferos. Apresentam como característica de patogenicidade o termo-dimorfismo, em que, a 25° C apresenta a fase micelial e produz suas partículas infectantes (conídios) e a 35-37° C está sob forma de leveduras (forma parasitária). As características morfológicas e micromorfológicas são importantes, mas insuficientes para a diferenciação entre os genótipos. Contudo, o avanço no conhecimento da Biologia Molecular nos últimos anos permitiu uma grande compreensão da biologia e das relações filogenéticas de *Paracoccidioides* spp. A região de ITS1-5.8S-ITS2 (rDNA) tem sido amplamente usada na identificação de diversos fungos, em que, é muito útil na discriminação entre *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, no entanto, ela não separa entre as genótipos do complexo *P. brasiliensis* (S1, PS2, PS3 e PS4), no qual, recentemente foi proposto um rearranjo taxonômico, descritas como novas espécies de *Paracoccidioides*: *P. brasiliensis* para S1, *P. americana* para PS2, *P. restrepiensis* para PS3 e *P. venezuelensis* para PS4. Além do seqüenciamento do ITS, é necessário incluir outras regiões gênicas mais ou menos polimórficas para estudos filogenéticos que visam identificar *Paracoccidioides* spp. como nesse estudo. Este trabalho teve como objetivo mapear áreas de ocorrência e isolar *Paracoccidioides* a partir de tatus (*Dasypus novemcinctus*), bem com detectar molecularmente por Nested-PCR o DNA do fungo em amostras de solo e nos órgãos (baço, fígado e linfonodos mesentéricos) de tatus. Nós isolamos o fungo de tatus do Sudeste (Botucatu/SP) e Centro-Oeste (Alta Floresta/MT). Todos os isolados foram caracterizados molecularmente pelo seqüenciamento ITS-rDNA e *gp43* exon 2 e por PCR-RFLP de alfa tubulina (*tub1*) como *P. brasiliensis* e *P. americana*. A reação de Nested-PCR foi sensível e permitiu detectar o DNA de *Paracoccidioides* nas amostras de tecido (baço, fígado e linfonodos mesentéricos) de *D. novemcinctus* e também no solo dos Estados de São Paulo e Mato Grosso. A construção filogenética com os amplicons ambientais de solo mostrou que *P. lutzii* está amplamente presente nessas regiões (Sudeste e Centro-Oeste), além do que, amplicons de *P. lutzii* de Alta Floresta/MT clusterizaram em um clado separadamente, sugerindo que espécies crípticas podem existir, dentro de *P. lutzii*.

Palavras chave: Ecologia, Filogenia, *Paracoccidioides* spp., Paracoccidioidomicose, Tatus.

ABSTRACT

Paracoccidioides spp. are fungi that live in the environment (soil) and in association with tissues of mammalian hosts. They present as a characteristic of pathogenicity the thermo-dimorphism, in which, at 25° C it presents the mycelial phase and produces its infective particles (conidia) and at 35-37° C it is in the form of yeasts (parasitic form). The morphological and micromorphological characteristics are important, but insufficient for the differentiation between the genotypes. However, the advance in the knowledge of Molecular Biology in recent years has allowed a great understanding of the biology and phylogenetic relationships of *Paracoccidioides* spp. The region of ITS1-5.8S-ITS2 (rDNA) has been widely used in the identification of several fungi, in which it is very useful in the discrimination between *P. brasiliensis* and *P. lutzii*, however, it does not separate between genotypes of the complex *P. brasiliensis* (S1, PS2, PS3 and PS4), in which recently a taxonomic rearrangement was proposed, described as new species of *Paracoccidioides*: *P. brasiliensis* for S1, *P. americana* for PS2, *P. restrepiensis* for PS3 and *P. venezuelensis* for PS4. In addition to the sequencing of ITS, it is necessary to include other more or less polymorphic gene regions for phylogenetic studies aimed at identifying *Paracoccidioides* spp. as in this study. The objective of this work was to map out occurrence areas and isolate *Paracoccidioides* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*), as well as molecularly detect the DNA of the fungus in soil samples and organs (spleen, liver and mesenteric lymph nodes) by Nested-PCR. We isolated the armadillo fungus from the Southeast (Botucatu / SP) and Central West (Alta Floresta / MT). All isolates were molecularly characterized by ITS-rDNA and *gp43* exon 2 sequencing and by alpha tubulin (*tub1*) PCR-RFLP as *P. brasiliensis* and *P. americana*. The Nested-PCR reaction was sensitive and allowed to detect the DNA of *Paracoccidioides* in tissue samples (spleen, liver and mesenteric lymph nodes) of *D. novemcinctus* and also in the soil of the States of São Paulo and Mato Grosso. Phylogenetic construction with environmental soil amplicons showed that *P. lutzii* is widely present in these regions (Southeast and Center-West), in addition, *P. lutzii* amplicons from Alta Floresta / MT cluster in a clade separately, suggesting that species may exist within *P. lutzii*.

Key-words: Ecology, Phylogeny, *Paracoccidioides* spp, Paracoccidioidomycosis, Armadillos.

LISTA DE ABREVIATURAS

arf: Gene que codifica a proteína ADP-ribosylation factor (fator de ribosilação do ADP)

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (Inglês).

BLASTn: BLAST nucleotide (Identificação baseada nas sequências de DNA).

BALBc: Linhagem de camundongos albinos usados em pesquisa.

DNA: Ácido desoxirribonucléico

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Inglês).

ITS: Internal Transcribed Spacer (Presente na região nuclear ribossomal).

gp43 : Gene que codifica a glicoproteína de 43kDa

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism (Inglês).

LSU: Large subunit (subunidade maior) do rRNA.

ML: Maximum Likelihood method (Inglês).

MLST: Multilocus sequencing type (Inglês).

NCBI: National Center for Biotechnology Information (Inglês).

PCR: Polimerase Chain Reaction (Inglês).

PCM: Paracoccidioidomicose (doença causada por fungos *Paracoccidioides* spp)

Nested PCR: Nested Polymerase Chain Reaction (Inglês). É uma variação do PCR padrão em que o produto de uma PCR é submetido à segunda amplificação utilizando primers (iniciadores) internos e aumentando a sensibilidade e especificidade da reação.

Pb18: *P. brasiliensis* 18 (cepa considerada virulenta)

rDNA: DNA ribossomal (rRNA ao nível gênico).

rRNA: Ácido ribonucleico ribossomal.

SSUrDNA: Small Subunit ribosomal DNA (sequência de DNA que codifica para a subunidade menor do rRNA).

S1: Espécie 1 do complexo de *Paracoccidioides brasiliensis*

PS2: Espécie filogenética 2 do complexo *P. brasiliensis*

PS3: Espécie filogenética 3 do complexo *P. brasiliensis*

UFC: Unidades Formadoras de Colônia

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1:

Introdução - Aspectos históricos e epidemiológicos da Paracoccidioomicose (PCM).....	11
Diagnóstico, tratamento e vacina terapêutica.....	15
Os agentes etiológicos.....	17
Virulência de <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i>	23
Objetivo Geral.....	36
Objetivos específicos.....	37
Referências.....	32
CAPÍTULO 2: Ecology of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>, <i>P. lutzii</i> and related species: infection in armadillos, soil occurrence and mycological aspects	39
Introduction.....	42
Material and Methods.....	45
Results.....	53
Discussion.....	64
References.....	69
ANEXOS DA TESE.....	83

INTRODUÇÃO

Aspectos históricos e epidemiológicos da Paracoccidioidomicose (PCM)

A paracoccidioidomicose (PCM) foi descrita a partir de lesões orais em dois pacientes na Santa Casa de São Paulo no início do século 20 (LUTZ, 1908). As características morfológicas do fungo foram descritas por Splendore que o denominou como *Zymonema brasiliensis* (SPLENDORE, 1912) e após dezoito anos a espécie foi classificada como *Paracoccidioides brasiliensis* (FLORIANO, 1930). A doença teve sua nomenclatura oficial (paracoccidioidomicose) instituída em 1971 na reunião de micologistas das Américas em Medellin (PAN AMERICAN SYMPOSIUM ON PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS., 1971).

A PCM é uma micose sistêmica, endêmica em países da América latina que abrange desde o México até a Argentina (Figura 1), com maior casuística no Brasil, Colômbia e Venezuela (COUTINHO et al., 2015; WANKE B.; LONDERO, 1994). Esses países possuem características ecológicas similares que favorecem o crescimento do fungo e também, há grupos de pesquisas dedicados ao estudo do patógeno e da doença.

A infecção por *Paracoccidioides* spp. está relatada nas duas primeiras décadas de vida. O grupo de risco para a PCM são os trabalhadores rurais (horticultores, tratoristas...) que revolvem o solo e ficam continuamente expostos à formação de aerossóis (Figura 2). Uma vez adquirida à infecção, esta pode ser eliminada, controlada ou permanecer latente por um longo período. A evolução para uma doença crônica depende de alguns fatores como, a eficácia da resposta imune do hospedeiro, da virulência da cepa e da interação parasito-hospedeiro (LACAZ et al., 2002). A paracoccidioidomicose é classificada em PCM-infecção e PCM-doença (MONTENEGRO, 1986). Os indivíduos que respondem positivamente aos testes intradérmicos e não apresentam nenhum sintoma clínico, são caracterizados como PCM-infecção, o que significa que houve um contato prévio com o patógeno.

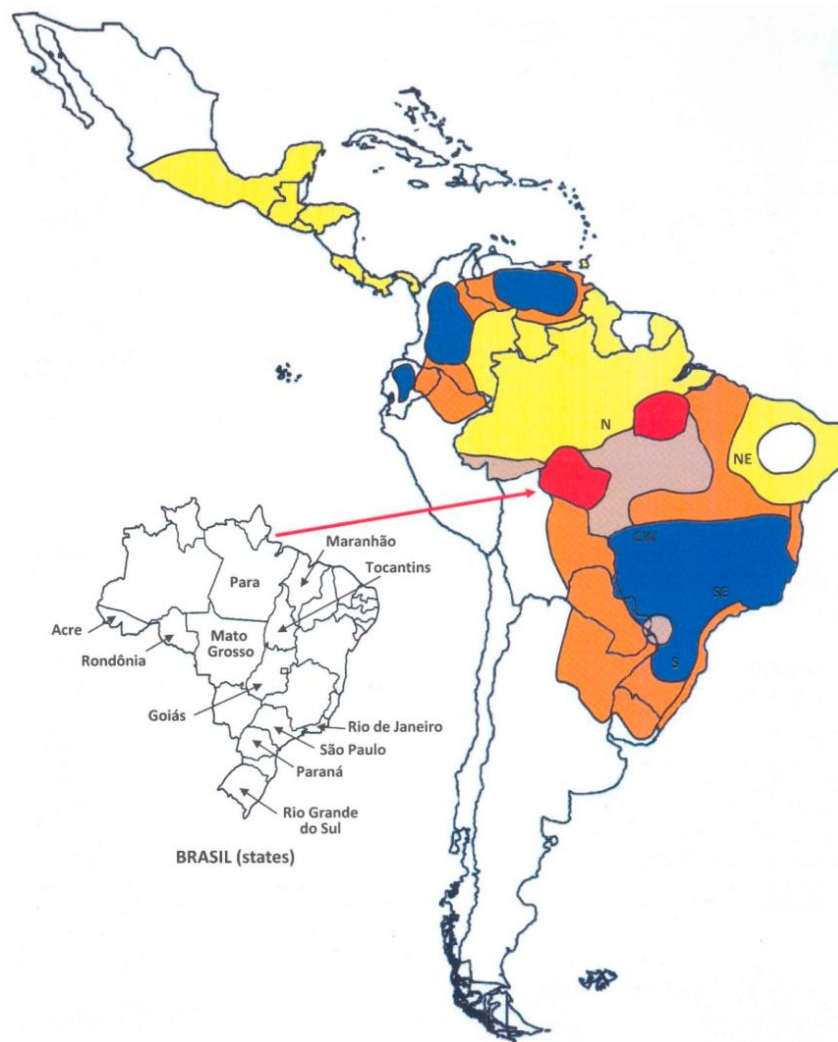


Figura 1: Áreas geográficas e endemicidade da PCM na América Latina. (◆) Primeiras áreas reconhecidas com endemicidade; (◆) alta endemicidade observada desde as últimas décadas do século 20; (◆) área com alguma recente evidência de aumento na endemicidade; (◆) áreas de moderada endemicidade; (◆) baixa endemicidade; (◇) sem casos ou raros casos de PCM relatados nesses países ou regiões. Fonte: (MARTINEZ, 2017).

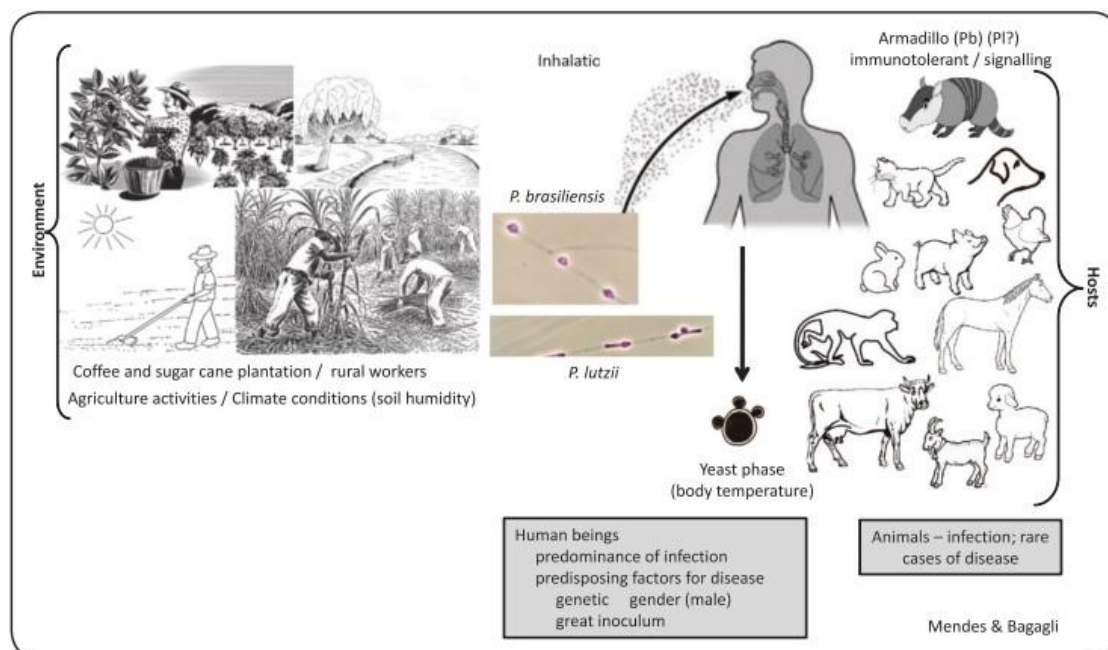


Figura 2: População de risco para adquirir a infecção por *Paracoccidioides* spp. Fonte: (Shikanai-Yasuda et al., 2017).

Na PCM-doença, os pacientes apresentam as sintomatologias e o desenvolvimento tardio da doença que se apresenta de duas formas: i. aguda-subaguda (“tipo juvenil”, moderada ou severa), que acomete principalmente crianças e adultos jovens; a principal manifestação clínica é o envolvimento do sistema mononuclear fagocitário, com depressão da resposta imune celular; as lesões cutâneas são raras. ii. A forma crônica (“tipo adulto”, unifocal/multifocal, suave, moderada ou severa) é a mais frequente em 90% dos casos (WANKE, B., AIDÊ, 2009) com predomínio na população adulta masculina com idade entre 30 a 60 anos oriundos de áreas rurais (PANIAGO et al., 2003; SHIKANAI-YASUDA, 2015; VIEIRA et al., 2014). A proporção de doentes entre homens e mulheres é de 10:1, sendo que, a população feminina estaria protegida pela ação do hormônio β -estradiol que atua como bloqueador na conversão de micélio para levedura na interação parasito-hospedeiro (RESTREPO et al., 1984; SALAZAR; RESTREPO; STEVENS, 1988).

A PCM tem como principal característica o desenvolvimento de granulomas que atuam na contenção do patógeno, que tem origem numa reação de hipersensibilidade tardia (HT). A doença apresenta uma evolução lenta e frequentemente crônica, com

envolvimento do tecido pulmonar, da pele, das adrenais e da mucosa oral. A disseminação se dá por via linfo-hematogênica com o envolvimento dos tecidos mucocutâneo (FRANCO et al., 1987; MONTENEGRO et al., 1996).

A PCM-sequelar corresponde à produção excessiva de tecido conjuntivo devido ao aumento substancial na produção de colágeno induzido pelas citocinas TNF- α e TGF- β (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006), resultando em alterações anatômicas e funcionais da face, orofaringe e dos pulmões. A doença pulmonar do tipo obstrutiva crônica (DPOC) se agrava ou se instala pós-tratamento; ou restritivo que está diretamente associado a fibrose pulmonar, bem como, a associação dos dois tipos. A doença pulmonar (fibrose) causa um impacto significativo na vida do paciente, porque causa insuficiência respiratória, sendo uma das principais causas de afastamento do trabalho (MARQUES, 2010; PANIAGO et al., 2003).

A PCM é a mais importante das micoses sistêmicas. No Brasil, ela foi considerada a oitava causa de morte entre as doenças infecciosas crônicas e parasitárias no período de 1980 a 1995, com taxa média anual de 1,45/1,0 milhão de habitantes, e as maiores taxas de mortalidade regional ocorreram nas regiões Sul com 2,59 e Centro-Oeste com 2,35/1,0 milhão de habitantes (COUTINHO ZF, SILVA D, LAZÉRA M, 2002). A morbidade hospitalar por PCM no Brasil foi avaliada por Coutinho et al. (2015) em que esta micose foi a mais prevalente entre 1998-2006 com 6.732 hospitalizações, representando 4,3/1,0 milhão de habitantes. No norte do país, no estado de Rondônia, a prevalência da PCM teve uma média anual de 9,4/100.000 pessoas entre os anos de 1997-2012, demonstrando uma alta taxa de incidência da doença (VIEIRA et al., 2014). Na região Centro-Oeste, em Mato Grosso do Sul, foram registrados 422 casos de PCM no período de 1980-1999, em que os autores apresentaram dados epidemiológicos importantes sobre a doença naquela região (PANIAGO et al., 2003).

O número de casos de PCM em Mato Grosso vem aumentando nos últimos anos, inclusive sendo diagnosticados em pacientes com lesão oral (Figura 3). Entre 2005-2011, dos 141 municípios, 53 (37,58%) registraram casos da doença em que a maior concentração foi nos municípios de Alta Floresta n=10 (8,0%), Colíder, n=7 (5,6%) e Cuiabá, n=7 (5,6%) (VOLPATO et al., 2016). A prevalência da PCM foi avaliada durante 4 anos através de 3.670 relatórios citológicos e histopatológico de lesões orais no Laboratório Público de Mato Grosso (MT Laboratório, Cuiabá-MT) que é referência

no Estado para a doença. Foram identificados 96 casos (2,6%), em que a biópsia foi o principal método utilizado para o diagnóstico (CARVALHOSA et al., 2016).

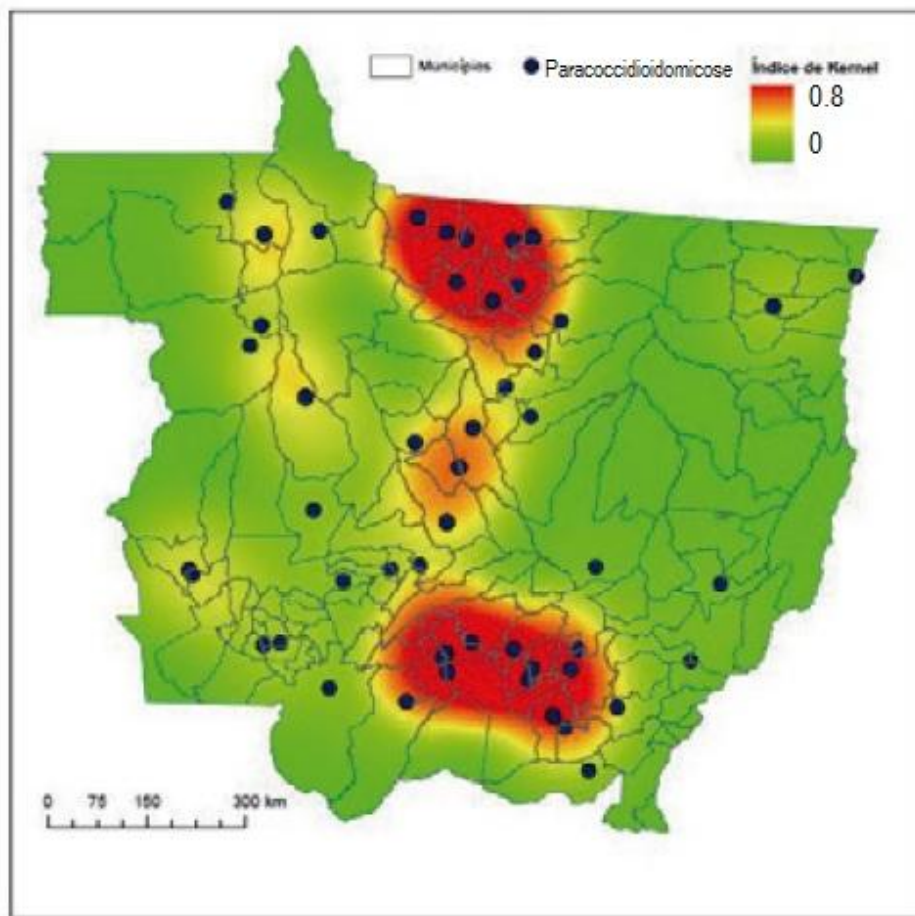


Figura 3: Distribuição espacial dos casos de paracoccidiodomicose (PCM) com manifestações bucais em Mato Grosso. Fonte: Volpato et al., 2016.

A atuação conjunta entre a Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT) e a Secretaria de Estado de Saúde (SES) permitiu que a PCM fosse incluída na lista de doenças de notificação compulsória a partir de abril de 2016 (SES, 2016). Caso similar ocorreu com os estados de Rondônia e Paraná que notificam os casos da doença, bem como, o estado de Goiás que se mobilizaram para que os casos de PCM também sejam notificados.

Diagnóstico, tratamento e vacina terapêutica

As populações em áreas que são consideradas endêmicas para a PCM, necessitam de esclarecimentos sobre as micoses endêmicas por parte dos sistemas de saúde pública, uma vez que o desconhecimento da existência e da gravidade dessas doenças, como é o caso da PCM, pode impedir que as pessoas procurem por tratamento nos centros de saúde, e com isso, o número de atendimentos fiquem abaixo do real. Além do que, em sua maioria, essas pessoas moram distantes dos centros especializados o que dificulta o acesso aos serviços de saúde, bem como a continuidade no tratamento, quando necessário.

O diagnóstico tardio tem como principal consequência o estágio avançado da doença no paciente. Uma vez iniciado o tratamento, este, pode durar de seis meses a dois anos, e esse longo período, associado aos efeitos colaterais dos medicamentos (náuseas e enjoos), a falsa sensação de cura devido ao desaparecimento das lesões e a dificuldade financeira dos pacientes são fatores que tendem a colaborar com o abandono e a recidiva da doença (COLOMBO et al., 2011).

O diagnóstico padrão para a PCM está baseado na visualização de leveduras de *Paracoccidioides* spp. obtidas de biópsia do órgão afetado, histopatológico, raspagens de lesões superficiais, de escarro, abscessos e aspirado de nódulos linfáticos. Os testes sorológicos fornecem resultados rápidos embora a sensibilidade e especificidades possam variar dependendo do tipo de ensaio, da preparação do antígeno, da apresentação clínica da doença e também se há presença de comorbidades. Na prática clínica, o tratamento da PCM se baseia na administração de derivados de sulfa (sulfadiazina, sulfadoxina, sulfametoxipiridazina, cotrimazina e trimetoprim-sulfametoxazol), anfotericina B, azóis (cetoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol e posaconazol) e terbinafina (TABORDA et al., 2015).

Vacinas terapêuticas vêm sendo propostas como uma alternativa, para que no futuro, possam ser administradas como um adjuvante no tratamento dos pacientes com PCM por grupos de pesquisa da Universidade de São Paulo (USP), Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e Universidade de Brasília (UNB). A proteína P10 é uma sequência de 15 aminoácidos retirado da glicoproteína Gp43 que é o antígeno

imunodominante de *P. brasiliensis*, que atua como um antígeno específico, capaz de induzir uma resposta imunológica através da proliferação das células T. Além disso, a criação de uma vacina terapêutica utilizando peptídeos tem se mostrado promissor para o controle das micoses sistêmicas (TRAVASSOS et al., 2008).

A combinação de P10 com a quimioterapia no tratamento da PCM mostraram ter um protetor aditivo quando administrado de 48h até 30 dias após o desafio intratraqueal, podendo assim contribuir na redução do período de tratamento (MARQUES et al., 2006); Os adjuvantes (hidróxido de alumínio, CFA, flagelina e o lipídio catiônico dioctadecil-dimetilamônio) foram testados em modelo murino (BALC/c) infectados com *P. brasiliensis* (Pb18) considerado altamente virulento. Os camundongos tratados com lipídio catiônico e P10 associados obtiveram uma resposta eficaz com maior redução de fungos no pulmão, na formação de granulomas e na fibrose (MAYORGA et al., 2012).

Em estudos mais recentes, foi desenvolvido um anticorpo, o anti-DEC205, fusionado com o peptídeo P10. Em teste com diferentes linhagens de camundongos infectados com *P. brasiliensis*, foi observado que em animais tratados apenas com medicamentos houve a recidiva da doença quando a medicação foi suspensa. Ao contrário, os animais que receberam a medicação e a vacina ao mesmo tempo, mantiveram a doença sob controle, mesmo após a suspensão da medicação (SANTOS et al., 2012; TABORDA et al., 2015).

Ao pensar na criação de uma vacina terapêutica para PCM, vários desafios surgem, e uma delas é grande diversidade genética dentro de *Paracoccidioides* spp. Além disso, os epítomos entre *P. brasiliensis* e *P. lutzii* são muito polimórficos e os mecanismos de proteção para *P. lutzii* não estão bem compreendidos. Além do que, o processo de produção de vacinas consiste de várias etapas, em que uma delas, são os testes clínicos em humanos, que são caros e requerem fontes de financiamento específicas direcionadas as doenças fúngicas; como no Brasil a PCM é conhecida apenas pelos grupos de pesquisas, e praticamente desconhecida pela população em geral, esses, e outro fatores associados, podem dificultar as pesquisas na área de produção e disponibilização de vacinas terapêuticas no Sistema Público de Saúde.

Os agentes etiológicos

Paracoccidioides brasiliensis foi considerado o único responsável pela PCM por mais de sete décadas (75 anos). Com o avanço e uso de ferramentas da Biologia Molecular foi possível um maior entendimento sobre a evolução dessa espécie. Matute et al. (2006) analisaram por multilocus sequencing type (MLST) oito regiões gênicas em 5 loci nuclear de 65 isolados de *P. brasiliensis* e identificaram uma diversidade genética em *Paracoccidioides* que era considerada uma única espécie clonal. Essa análise permitiu separar *P. brasiliensis* em três grupos filogenéticos distintos S1, PS2 e PS3 (Figura 4). No complexo *P. brasiliensis*, o clado S1 e PS3 são mais similares geneticamente, enquanto PS2 mostrou ser o clado geneticamente mais distante de S1 e PS3.

Posteriormente, Teixeira (TEIXEIRA et al., 2013a, 2009) ao analisarem *Paracoccidioides* reunidos em um grupo chamado de “Pb01-like” por concordância de genealogia de genes, reconheceram a existência de uma nova espécie, altamente divergente, classificando-a como *P. lutzii* em homenagem a Adolpho Lutz. Estudos moleculares nos últimos 11 anos vêm demonstrando uma grande variabilidade genética dentro do complexo de *P. brasiliensis* que apresentam uma distribuição heterogênea em países da América do Sul. O genótipo S1 (S1a e S1b) ocorre no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela. O genótipo PS2 é encontrado no Brasil e Venezuela; o genótipo PS3 na Colômbia também já foi isolado na Venezuela e o PS4 na Venezuela (MUÑOZ; FARRER; DESJARDINS, 2016; THEODORO et al., 2012).

Recentemente, Muñoz et al. (2016) ao estudarem a diversidade genética de 31 isolados (23, humanos; 6 tatus; 2 solo) de *Paracoccidioides* identificaram uma variação no genótipo S1, subdividindo-o em S1a e S1b; PS2 se mantém distante filogeneticamente. Além disso, nomearam mais um genótipo como PS4 (Pb300) e *P. lutzii* agrupou-se separadamente do grupo de *Paracoccidioides* (Figura 5). Atualmente, 65 isolados de *P. brasiliensis* foram analisados através do DNA nuclear e mitocondrial, bem como, a morfologia dos conídios e das leveduras; nesse estudo, os autores propõem uma nova classificação para o complexo de *P. brasiliensis*, e o reconhecimento taxonômico dos quatro grupos genéticos como: *P. brasiliensis* (S1), *P. americana* (PS2), *P. restrepiensis* (PS3), *P. venezuelensis* (PS4), sugerindo que são espécies distintas e

que podem ser identificadas tanto morfológicamente quanto geneticamente, incluindo *P. lutzii* (TURISSINI et al., 2017).

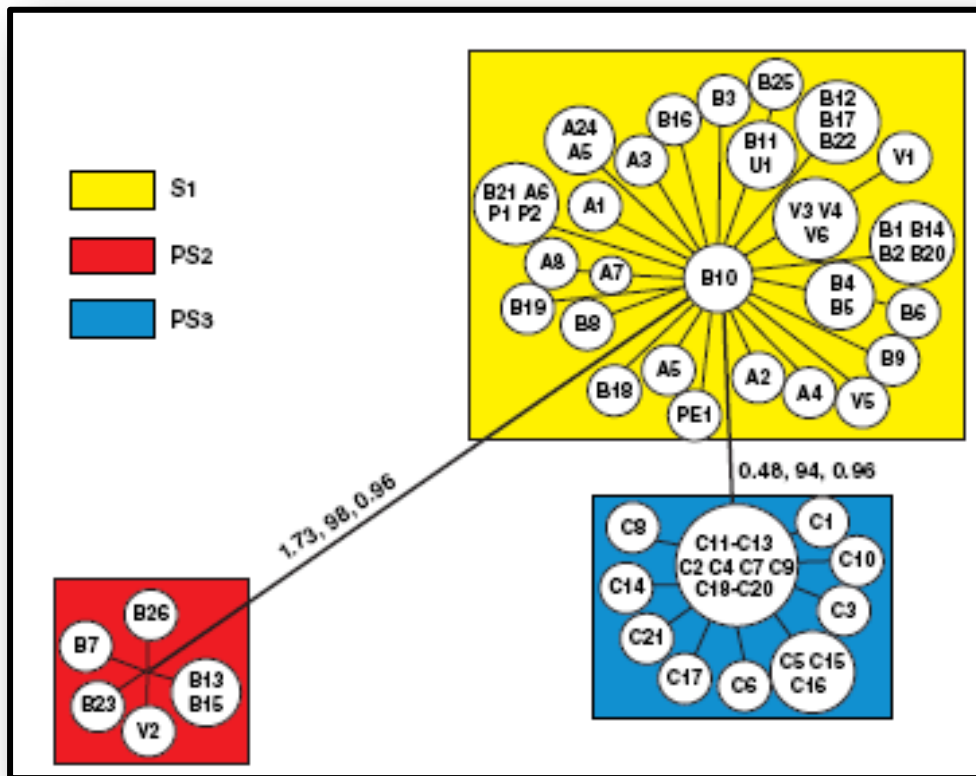


Figura 4: Árvore mostrando os três grupos filogenéticos de *Paracoccidioides*. Fonte: Matute et al.,(2006).

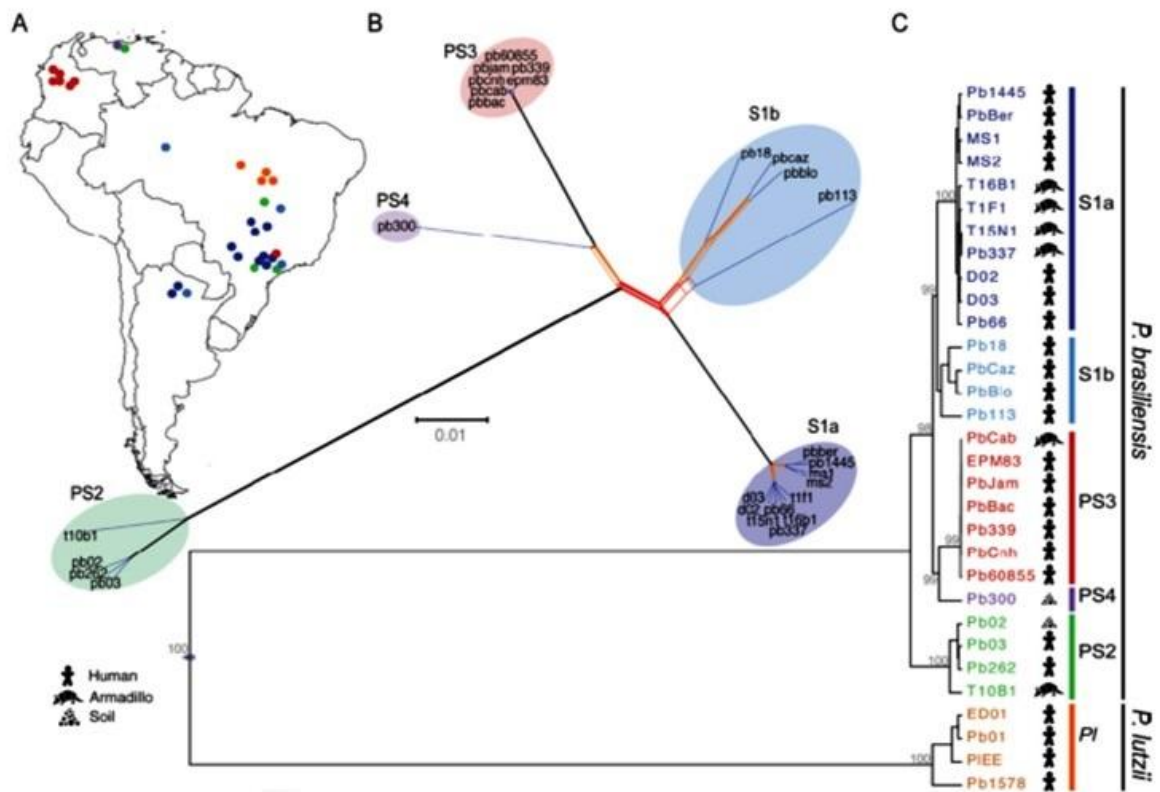


Figura 5: Diversidade genética de 31 isolados de *Paracoccidioides*. Fonte: Muñoz et al., 2016.

Paracoccidioides brasiliensis e *P. lutzii* apresentam dimorfismo termo-dependente. No ambiente (22-25° C) apresentam a fase micelial em condições de saprofitismo. Suas hifas são tubulares, septadas, hialinas com conídios que medem aproximadamente 5 µm de diâmetro, que estão presentes ao longo da hifa (artroconídios e clamidoconídio) e também na extremidade (aleuroconídios) (Figura 6). Quando os conídios atingem os alvéolos pulmonares, aderem ao tecido do hospedeiro e converte-se em levedura, que é a forma parasitária. Essa interação, patógeno-hospedeiro é mediada por múltiplos fatores como adaptação, adesão, invasão, virulência das espécies fúngicas e resposta imune do hospedeiro (DE OLIVEIRA et al., 2015).

A fase micelial pode ser mantida em meios de cultura *in vitro* (22-25° C), em que se observa um micélio curto, de coloração esbranquiçada, com aspecto algodinoso. O centro da colônia pode ser, ou não crateriforme o que confere às culturas o típico

“aspecto de pipoca estourada”; o reverso pode apresentar pigmentação que varia do preto ao marrom/castanho com presença ou ausência de “pregas” (Figura 6). O fungo quando cultivado em meios enriquecidos (35-37°C), apresenta macroscopicamente uma coloração bege com aspecto de relevo cerebriforme (LACAZ et al., 2002). A análise micromorfológica (40x) demonstra leveduras grandes medindo em torno de 30 µm de diâmetro, parede celular com birrefringência. As leveduras podem estar isoladas ou agrupadas, e em ambos os casos, apresentar ou não, múltiplos brotamentos de tamanhos variados (Figura 8).

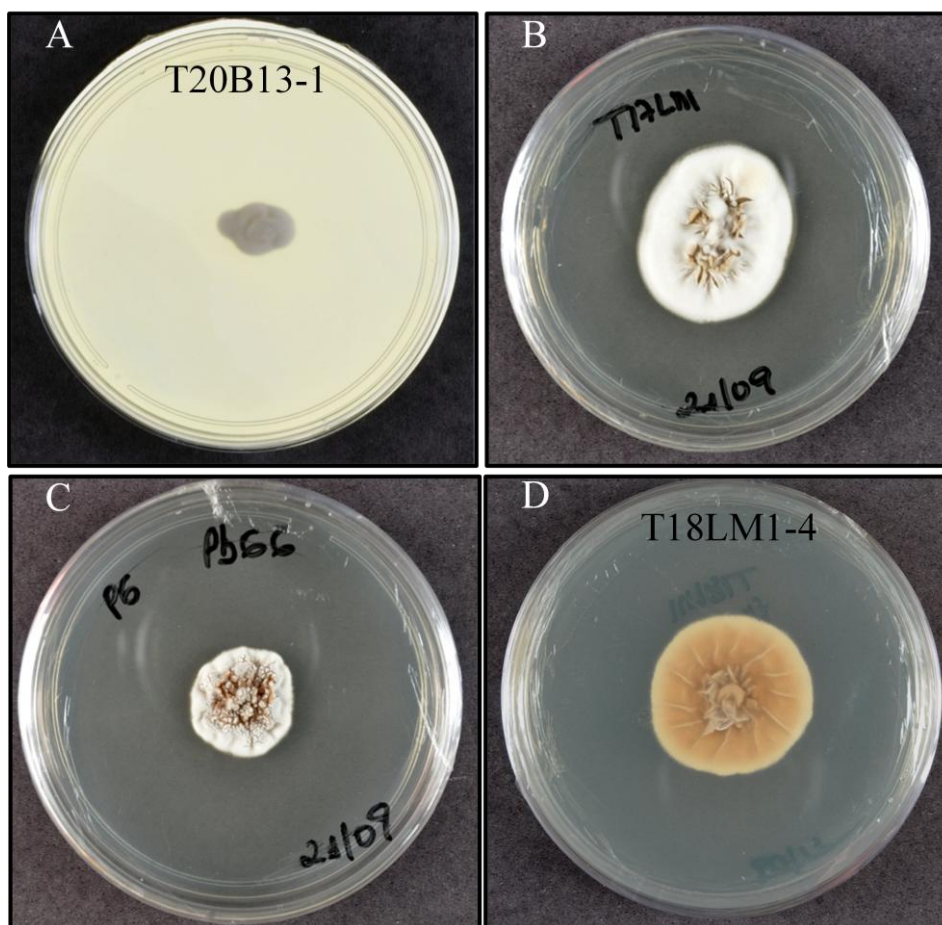


Figura 6: Macromorfologia de *Paracoccidioides* spp cultivado em BDA (25°C). A, B e D: *P. brasiliensis* obtido de *Dasypus novemcinctus*; C: *P. lutzii*, isolado clínico. Fonte: autoria própria.

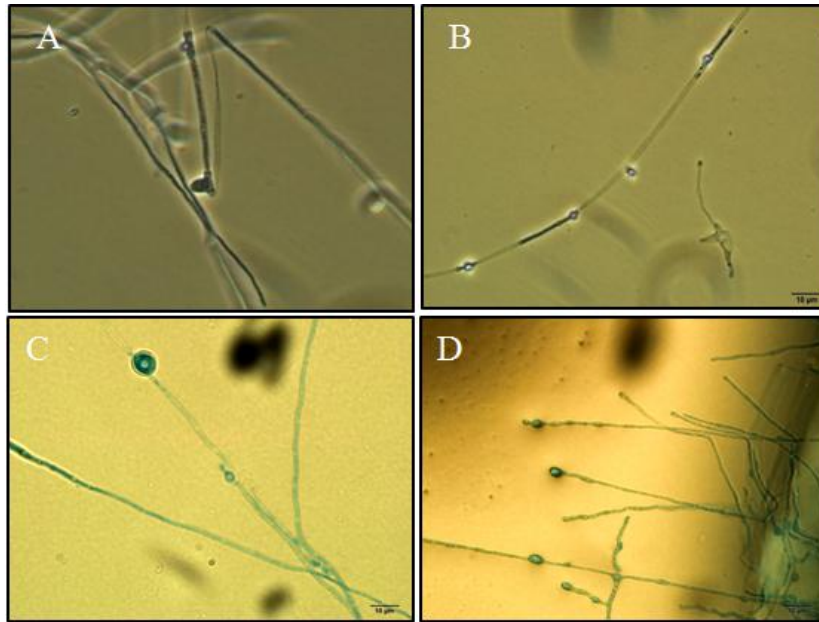


Figura 7: Conídias de *P. brasiliensis* (T18LM1), A e B: arthroconídias. *P. lutzii*, C: clamidoconídio (Pb66) e D: aleuroconídias (PbEE). Fonte: autoria própria.

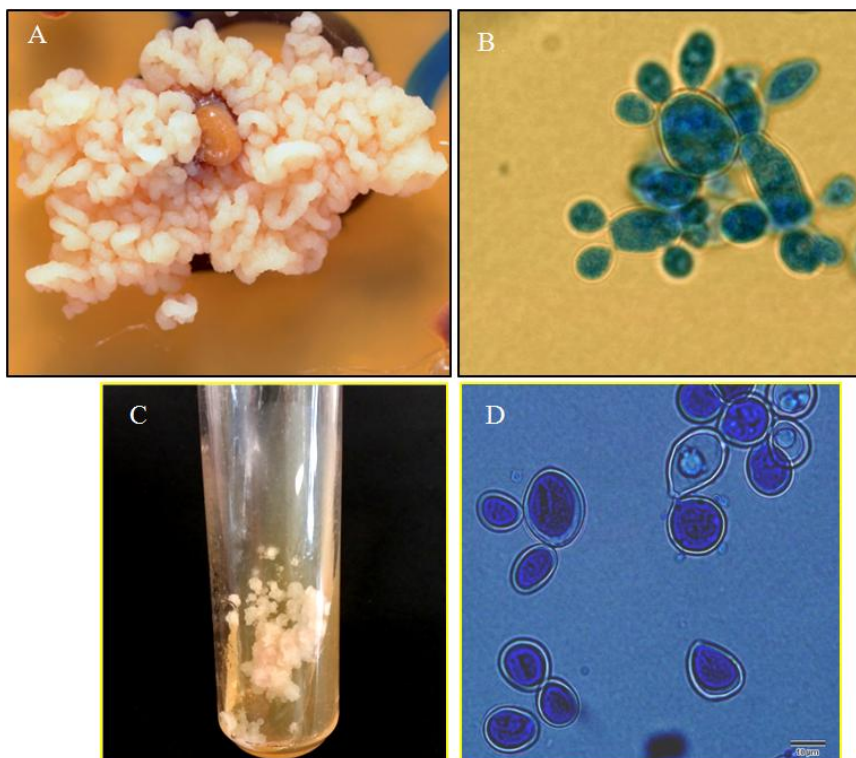


Figura 8: Macro e micromorfologia de *Paracoccidioides* spp. A: levedura em Mycosel, C: leveduras em GPYA (35°C), B e D: leveduras coradas com lactofenol azul de algodão (100x). A e B: T17LM1, C e D: T19B7-2, *P. brasiliensis* obtidas de *D. novemcinctus*. Fonte: autoria própria.

Virulência de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*

Os fatores de virulência são em geral moléculas (proteínas e lipídeos) presentes na parede celular do fungo, essenciais, na infecção e disseminação de *Paracoccidioides* spp. porque interagem com os receptores de superfície celular ou com a matriz extracelular do hospedeiro.

As proteínas 14-3-3 e enolase atuam como adesinas e tem um papel importante durante a infecção por *Paracoccidioides* spp. Oliveira et al., 2015 demonstraram uma correlação entre adesão e taxa de sobrevivência de camundongos (C57BL/6), em que, maior adesão do fungo, mais adesinas são expressas. Após o bloqueio dessas proteínas (14-3-3 e enolase) com anticorpos anti-adesina, e foi observado alterações de virulência em *P. brasiliensis* (Pb18) e *P. lutzii* (Pb01). Em outro experimento, Pb18 e Pb01 tiveram os genes 14-3-3 e enolase bloqueados; as leveduras foram inoculadas em larvas de *Galleria mellonella*, e foi observado uma redução na virulência *P. brasiliensis* e *P. lutzii* confirmando a relação entre adesinas e virulência.

Em outro estudo, a relevância da proteína Pb14-3-3 para a virulência foi avaliada em *G. mellonella* inoculadas com os isolados PbWT (tipo selvagem) e PbEV com ~55% do gene silenciado. Ao avaliar as unidades formadoras de colônias (UFC), o isolado com reduzida expressão do gene Pb14-3-3, mostrou ser menos virulento do que o tipo selvagem, confirmando a relação dessa adesina na aderência do fungo ao tecido do hospedeiro (MARCOS et al., 2016).

Diversos microrganismos (bactérias e fungos) sintetizam a melanina, um pigmento hidrofóbico de alto peso molecular que em geral são pretos ou castanhos e atuam como um fator de virulência. Os fungos são capazes de depositar a melanina na parede celular e remodelar durante o crescimento. As cepas melanizadas de *Paracoccidioides* spp. (Figura 9) parecem obter alguns benefícios, como, escapar mais facilmente da resposta imune do hospedeiro, ser mais resistente à ação dos macrófagos, à radiação ultravioleta (UV), maior tolerância a injúrias ambientais no solo, bem como, uma redução na susceptibilidade a medicamentos antifúngicos, como a anfotericina B (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003; TABORDA et al., 2008). Em *Cryptococcus neoformans*, e em outros microrganismos, a melanina protege as células fúngicas contra lesões oxidativas e com isso aumenta a capacidade de virulência dos fungos. O modelo de estudo em *C. neoformans* está bem consolidado e as células desse patógeno são encontradas

melanizadas no tecido favorecendo a sobrevivência e conseqüentemente, a possibilidade de causar doença (CASADEVALL; ROSAS; NOSANCHUK, 2000).

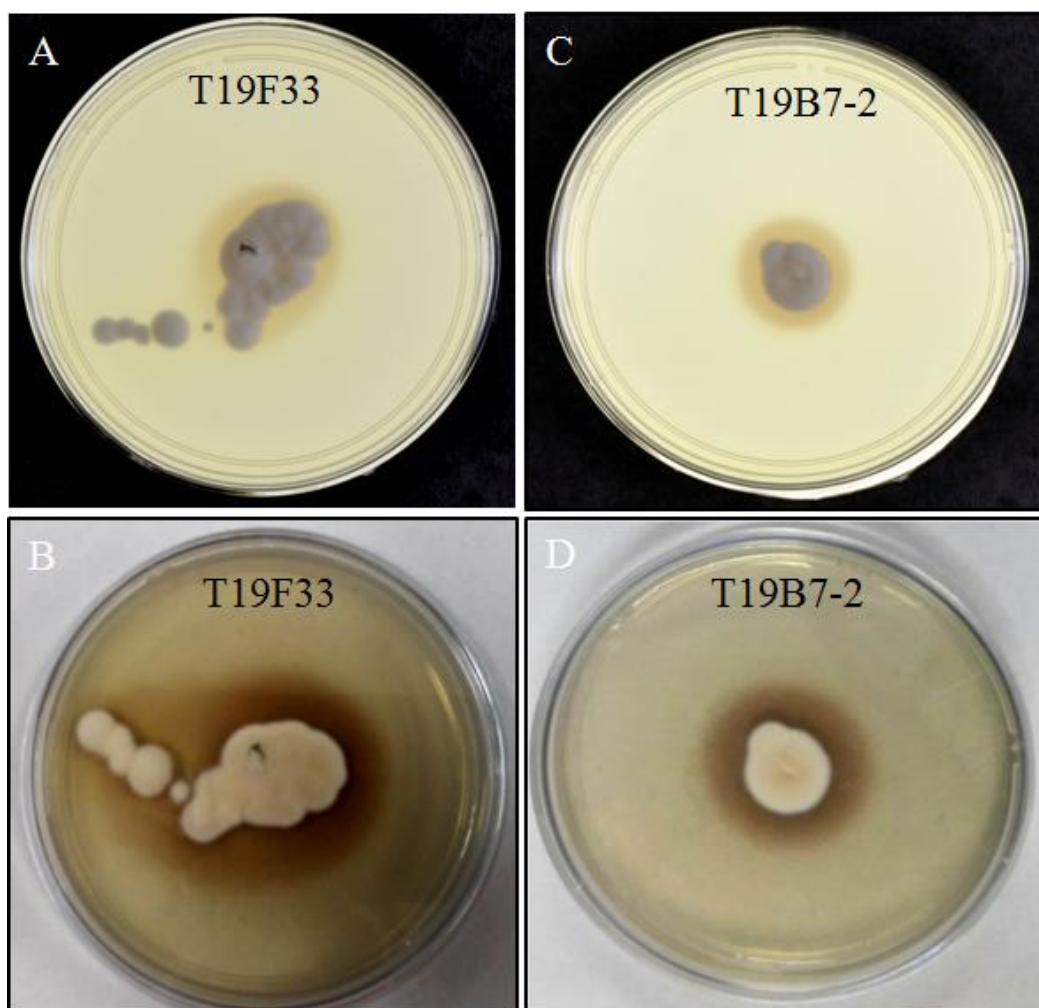


Figura 9: Produção de melanina por cepas de *P. brasiliensis* isoladas de *D. novemcinctus* difundindo pelo meio BDA. A e C (30 dias), B e D (60 dias). Fonte: autoria própria.

A gp43 é uma proteína presente na parede celular de leveduras de *P. brasiliensis* que foi descrita por Puccia et al. (1986) (PUCCIA et al., 1986). É o principal antígeno detectado em soro de pacientes com PCM e tem sido amplamente estudada. É considerado um fator de virulência por ser um receptor e interagir com a laminina presente na matriz extracelular, aumentando assim, a habilidade do fungo em invadir e colonizar o tecido do hospedeiro. O grau de adesão de diferentes isolados de *P.*

brasiliensis (Pb18, 113, 265 e 113M - isolado mutante que não expressa a gp43) foi avaliado em cultura de células Vero de mamíferos. Os autores observaram que as leveduras aderiram, não apenas nas junções celulares, mas a célula inteira ficou susceptível a invasão, processo confirmado por microscopia eletrônica. Dentre os isolados avaliados, o Pb18 teve um grau de aderência maior enquanto que os isolados 265 e 113M (mutante que não expressa a gp43) tiveram baixa adesão (HANNA; MONTEIRO; GIANNINI, 2000).

Ecologia de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*

Várias evidências indicam que a infecção humana ocorre pela inalação de conídios de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* produzidos na fase micelial, presentes, no solo e em aerossóis (ARANTES et al., 2013; BAGAGLI et al., 2006; NEGRONI P., 1966).

As características ambientais das regiões ou áreas que parecem ser favoráveis ao desenvolvimento do fungo na fase micelial são solos úmidos, com presença de corpos d'água e vegetação abundante (BARROZO et al., 2009; RESTREPO, 1985). Além disso, as características físico-químicas do solo podem ter relação com o crescimento e a presença do fungo nos diferentes ambientes terrestres. O desenvolvimento de *P. brasiliensis* foi avaliado em amostras de solo com diferentes texturas (arenosa, argilosa e média) coletadas em área hiperendêmica da PCM. Os autores observaram que alguns isolados de *P. brasiliensis* cresceram bem, independente da textura do solo e com elevado teor de umidade, mas o crescimento foi limitado nas amostras com alto valor de alumínio trocável (H+Al) (TERÇARIOLI et al., 2007). Restrepo et al., 2000, descreveram várias características das áreas onde o isolamento de *P. brasiliensis* foi positivo em tatus (*D. novemcinctus*), em uma delas é o pH do solo numa faixa de 3.9–6.0, sugerindo que um solo levemente ácido seria mais propício ao crescimento dessa espécie.

O solo é um ambiente com uma grande diversidade de grupos de microorganismos, sendo considerado o habitat de inúmeras populações, no qual desempenham um papel importante na ciclagem da matéria orgânica, nos ciclos biogeoquímicos, participando da formação e estruturação dos solos (CARDOSO, 1992).

Essa abundância de micro-organismos é influenciada pelos fatores bióticos e abióticos, pela ação antrópica (uso do solo) e cobertura vegetal nos diferentes biomas. Além disso, com essa rica biodiversidade, isolar fungos diretamente do solo, especialmente aqueles que apresentam crescimento lento (vários dias) e são nutricionalmente exigentes como é o caso das espécies do gênero *Paracoccidioides*, torna-se um desafio devido à competição entre as espécies e a sobreposição daquelas de rápido crescimento (leveduras e fungos filamentosos).

O isolamento de *P. brasiliensis* do solo só foi possível de forma indireta através da inoculação em camundongos. Nesse trabalho, os autores avaliaram 760 amostras de solo coletadas da camada superficial em plantação de cafezais durante um ano. As amostras foram inoculadas por via intraperitoneal em camundongos (C57BI6) e, em uma delas, foi possível isolar *P. brasiliensis* do fígado de um animal, que foi confirmado ser *P. brasiliensis* pelo termo-dimorfismo e análise histológica (SILVA-VERGARA et al., 1998). Outros autores também registraram o isolamento desta espécie a partir do solo (ALBORNOZ MCB, 1971; FERREIRA et al., 1990; NEGRONI P., 1966; SHOME SK; BATISTA AC, 1963), tendo ressalva em alguns casos, sobre a aceitação desses isolamentos, devido a não repetibilidade dos achados. Esses dados foram analisados por (FRANCO et al., 2000) que observaram que os autores obtiveram muitos resultados negativos na tentativa de isolamento desta espécie da natureza, e que os mesmos não caracterizaram o tipo e nem a composição dos solos estudados, mantendo a mesma metodologia desde o primeiro estudo realizado.

A técnica para isolamento de fungos do solo de forma indireta tem utilizado camundongos ou hamster inoculados com amostras de solo e posterior cultivo dos seus órgãos (baço e fígado) em meios enriquecidos e suplementados com antibióticos. Essa metodologia tem sido aplicada para outras espécies da ordem Onygenales, como *Histoplasma capsulatum*, que também tem um crescimento lento, e foi primeiramente isolado de solo proveniente de um galinheiro em Minas Gerais através da inoculação via intraperitoneal em camundongos (ARAUJO, 1970).

Esta dificuldade de isolamento levou ao desenvolvimento de técnicas moleculares sensíveis capazes de detectar o DNA do fungo nas amostras ambientais (solo e aerossol) e com isso melhorar a compreensão da ecologia deste patógeno. Para isso, foi idealizado a técnica do Nested PCR para a região do rDNA (ITS1-5.8S-ITS2)

utilizando os *primers* ITS4 e ITS5 (WHITE et al., 1990) considerados universais para fungos. Uma segunda reação de PCR é utilizada empregando-se *primers* específicos para *Paracoccidioies* spp. como os *primers* PbITS-E e PbITS-R que amplificavam um fragmento interno específico para *P. brasiliensis*, entretanto, não detectavam o *P. lutzii*, o que levou os pesquisadores ao desenho de um outro *primer*, o PbITS-T (antisense) (Figura 10), para ser empregado na Nested PCR. Dessa forma, a combinação dos *primers* PbITS-E e PbITS-T permitiu a amplificação de ambas as espécies, necessitando a realização do sequenciamento para a correta identificação. Além das amostras de solo, essa técnica também permitiu a detecção de *Paracoccidioides* spp. em amostras de aerossol coletadas no interior e arredores das tocas de tatu (ARANTES et al., 2013, 2016; THEODORO et al., 2005).

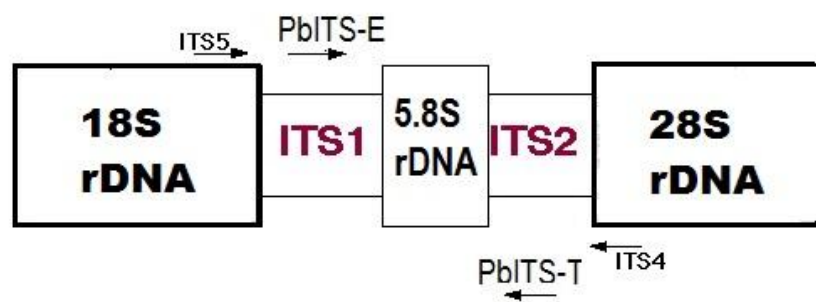


Figura 10: Esquema da região gênica do rDNA fúngico e dos primers universais para fungos (ITS1, ITS4 e ITS5) e específicos (PbIT-E e PbITS-T) para detecção de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* por Nested-PCR.

Os tatus pertencem à superordem Xenarthra, família Dasypodidae. O tatu de nove bandas, *D. novemcinctus*, é a segunda maior espécie do gênero encontrado em uma variedade de habitats, como florestas subtropicais e tropicais fortemente degradadas, terras aráveis, pastagens, jardins rurais, áreas urbanas e plantações. Possuem hábitos

crepuscular/noturno e temperatura corporal baixa de aproximadamente 34,5°C (MCNAB, 1980). São insetívoros e sua dieta é composta basicamente por invertebrados; durante o forrageamento, eles empurram o focinho sobre o solo solto ou serrapilheira para desenterrar larvas, besouros, minhocas, formigas e cupins. Essa espécie está amplamente distribuída, ocorrendo desde o Sul dos Estados Unidos até o México, da América Central até o Sul da Argentina (Figura 11). Apesar da ampla presença dessa espécie nas Américas, a movimentação dos indivíduos (jovens e adultos) em uma população entre 1992-1995 foi menos de 200m, e alguns indivíduos podem permanecer numa mesma área por um longo período (LOUGHRY; MCDONOUGH, 1998). Além disso, são consideradas relativamente tolerantes as alterações ambientais (ICMBIO, 2017; MCBEE; BAKER, 1982).

Nas áreas endêmicas da PCM, *P. brasiliensis* tem sido regularmente isolado de *D. novemcinctus*. Essa associação do fungo com os tatus (MONTENEGRO et al., 1996), foi relatado em animais no Estado do Pará e confirmado em outros estudos no Brasil e na Colômbia (ARANTES et al., 2013; BAGAGLI et al., 2006; BAGAGLI; SANO, 1998; CORREDOR et al., 1999; NAIFF et al., 1986; SILVA-VERGARA et al., 2000). Os genótipos de *P. brasiliensis* que estão no ambiente infectando os tatus, provavelmente estão circulando e infectando humanos nas diferentes áreas endêmicas da PCM. *Paracoccidioides brasiliensis*, também vem sendo isolado de animais domésticos, como os cachorros. Até o momento foi isolado das raças doberman e labrador com linfadenomegalia generalizada, dermatitis e linfadenite associada (DE FARIAS et al., 2011; HEADLEY et al., 2017; RICCI et al., 2004). A infecção de mamíferos por *P. brasiliensis* parece ser mais comum do que se imaginava, no entanto, *P. lutzii* aparenta manter uma relação diferente com o tatu *D. novemcinctus*, uma vez que, embora seu DNA seja detectado em amostras de solo e aerossol nas áreas endêmicas da PCM, até o momento, tentativas de seu isolamento em tatus foram negativas (ARANTES et al., 2013, 2016).

Estudos sorológicos têm sido utilizados para detectar anticorpos anti-*Pb* em soro de diferentes espécies de animais domésticos e silvestres, como cães, equinos, bovinos, caprinos, ovinos, felinos, suínos, galinhas e primatas (BELITARDO et al., 2014; FERREIRA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2012; ONO et al., 2001) demonstrando a infecção de *P. brasiliensis* nesses animais. Oliveira et al. (2011 e 2012) fizeram uma

pesquisa sorológica empregando a técnica ELISA para detectar anticorpos contra *P. brasiliensis* em galinhas (*Gallus domesticus*) soltas e fechadas, bem como, carneiros em três sistemas de pastagem (intensivo, semi-intensivo e extensivo). A reação de positividade para *P. brasiliensis* foi alta em ambos os animais que viviam soltos, como o sistema extensivo e que naturalmente tem maior contato com o solo. Testes sorológicos também foram realizados em equinos de diferentes propriedades no Rio Grande do Sul, e quando associado à origem dos animais com as características ecológicas das propriedades, foi observada uma diferença significativa (30%) de positividade nos equinos, sugerindo que os fatores ecológicos podem ter relação com a presença do fungo no ambiente (PAULA et al., 2015).

Além de testes sorológicos, o uso das ferramentas moleculares evidencia que diferentes espécies de animais silvestres também são infectadas pelo fungo, como demonstrado pela detecção do DNA de *P. brasiliensis* em amostras de tecidos de animais silvestres mortos por atropelamento em rodovias que cortam áreas endêmicas da PCM no Estado de São Paulo (RICHINI-PEREIRA et al., 2008).

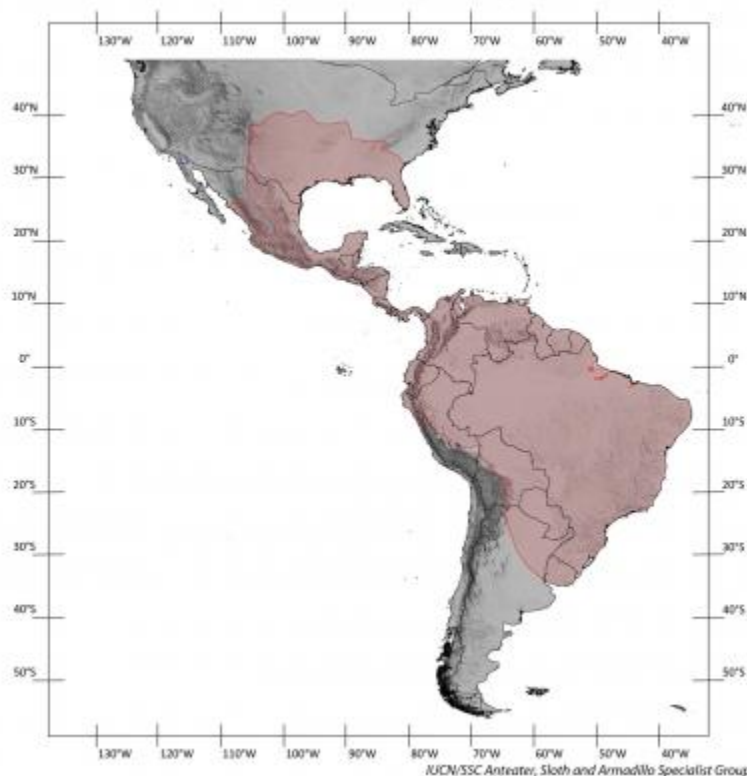


Figura 11: Mapa de distribuição da espécie *D. novemcinctus* nas Américas. Fonte: (ABBA e SUPERINA, 2010).

A distribuição de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* tende a ser heterogênea e necessita de um melhor entendimento da ecologia, biogeografia e evolução dessas espécies que ajude a explicar a presença desses fungos nas diferentes regiões brasileiras. *Paracoccidioides lutzii* foi primeiramente relatado como sendo originário da região Centro-Oeste do Brasil devido ao isolamento desta espécie em pacientes que residiam nos Estados de Mato Grosso (PbEE, Cuiabá) e Goiás (Pb01 e Pb66, Goiânia). Posteriormente, foi relatado um isolado atípico de *P. brasiliensis* (IFM54648, LDR2) obtido de um paciente no Paraná, e que tinha vivido em Botucatu/SP suspeito de ser *P. lutzii* (TAKAYAMA et al., 2010). A partir dos isolamentos clínicos, *P. lutzii* está presente em quatro, (Norte, Sul, Sudeste e Centro-Oeste, 80%) das cinco regiões do Brasil.

O mapeamento de regiões geográficas utilizando *D. novemcinctus* tem se mostrado promissor devido à repetibilidade dos isolamentos de *Paracoccidioides* spp. A obtenção de genótipos regionais poderá ser empregada na preparação de antígenos mais específicos facilitando o diagnóstico sorológico. Além do que, nunca foi realizado um

estudo no norte do Estado de Mato Grosso em que as condições edafoclimáticas são semelhantes às consideradas favoráveis ao crescimento de *P. brasiliensis*, bem como, há um aumento do número de casos de PCM na região. Este é o primeiro isolamento de *Paracoccidioides* spp. de *D. novemcinctus* em Mato Grosso, que associado ao recente aumento de casos clínicos, reforça a posição do Estado como área endêmica da Paracoccidioidomicose.

Referências

- ABBA, A. M.; SUPERINA, M. **Nine-banded armadillo**. Disponível em: <<http://xenarthrans.org/species/details/category/1/specie/28/Ninebanded+armadillo>>.
- ALBORNOZ, M. DE. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, v. 9, n. 3, p. 248–253, 1971.
- ALBORNOZ MCB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, v. 9, p. 248–253, 1971.
- ARANTES, T. D. et al. Detection of *Paracoccidioides* spp. in environmental aerosol samples. **Medical Mycology**, v. 51, n. 1, p. 83–92, jan. 2013.
- ARANTES, T. D. et al. Environmental Mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil Reveals New Clues into Genetic Diversity, Biogeography and Wild Host Association. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. 1–18, 2016.
- ARAÚJO, F. G. DE. Primeiro isolamento de *Histoplasma capsulatum* de solo em Minas Gerais. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo.**, v. 12, n. 3, p. 185–191, 1970.
- BAGAGLI, E. et al. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 41, n. 3, p. 217–223, 2003.
- BAGAGLI, E. et al. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 6, n. 5, p. 344–51, set. 2006.
- BAGAGLI, E.; SANO, A. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, n. 4, p. 505–512, 1998.
- BARROZO, L. V. et al. First description of a cluster of acute/subacute paracoccidioidomycosis cases and its association with a climatic anomaly. **PLoS**

neglected tropical diseases, v. 4, n. 3, p. e643, jan. 2010.

BARROZO, L. V et al. Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil. **International journal of epidemiology**, v. 38, n. 6, p. 1642–1649, dez. 2009.

BELITARDO, D. R. et al. Detection of Antibodies Against Paracoccidioides brasiliensis in Free-Range Domestic Pigs (Sus scrofa). **Mycopathologia**, v. 177, n. 1–2, p. 91–95, 2014.

CARDOSO, E. J. B. . **Microbiologia do Solo**. Campinas: Sociedade Brasileira da Ciência do Solo, 1992.

CARVALHOSA, A. A. DE et al. Paracoccidioidomycosis prevalence in a public laboratory of the Brazilian unified health system. **J. Oral Diag.**, v. 1, n. 1, p. 31–35, 2016.

CASADEVALL, A.; ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in Cryptococcus neoformans. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 354–358, 2000.

COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. **Medical Mycology**, v. 49, n. 8, p. 785–798, 2011.

CORREDOR, G. G. et al. Isolation of Paracoccidioides brasiliensis from the nine-banded armadillo Dasypus novemcinctus, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. **Revista iberoamericana de micologia : organo de la Asociacion Espanola de Especialistas en Micologia**, v. 16, n. 4, p. 216–220, 1999.

CORREDOR, G. G. et al. The naked-tailed armadillo Cabassous centralis (Miller 1899): a new host to Paracoccidioides brasiliensis . Molecular identification of the isolate. **Medical Mycology**, v. 43, n. 3, p. 275–280, 2005.

COUTINHO, Z. F. et al. Hospital morbidity due to paracoccidioidomycosis in Brazil (1998-2006). **Tropical Medicine and International Health**, v. 20, n. 5, p. 673–680, 2015.

COUTINHO ZF, SILVA D, LAZÉRA M, ET AL. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Caderno Saúde Pública**, v. 18, n. 5, p. 1441–1454, 2002.

DE FARIAS, M. R. et al. Paracoccidioidomycosis in a Dog: Case Report of Generalized Lymphadenomegaly. **Mycopathologia**, v. 172, n. 2, p. 147–152, 2011.

DE OLIVEIRA, H. C. et al. Importance of adhesins in virulence of Paracoccidioides spp. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAR, p. 1–14, 2015.

FERREIRA, J. B. et al. Evaluation of Paracoccidioides brasiliensis Infection in Dairy Goats. **Mycopathologia**, v. 176, n. 1–2, p. 95–99, 2013.

FERREIRA, M. S. et al. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dogfood probably contaminated with soil in Uberlândia, Brazil. **Medical Mycology**, v. 28, n. 3, p. 253–256, jan. 1990.

FLORIANO, A. Estudos comparativos do granuloma coccidioidico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasito brasileiro. **An. Fac. Med. S. Paulo**, v. 5, p. 125–142, 1930.

FRANCO, M. et al. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 20, n. 2, p. 129–32, 1987.

FRANCO, M. et al. Review article A critical analysis of isolation of Paracoccidioides brasiliensis from soil. **Medical Mycology**, v. 38, n. February, p. 185–191, 2000.

GEZUELE, E. **Aislamento de Paracoccidioides sp. de heces de pinguino de la Antártida. In. International Meeting on Paracoccidioidomycosis, AnaisCaracas**, 1989.

HAHN, R. C. et al. Fatal Fungemia due to Paracoccidioides lutzii. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 91, n. 2, p. 394–8, 6 ago. 2014.

HANNA, S. A.; MONTEIRO, J. L.; GIANNINI, M. J. S. M. Adherence and intracellular parasitism of Paracoccidioides brasiliensis in Vero cells. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 877–884, 2000.

HEADLEY, S. A. et al. Paracoccidioides brasiliensis-associated dermatitis and lymphadenitis in a dog. **Mycopathologia**, v. 182, n. 3, p. 425–434, 2017.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.**, 2016. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>

ICMBIO. **Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade**, 2017. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br>>

INPE **Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais.** , 2016. Disponível em: <<http://www.inpe.br/>>

IRINYI, L. et al. International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database--the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. **Medical Mycology**, v. 53, n. 4, p. 313–337, 2015.

JORGE, L. A. B.; SARTORI, M. S. Uso do Solo e Análise Temporal da Ocorrência de Vegetação Natural na Fazenda Experimental Edgardia, em Botucatu-SP. **Revista Árvore**, v. 26, n. 3, p. 585–592, 2002.

KIMURA M. **A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences.**Journal of Molecular Evolution, , 1980.

LACAZ, C. DA S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico.** [s.l: s.n.]. v. 33

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de Micologia médica.** 9. ed. [s.l: s.n.].

LARONE, D. H. **Davise H.** 5. ed. Washington, DC: Medically important fungi: A guide

to identification, 1939.

LOUGHRY, W. J.; MCDONOUGH, C. M. Spatial Patterns in a Population of Nine-banded Armadillos (*Dasyus novemcinctus*). **Am Midl Nat**, v. 140, n. 1, p. 161–169, 1998.

LUTZ, A. Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. **O Brazil-Medico, Revista Semanal de Medicina e Cirurgia**, n. 22, p. 121–141, 1908.

MARCOS, C. M. et al. Decreased expression of 14-3-3 in *Paracoccidioides brasiliensis* confirms its involvement in fungal pathogenesis. **Virulence**, v. 7, n. 2, p. 72–84, 2016.

MARQUES, A. F. et al. Peptide immunization as an adjuvant to chemotherapy in mice challenged intratracheally with virulent yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2814–2819, 2006.

MARQUES, S. A. Paracocidioidomicose. In: ZAITIS, C. et al. (Eds.). . **Compêndio de Micologia Médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: [s.n.]. p. 460.

MARTINEZ, R. Epidemiology of *Paracoccidioidomycosis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 19, p. 11–20, 2015.

MARTINEZ, R. New Trends in *Paracoccidioidomycosis* Epidemiology. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 1–13, 2017.

MATUTE, D. R. et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Molecular biology and evolution**, v. 23, n. 1, p. 65–73, jan. 2006.

MAYORGA, O. et al. The role of adjuvants in therapeutic protection against *paracoccidioidomycosis* after immunization with the P10 peptide. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. MAY, p. 1–6, 2012.

MCBEE, K.; BAKER, R. J. *Dasyus novemcinctus*. **Mammalian Species**, n. 162, p. 1–9, 1982.

MCCULLOUGH, M. et al. Molecular epidemiology of *Blastomyces dermatitidis*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, p. 328–335, 2000.

MCDONOUGH C M.; LOUGHRY W J. Behavioral ecology of armadillos. In: S. F. VIZCAÍNO & W. J. LOUGHRY (Ed.). . **The Biology of the Xenarthra**. Florida: University Press of Florida, 2008. p. 281–293.

MCNAB, B. K. Energetic and the limits to a temperature distribution in armadillos. **American Society of Mammalogists**, v. 61, n. 4, p. 606–627, 1980.

MONTENEGRO, M. R. et al. Isolation of fungi from nature in the region of Botucatu, State of São Paulo, Brazil, an endemic area of *paracoccidioidomycosis*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 665–670, 1996.

MONTENEGRO, M. R. G. Formas Clínicas da *Paracoccidioidomicose*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 1986.

- MUÑOZ, J. F.; FARRER, R. A.; DESJARDINS, C. A. ET AL. Genome Diversity, Recombination, and Virulence across the Major Lineages of *Paracoccidioides*. **mSphere**, v. 1, n. 5, p. 1–18, 2016.
- NAIFF, R. D. et al. Paracoccidioidomicose enzoótica em tatus (*Dasytus novemcinctus*) no estado do pará. **Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo**, v. 28, n. 1, p. 19–27, 1986.
- NCBI. **Basic Local Alignment Search Tool**. Disponível em: <<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast>>. Acesso em: 20 mar. 2015.
- NEGRONI P. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente en suelo Argentino. **Pren Med Argent**, v. 53, p. 2381–2382, 1966.
- NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cellular Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 203–223, 2003.
- OLIVEIRA, G. G. et al. Serological Survey of Paracoccidioidomycosis in Sheep. **Mycopathologia**, v. 173, n. 1, p. 63–68, 2012.
- ONO, M. A. et al. Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. **Medical Mycology**, v. 39, n. 3, p. 277–82, jun. 2001.
- PAN AMERICAN SYMPOSIUM ON PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS. **Paracoccidioidomycosis; proceedings of the first Pan American symposium, 25-27 October 1971, Medellín, Colombia**. Washington: Washington, Pan American Health Organization, 1972., 1971
- PANIAGO, A. M. et al. Paracoccidioidomicose : estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no Estado de Mato Grosso do Sul Paracoccidioidomycosis : a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul. v. 36, n. 4, p. 455–459, 2003.
- PAULA, A. et al. Seroepidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in horses from Rio Grande do Sul , Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 513–517, 2015.
- PUCCIA, R. et al. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: Identification of a specific antigen. **Infection and Immunity**, v. 53, n. 1, p. 199–206, 1986.
- RESTREPO, A. et al. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: Implications for resistance of females to Paracoccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, v. 46, n. 2, p. 346–353, 1984.
- RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia**, v. 23, n. 5, p. 323–334, 1985.
- RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G.; CASTAÑEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 39, n. 3, p. 233–241, 2001.

- RICCI, G. et al. Canine paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**, v. 42, n. 4, p. 379–383, 2004.
- RICHINI-PEREIRA, V. B. et al. provenientes de uma reserva de Cerrado do Instituto Lauro de Souza Lima (Bauru , SP) Paracoccidioides brasiliensis detection in armadillos (Dasypus novemcinctus) from a Savanna reserve at the Lauro de Souza Lima Institute (Bauru , SP). v. 5, n. 56, p. 4–8, 2008.
- ROBERTO, T. N. et al. Identifying Paracoccidioides phylogenetic species by PCR-RFLP of the alpha-tubulin gene. **Medical Mycology**, v. 54, n. 3, p. 240–247, 2016.
- SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A. Morphogenesis of the mycelium-to-yeast transformation in Paracoccidioides brasiliensis. **Sabouraudia**, v. 23, n. 1, p. 7–11, 1985.
- SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus Paracoccidioides brasiliensis. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 3, p. 711–713, 1988.
- SANO, A. et al. Pathogenicities and GP43kDa gene of three Paracoccidioides brasiliensis isolates originated from a nine-banded armadillo (Dasypus novemcinctus). **Mycopathologia**, v. 144, n. 2, p. 61–65, 1998.
- SANTOS, S. S. et al. Targeting the P10 peptide to maturing dendritic cells via the Dec-205 receptor: P682in vivo:: P682a new vaccine strategy against Paracoccidioidomycosis: P682. **Mycoses**, v. 55, p. 309, 1 jun. 2012.
- SES. **Secretaria de Estado de Saude**Cuiabá, 2016. Disponível em: <www.saude.mt.gov.br/legislacao>
- SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Guidelines in paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297–310, 2006.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A. Paracoccidioidomycosis Treatment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 57 Suppl 1, n. 1, p. 31–37, 2015.
- SHOME SK; BATISTA AC. Occurrence of Paracoccidioides brasiliensis in the soil of Recife, Brazil. **Revista da Faculdade de Medicina Federal Ceara**, v. 3, p. 90–94, 1963.
- SILVA-VERGARA, M. L. et al. Isolation of a Paracoccidioides brasiliensis strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. **Medical Mycology**, v. 36, n. October 1997, p. 37–42, 1998.
- SILVA-VERGARA, M. L. et al. Isolation of Paracoccidioides brasiliensis from armadillos (Dasypus novemcinctus) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Medical mycology**, v. 38, n. 3, p. 193–199, 2000.
- SPLENDRE, A. Zymonematoses with localization in the mouth cavity observed in Brazil. **Bull Soc Path Exot**, v. 5, p. 313 – 319, 1912.
- STOCKER HJ. **of Mathematics and Computational Science**. New York: Springer, 1998.

TABORDA, C. P. et al. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi. **Growth (Lakeland)**, v. 165, n. 4–5, p. 331–339, 2008.

TABORDA, C. P. et al. Paracoccidioidomycosis: Challenges in the Development of a Vaccine Against an Endemic Mycosis in the Americas. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57 Suppl 1, n. 1, p. 21–24, 2015.

TAKAYAMA, A. et al. An atypical *Paracoccidioides brasiliensis* clinical isolate based on multiple gene analysis. **Medical Mycology**, v. 48, n. 1, p. 64–72, 2010.

TAMURA, K. Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions When There Are Strong Transition-Transversion and G+C-Content Biases. **Molecular biology and evolution**, v. 9, n. 4, p. 678–687, 1992.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.

TEIXEIRA, M. D. M. et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. **Medical mycology**, v. 52, n. 1, p. 19–28, jan. 2013a.

TEIXEIRA, M. DE M. et al. Molecular and morphological data support the existence of a sexual cycle in species of the genus *Paracoccidioides*. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 3, p. 380–389, 2013b.

TEIXEIRA, M. M. et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 52, n. 2, p. 273–83, ago. 2009.

TERÇARIOLI, G. R. et al. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. **BMC Microbiology**, v. 7, p. 92, jan. 2007.

THEODORO, R. C. et al. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. **Medical Mycology**, v. 43, n. 8, p. 725–729, jan. 2005.

THEODORO, R. C. et al. Genus *Paracoccidioides*: Species recognition and biogeographic aspects. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

TRAVASSOS, L. R. et al. Attempts at a peptide vaccine against paracoccidioidomycosis, adjuvant to chemotherapy. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4–5, p. 341–352, 2008.

TURISSINI, D. A. et al. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 106, n. June, p. 9–25, 2017.

UNTEREINER, W. A. et al. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. v. 96, n. 4, p. 812–821, 2004.

VIEIRA, G. D. D. et al. Case Report Article Paracoccidioidomycosis in a western Brazilian Amazon State: Clinical-epidemiologic profile and spatial distribution of the disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 1, p. 63–68, 2014.

VOLPATO, M. C. P. F. et al. Distribuição Espacial dos Casos de Paracoccidiodomicose com Manifestações Bucais no Estado de Mato Grosso. **Revista Odontológica do Brasil Central**, v. 25, n. 72, p. 84–87, 2016.

WANKE, B., AIDÊ, M. A. Curso de Atualização – Micoses. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 12, p. 1245–1249, 2009.

WANKE B.; LONDERO, A. **Epidemiology and paracoccidiodomycosis infection**. CRC Press: Boca Raton, 1994.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, MA., GELFAND DH., SNINSKY JJ., WHITE, T. (Ed.). . **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1990. p. 315–322.

Objetivo Geral

Investigar a ecologia de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* mediante o isolamento, detecção e identificação do fungo em amostras ambientais das regiões Sudeste e Centro-Oeste.

Objetivos específicos

- Isolar os fungos *P. brasiliensis* e *P. lutzii* do tatu de nove bandas *D. novemcinctus* nos estados de São Paulo e Mato Grosso, Brasil.
- Caracterizar molecularmente os genótipos de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* que ocorrem nos estados de São Paulo e Mato Grosso, Brasil.
- Detectar molecularmente *Paracoccidiodess* spp. em amostras de tecido (baço, fígado e linfonodos mesentéricos) de tatus *D. novemcinctus* nos estados de São Paulo e Mato Grosso, Brasil.
- Avaliar o crescimento colonial saprofítico e quantificar a produção de conídios de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* dos isolados provenientes dos estados de São Paulo e Mato Grosso, Brasil.

- Mapear áreas de ocorrência *P. brasiliensis* e *P. lutzii* pela detecção molecular em amostras de solo de tocas de tatus *D. novemcinctus* nos estados de São Paulo e Mato Grosso, Brasil.
-

Capítulo 2:

Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis* and *P. lutzii* and related species: infection in armadillos, soil occurrence and mycological aspects

Artigo publicado em 06/01/2018

Medical Mycology, doi: 10.1093/mmy/myx142

Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*, *P. lutzii* and related species: infection in armadillos, soil occurrence and mycological aspects

Marluce Francisca Hrycyk¹, Hans Garcia Garces², Sandra de Moraes Gimenes Bosco², Sílvio Luis de Oliveira², Sílvio Alencar Marques³ and Eduardo Bagagli².

1. Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias, Universidade do Estado de Mato Grosso, Campus de Alta Floresta, Brazil.

2. Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, Brazil.

3. Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, Brazil.

Correspondence: Eduardo Bagagli, Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences, UNESP, Distrito de Rubião Júnior, Botucatu, SP, Brazil 18618-970. Tel: 55 1438116058; Fax: 55 1438153744. E-mail: bagagli@ibb.unesp.br

Abstract

Paracoccidioides brasiliensis and the related species *P. americana*, *P. restrepiensis*, *P. venezuelensis* and *P. lutzii* (Ascomycota, Ajellomycetaceae) are the etiological agents of paracoccidoidomycosis (PCM), one of the most important systemic mycoses in Latin America. They are dimorphic fungi, with a mycelial life cycle in soil and a yeast phase associated with tissues of mammalian hosts. This study aimed to detect *Paracoccidioides* spp. in armadillo tissues and associated soil samples in three well-defined geographic areas, including the Alta Floresta, an area not only endemic for PCM in the central region of Brazil, but also of probable *P. lutzii* occurrence, whose ecology and geographic distribution are poorly elucidated. The isolates were genotyped

by sequencing ITS-rDNA and the *gp43*-exon-2 region, and by PCR-RFLP of alpha tubulin (*tub1*) gene; mycological aspects such as yeast-to-mycelial transition, growth and conidial production in soil extract agar were also evaluated. We confirmed that while armadillos are highly infected by *P. brasiliensis*, including multiple infections by distinct genotypes or species (*P. brasiliensis* and *P. americana*) in the same animal, the same does not hold true for *P. lutzii*, which in turn seems to present less capacity for mycelial growth and conidial production, when developing in a soil-related condition.

Keywords: *Paracoccidioides* spp.; Onygenales; Phylogeny; Molecular detection; *Dasypus novemcinctus*.

Introduction

Paracoccidioides brasiliensis and *P. lutzii* are the etiological agents of Paracoccidioidomycosis (PCM), the most important endemic fungal infection in Latin America, where Brazil, Colombia and Venezuela are the leading countries in number of cases (MARTINEZ, 2015; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). In Brazil, PCM was already confirmed in 27% of the counties, causing hospitalization in 4.3 per 1.0 million inhabitants, and has been ranked as the eighth most frequent cause of death due to chronic or recurrent infectious and parasitic diseases (COLOMBO et al., 2011; COUTINHO et al., 2015; COUTINHO ZF, SILVA D, LAZÉRA M, 2002). Adult male rural workers presenting the chronic clinical form of the disease are the main group affected, although an acute severe form affecting mainly children or young adults may also occur in

nearly 5-10% of cases(LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991; PANIAGO et al., 2003). Treatment of PCM still presents enormous challenges, with frequent relapses and debilitating sequelae(SHIKANAI-YASUDA, 2015).

These pathogens belong to the family Ajellomycetaceae (Onygenales Order), and are typically thermo-dimorphic, presenting yeast cells when they grow in the animal tissues and mycelia in the environment where they produce the infective propagule(RESTREPO; MCEWEN; CASTAÑEDA, 2001; UNTEREINER et al., 2004). Molecular phylogenetic studies have indicated two distinct clades among the genus *Paracoccidioides*: the *brasiliensis* clade that harbors five phylogenetic cryptic species (S1a, S1b, PS2, PS3 and PS4) and the *lutzii* clade containing *P. lutzii* species (MATUTE et al., 2006; MUÑOZ; FARRER; DESJARDINS, 2016; THEODORO et al., 2012). The cryptic species PS2, PS3 and PS4 were recently re-classified as formal species: *P. americana* (PS2), *P. restrepiensis* (PS3) and *P. venezuelensis* (PS4)(TURISSINI et al., 2017)

The geographic distribution of *Paracoccidioides spp* is now being revealed, although the final picture is still far from being completed (THEODORO et al., 2012). *P. brasiliensis sensu strictu* (S1a and S1b) appears to be widely distributed in Brazil and Argentina, where it has been frequently isolated from humans and armadillos (TURISSINI et al., 2017). *P. americana* (PS2) seems to occur less frequently, both in human and armadillos in Brazil, although it was already recovered from a Venezuelan patient, and in some uncommon cases/situations, such as from an infected dog in southern Brazil, from dog food contaminated with soil (in the southeast region of Brazil) and in feces of an Antarctic penguin (DE FARIAS et al., 2011; FERREIRA et al., 1990;

GEZUELE, 1989) *P. restrepiensis* (PS3) occurs mainly in Colombia, both in human and armadillos and in some patients from Brazil (ROBERTO et al., 2016). *P. venezuelensis* (PS4) is restricted to the single environmental isolate obtained from Venezuelan soil (ALBORNOZ, 1971; TURISSINI et al., 2017). The species *P. lutzii* is thought to occur in the central western and northern regions of Brazil, including Goiás, Mato Grosso, Pará and Rondônia states (TEIXEIRA et al., 2009)(TEIXEIRA et al., 2013b). However, the real distribution of *P. lutzii* has not been fully comprehended until now, since it was already isolated from single cases of patients living in Ecuador and also in southeastern Brazil (TAKAYAMA et al., 2010) and, in addition, it has been molecularly detected in aerosol and soil samples outside the clinical range of the disease provoked by this species (ARANTES et al., 2013, 2016).

Natural infection by *P. brasiliensis* in the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus* has been observed repeatedly in several PCM endemic areas of Brazil and Colombia, where the pathogen was also isolated from the naked-tailed armadillo species *Cabassous centralis* (BAGAGLI et al., 2003; BAGAGLI; SANO, 1998; CORREDOR et al., 2005). Armadillos have a less active cellular immune system, body temperature slightly lower than other mammals and are constantly in search of food and protection in the soil, which makes them particularly susceptible to infection by soil-dwelling pathogens, including *P. brasiliensis*. In addition, armadillos present a small home range and no regular migration habits, which makes them ideal for registering the environmental presence of the fungus and for mapping the genotypes that occur in the different endemic areas (BAGAGLI et al., 2003; MCDONOUGH C M.; LOUGHRY W J., 2008).

In this work, we aimed at isolating and molecularly detecting *Paracoccidioides* spp. in armadillo tissues and associated soil samples, which were collected in three well-defined geographic areas, including: i) a small isolated fluvial island (Cerrito), in São Manuel/SP, ii) a positive farm (Edgardia,) in Botucatu/SP, where *P. brasiliensis* and the less common *P. americana* species (former PS2 genotype) were already isolated from armadillos iii) a new endemic area (Alta Floresta) from Central region of Brazil, in Alta Floresta and Paranaíta/MT, the probable occurrence area of *P. lutzii*, whose ecology and geographic distribution is poorly comprehended. Some mycological features of the isolates such as yeast-to-mycelial conversion, growth and conidial production in soil-related substrates were also evaluated. The data herein obtained present biological and ecological differences in *Paracoccidioides* spp. that might be relevant for PCM epidemiology.

Material and Methods

Characteristics of the study areas.

The collections were carried out in three distinct areas, two located in the southeast and one in the central region of Brazil (Figure S1). Area 1 (Edgardia Farm) is an experimental farm of São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo state. The S1 genotype of *P. brasiliensis* and *P. americana* (former PS2 genotype) were already isolated from nine-banded armadillos (*D. novemcinctus*) and PCM has been diagnosed in rural workers that have lived and/or worked there. Some of these patients died of PCM. Area 2 is a small

fluvial island (Cerrito Island, located in São Manuel County, São Paulo state) that was established in the Tietê River in 1962, when the construction of the Barra Bonita Dam caused a natural population of armadillos to become isolated from the rest of the continent; the location is accessible only by boat and has very little human presence. Area 3 is located in Alta Floresta and Paranaíta Counties, Mato Grosso state, central region of Brazil, under the deforestation arc (“INPE Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais”, 2016) of the Amazon Biome, where the local economy is mainly based on agriculture and livestock (IBGE, 2016) (IBGE, 2016). PCM cases have been diagnosed in Alta Floresta, despite its low level of local epidemiological vigilance. Additional ecological data from the sampled areas are provided in Table S1 (Supplementary Material).

Animal and soil sampling

After obtaining the legal authorization from the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA/ICMBio, License number 30585-1) and also from the local Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA, protocol number 737), seven armadillos (six males and one female) were captured using traps settled on the animal track or at the entrance of their burrows: two animals from Edgardia Farm (area 1), two from Cerrito Island (area 2) and three from Alta Floresta and Paranaíta (area 3). The armadillos were maintained in appropriate cages for up to 24h and then evaluated.

Soil samples (n = 20) were collected in duplicate (four samples from Edgardia Farm, three from Cerrito Island, and thirteen from Alta Floresta and

Paranaíta) from the armadillo burrows (at 0 and 0.3m depth) and animal foraging sites located in forest (areas 1 and 2) and also pasture and horticultural fields (area 3). The samples were placed in 50 ml sterile universal bottles, sealed, identified and stored in an isothermal box at room temperature until their evaluation for fungal molecular detection. Additional soil samples were also collected for determination of their physical and chemical properties, which was carried out at the Soil Fertility Laboratory of the School of Agriculture FCA /UNESP, as well as for preparation of Soil Extract Agar to culture the fungal isolates.

Geographic coordinates of the collected sites (armadillos and soil samples, Table S2) were obtained using a Global Positioning System (GPS, Garmin GPS 12) and plotted in the Geographic Information Systems (GIS) by the software QGIS version 2.8.

Fungal isolation from the armadillos

The animals were anesthetized intramuscularly (Zoletyl® 50 - Virbac, 0.2mL/kg), euthanized by cardiac puncture and necropsied. The whole liver, spleen and mesenteric lymph nodes were collected aseptically, as well as feces from two animals. The organs were cleaned in 70% (v/v) alcohol and sterile saline solution (0.9% w/v). One piece of each organ was kept in absolute alcohol and used for molecular detection. The remaining organs were fragmented into small pieces (2-3mm) and seeded in Mycosel® Agar supplemented with gentamicin (50 µg/mL). Plates were incubated at 35 °C and evaluated for fungal growth for up to 60 days. Suspected colonies of

Paracoccidioides spp. were screened microscopically by staining with Lactophenol cotton blue and sub-cultured in glucose, peptone, yeast extract and agar (GPYA, 2% glucose, 1% peptone, 0.5% yeast extract and 1% agar) for further mycological and molecular studies.

Clinical human isolates were also included herein for molecular and/or mycological comparisons, including four recent isolates (PSM, PbD, 8652 and 3051) of *P. brasiliensis* obtained from patients assisted at the Dermatology Service of the University Hospital of Botucatu Medical School, São Paulo, Brazil (HC/UNESP), one PS3 isolate (BACR) from Colombia and three *P. lutzii* isolates originating from patients (Pb01 and Pb66, from Goiânia-GO, and PbEE, from Cuiabá-MT) in Brazil.

Molecular Studies

DNA extraction

For *Paracoccidioides* spp. isolates, the DNA was extracted from yeast cells, according to the protocol described by McCullough et al. (MCCULLOUGH et al., 2000) with minor modifications (using yeast cells cultured for 7 days on GPYA at 37°C, which were disrupted using the Precellys (Bertin Technologies, MD, USA) equipment). For armadillo tissue samples (spleen, liver and mesenteric lymph nodes), animal feces and soil samples, the DNA extraction was accomplished by using the commercial kits Macherey-Nagel (MN), QIAamp® DNA Stool (QIAGEN) and Power Soil (MO BIO Laboratories Inc.), respectively. All extracted DNA samples were quantified on the NanoVue (GE Healthcare) spectrophotometer and stored at -20°C until used.

Detection in soil, animal tissue and feces samples

The molecular detection was carried out by a Nested PCR targeting rDNA with primers (ITS1/ITS4 or ITS4/ITS5) in the first PCR reaction, followed by a second amplification with the inner primers (PbITS-E/PbITS-T) (Table 1), supposed to be specific for *P. brasiliensis* and *P. lutzii* (ARANTES et al., 2013; THEODORO et al., 2005). All the PCR products were detected by 1.5% agarose gel electrophoresis stained with SYBR Safe (Invitrogen). The soil environmental amplicons were also purified and sequenced as described below.

Molecular characterization and phylogenetic analysis of the isolates and environmental amplicons

The isolates were characterized by sequencing ITS rDNA and *gp43* exon 2 loci. Other DNA regions, such as *arf* (adenylyl ribosylation factor) gene were sequenced and analyzed for some isolates. In addition, the PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) of *tub1* gene was also carried out to enable differentiation among *Paracoccidioides* spp. without DNA sequencing (ROBERTO et al., 2016) (details below). All the primers and annealing temperatures employed are listed in Table S3. PCR reactions were performed using a Veriti Thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, USA) and GoTaq®Green Master Mix (Promega, Madison, USA), with 25 µl of reaction mixture-containing 3 µl of genomic DNA (300 ng/µl) and 0.5 µM of each primer.

For DNA sequencing, the amplicons were purified using ExoProStar (GE Healthcare) and sequenced in the ABI 3500 DNA Analyzer (Applied Biosystem,

Foster City, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. The quality of sequences was verified by the software Sequencing Analysis (Applied Biosystems) and only nucleotides with Phred ≥ 20 were included. Sequencing edition and phylogenetic analysis were accomplished using the software MEGA v6.0 (TAMURA et al., 2013). Molecular identification was performed by the Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn)(NCBI, 2015) from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and International Society for Human Animal Mycology (ISHAM) ITS Databases (IRINYI et al., 2015). Alignments of the sequences were accomplished through Clustal W algorithm. Three different phylogenetic constructions were made via the Maximum Likelihood (ML) method (STOCKER HJ, 1998) by applying Tamura-Nei model (TAMURA, 1992) for ITS1-5.8S-ITS2 and soil environmental amplicons; Kimura 2-parameter model (KIMURA M, 1980) for the *gp43* exon 2 gene, all with bootstrap of 1000 replicates (TAMURA, 1992).

The PCR-RFLP analysis was performed as described by Roberto et al., 2015 (ROBERTO et al., 2016) , but with the addition of new primers herein designed (Table S3) in order to better amplify the *tub1* gene of both *Paracoccidioides* species. PCR products were visualized on agarose gel (1%) and then subjected to restriction enzyme digestion: 13 μ L ultrapure water, 3 μ L *tub1*-PCR, 2 μ L 10 \times of digestion buffer and 1 μ L of each endonuclease *Bcl*I (10 U/ μ L) and *Msp*I (10 U/ μ L), both from Thermo Scientific (Massachusetts, USA). The digestion was incubated at 37 °C for two hours and the digested products were visualized on 2.5% agarose gel with electrophoresis at 100 V for 120 min (ROBERTO et al., 2016). DNA samples from genotypes previously

characterized (THEODORO et al., 2012), namely Bt84, EPM83, EPM77, Pb18, T16B1, T10B1 and PbDog, were also included in this analysis.

The DNA sequences from fungal isolates and soil environmental amplicons herein obtained were deposited in the GenBank with accession numbers in parentheses: for ITS sequences of the isolates (KX774393-KX774411), *gp43* exon 2 (KY963798-KY963822), *arf* (KY963821-KY963822), and ITS sequences from environmental amplicons (MF078064-MF078073).

Mycological studies

Fungal growth, transition from yeast to mycelia, conidia production and viability in Soil Extract Agar (SEA)

Soil extracts (SE) were prepared with soil samples collected at Area 1 (Edgardia Farm, Southeast region of Brazil) and Area 3 (Alta Floresta, Central region of Brazil) and performed according to the description of Terçarioli et al. (TERÇARIOLI et al., 2007).

Three isolates of *P. brasiliensis* (T17LM1, T18LM1, 3051) and three of *P. lutzii* (Pb66, PbEE, Pb01) were evaluated by seeding four yeast fragments in Petri dishes containing SEA, in triplicate, and incubating at 25°C. The isolates were simultaneously evaluated in SEA prepared with SE extracts originating from the two distinct regions. At the 9th day, the isolates were evaluated in relation to the conversion from yeast (Y) to mycelia (M), and classified as: no conversion (0); little conversion, containing few visible mycelia (+); complete conversion with highly visible mycelia (++)

Production of conidia was evaluated by using adhesive tape preparations. Fungal mycelial colonies cultured on SEA at 25°C for 35 days

were killed by formaldehyde vapor (1-2 mL of 30% formaldehyde added to the bottom plate, for 3-5h) and employed to prepare the slides with adhesive tapes (Durex, 3M) stained with Lacto-phenol cotton blue. Conidia were counted in at least five fields, at 40x objective magnification, in the photomicrography system Olympus (PM 30), coupled with a Leica digital photomicrography (DMLB) camera and the software Leica Qwin Lite 2.5. Counting data were processed via the software GraphPad Prism version 5.01 (San Diego, California-USA).

The slide culture technique was also applied for isolates (*P. brasiliensis* and *P. lutzii*) in SEA(LARONE, 1939), with minor modifications, in order to better observe and document conidial production, evaluated on the 40th day and photographed as mentioned above.

After three months of incubation in SEA (25°C), mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis* and *P. lutzii* isolates were evaluated for the possibility of remaining alive. The mycelia of the isolates were scraped and deposited in test tubes containing saline and glass beads, and vortexed for 20s. After one minute at rest, 100 uL volumes of serial dilutions (10^{-1} and 10^{-2}) were seeded and spread in Petri dishes (duplicate) containing Mycosel Agar, and incubated at 25°C for up to 60 days. The appearance of typical *Paracoccidioides* spp. colonies in any dilution indicates positive viability of conidia and/or mycelial fragments.

Giant colonies on PDA and preservation/viability after one year

Yeast inoculums of each armadillo isolate (T17LM1, T18LM1, T19F7-2, T19F33, T20B13-1, T22LM1-1, T23LM1-1 and T23B1-1) were cultivated (triplicate) in a Petri dish containing Potato dextrose agar (PDA, Oxoid) at 25°C

for 30 days for evaluating the morphological characteristics (verse and reverse) and diameters of the mycelial colonies. The mycelial plate cultures of T18LM1, T19F7-2, T19F33, T20B13-1, T22LM1-1, T23LM1-1 isolates were also maintained for a period of one year under the same conditions (at 25°C) and then evaluated for their viability and capacity to convert to yeast form, by seeding the mycelial/conidial inoculums in GPYA tubes, and incubated at 35°C.

Statistical Analysis: the one-way ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison Test was used to compare conidial production within isolates of *P. brasiliensis* and *P. lutzii* species, in the two Soil Extract Agar conditions (soil from central and southeast regions of Brazil), and also to compare the mycelial growth diameters of giant colonies.

Results

Fungal isolation from armadillos

From January to November 2015, seven armadillos (six male and one female) were evaluated, both for fungal culture and molecular detection (Table 2). The fungi were positively cultured in six animals (85%) that had been collected on Edgardia Farm, area 1 (two animals), Cerrito Island, area 2 (two animals) in the southeast region, and Alta Floresta County, area 3 (two animals) in the central region of Brazil. The fungal growth was detected from the 11th until the 43rd day of organ culture at 35°C. The pathogen was cultured mainly in the fragments of the mesenteric lymph nodes (four animals), followed by spleen

(three animals) and liver (one animal) (Table 1). The majority of the isolates were obtained in different fragments of the same organs; however, in two animals the fungus was isolated simultaneously in two distinct organs, namely the liver/spleen in armadillo T19 (area 1) and spleen/mesenteric lymph nodes in T23 (area 3). Whenever possible, more than one isolate from each positive animal, preferably from distinct organs, were selected for additional studies.

Table 1: *Paracoccidioides* spp. isolation by direct culture and molecular detection by Nested/PCR in tissue samples (liver, spleen and mesenteric lymph nodes) of armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in two distinct endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil (Alta Floresta/MT and Botucatu/SP).

Armadillo	Sex	Weight (kg)	Geographic region (area)	Liver		Spleen		Mesenteric lymph nodes	
				*Fungal culture	Molecular Detection	*Fungal culture	Molecular Detection	*Fungal culture	Molecular Detection
T17	Male	4.7	Southeast, SP (Edgardia Farm)	0	-	0	-	4/147 (2.72)	+
T18	Male	3.9	Southeast, SP (Edgardia Farm)	0	-	0	-	6/59 (10.16)	-
T19	Male	6.0	Central/MT (Alta Floresta)	7/910 (0.76)	+	29/230 (12.60)	+	0	-
T20	Male	6.0	Central/MT (Alta Floresta)	0	+	2/270 (0.74)	+	0	+
T21	Male	5.0	Central/MT (Alta Floresta)	0	-	0	+	0	-
T22	Female	3.9	Southeast/SP (Cerrito Island)	0	+	0	-	8/68 (11.76)	-
T23	Male	4.3	Southeast/SP (Cerrito Island)	0	+	6/395 (1.51)	+	19/84 (22.61)	-

* Positive growth over the total number of fragments (%)

(-) Negative sample (+) Positive sample. MT, Mato Grosso State; SP, São Paulo State, Brazil.

Molecular characterization and phylogenetic analysis of the isolates

All armadillo isolates were molecularly identified as *P. brasiliensis sensu lato*, with no occurrence of *P. lutzii*, according to ITS rDNA sequencing (Table 2 and Figure 1). The analyses of *tub1* gene PCR-RFLP and of *gp43* Exon-2 DNA sequencing enabled a better characterization of the isolates and determination of their genotypes or cryptic species. Among the armadillo isolates was observed the presence of S1a (three occurrences) and S1b genotypes (12 occurrences) of *P. brasiliensis* species and one occurrence of PS2 genotype (*P. americana*). In the armadillos collected at Edgardia Farm (southeast region), more than one genotype were simultaneously detected in the same animal, namely the S1a and S1b genotypes of *P. brasiliensis* in armadillo #T17, and S1a (*P. brasiliensis*) and PS2 (*P. americana*) in armadillo #T18, specifically in the mesenteric lymph nodes. All armadillos collected on Cerrito Island (southeast region) and in Alta Floresta (central region) presented only the genotype S1b of *P. brasiliensis*. Four recent clinical isolates from patients of the Botucatu PCM endemic area (southeast region, where areas 1 and 2 are located) were also characterized herein as S1a genotypes of *P. brasiliensis* (Table 2 and Figure 2).

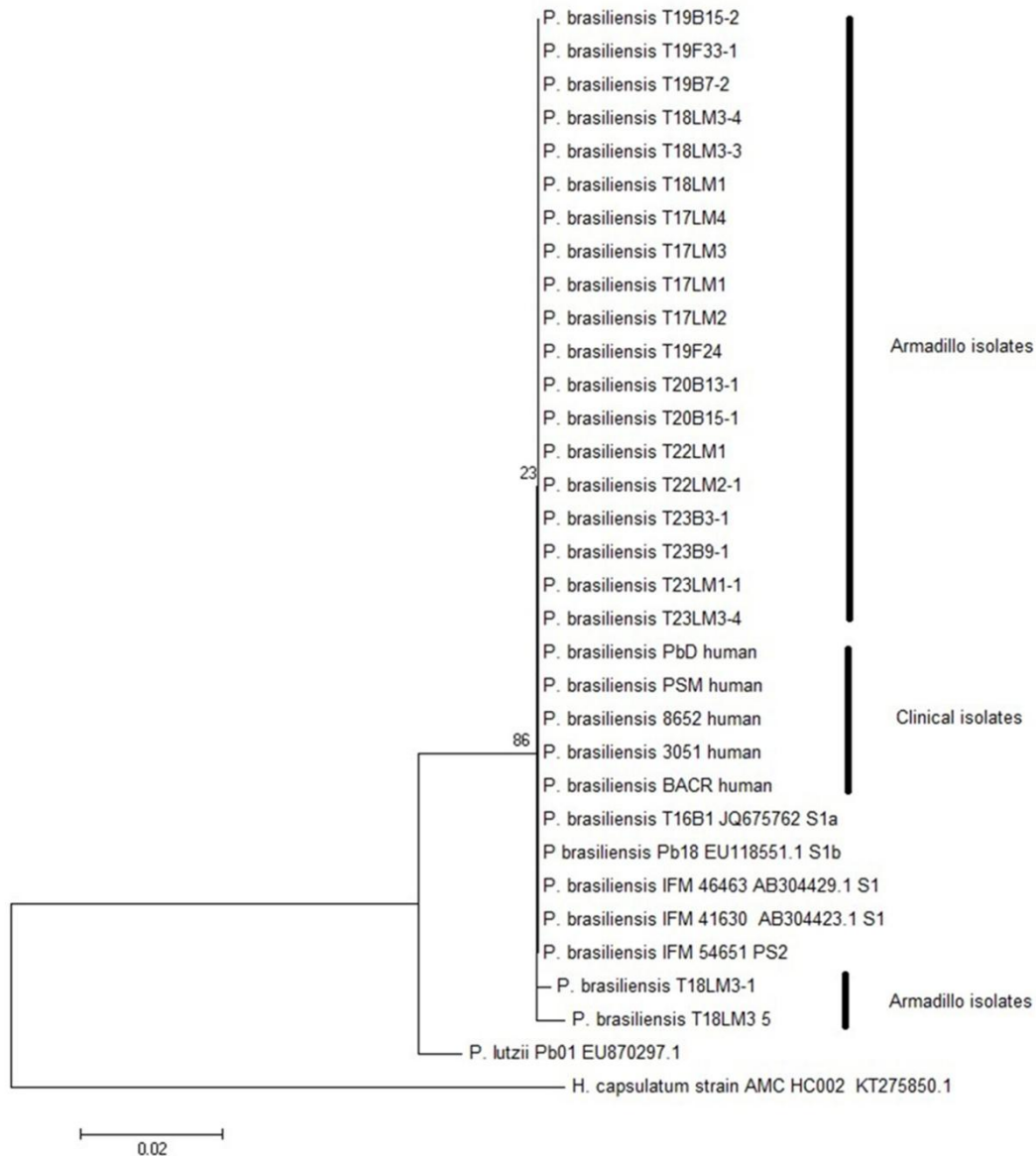


Figure 1. Phylogenetic analysis of ITS1/ITS2 rDNA sequences from multiple *P. brasiliensis* isolates from armadillos (marked with T17 to T23) and human clinical isolates obtained from Botucatu (PSM, PbD, 8652, 3051) and Colombia (BACR). Reference sequences from *P. brasiliensis* and *P. lutzii* were also included, and *H. capsulatum* was used as outgroup. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Tamura-Nei model. The tree with the highest log likelihood is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. A discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites.

The armadillo T18LM3-5 isolate (PS2 genotype) and the clinical Colombian BACR isolate (PS3) were also identified by sequencing the *arf* gene, confirming their identities with 100% similarity to referenced sequences deposited in the GenBank database.

The polymorphic sites of ITS rDNA and *gp43* Exon-2 DNA regions detected in *P. brasiliensis* (S1a and S1b), *P. americana* (PS2) and *P. restrepiensis* (PS3) species are shown in Table S4.

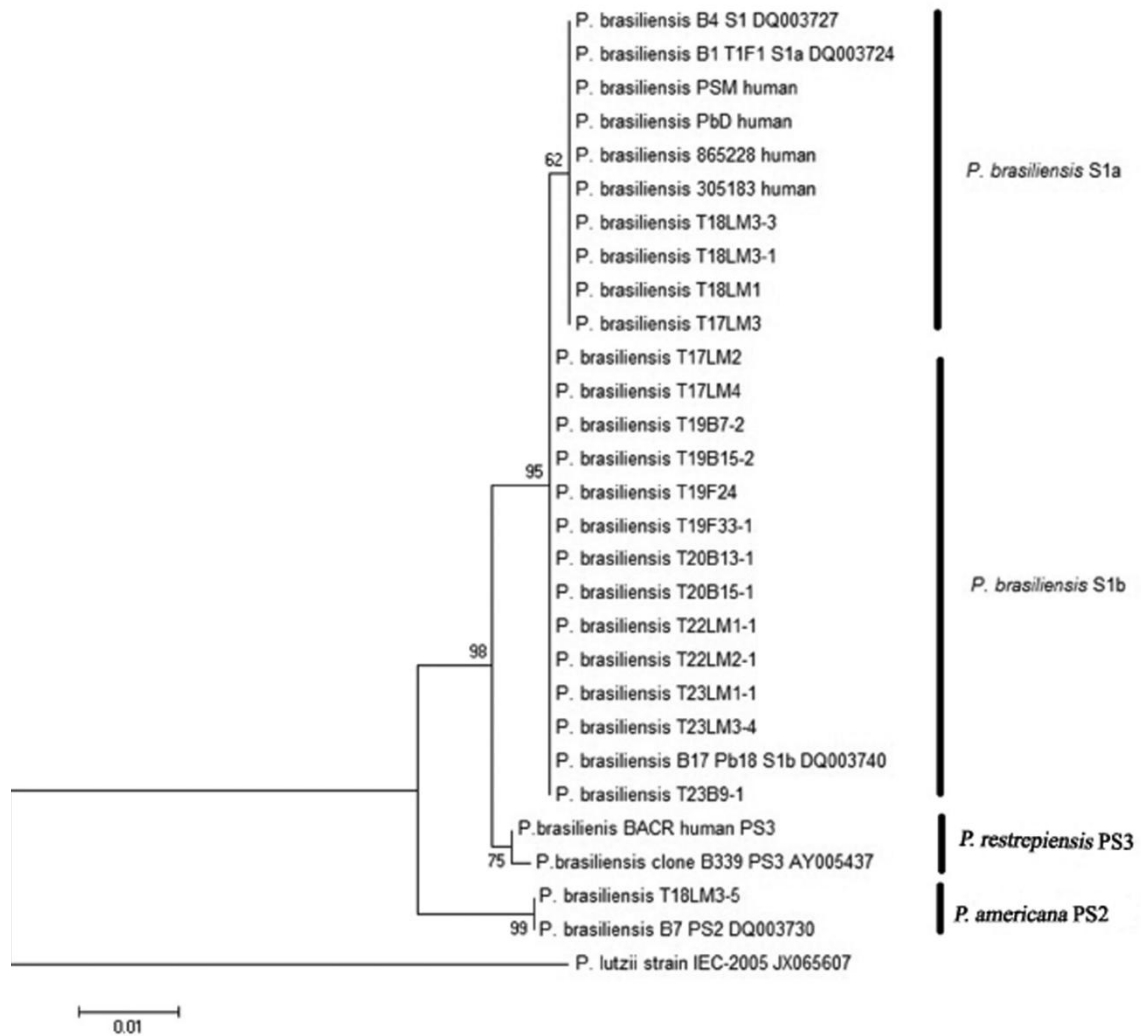


Figure 2. Phylogenetic analysis of gp43 Exon 2 sequences from multiple isolates of *Paracoccidioides* spp. obtained from armadillos (marked with T17 to T23), as well as from human clinical isolates obtained from Botucatu (PSM, PbD, 8652, 3051) and Colombia (BACR). Reference sequences from S1a, S1b, PS2, PS3 and *P. lutzii* were also included. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Kimura 2-parameter model. The tree with the highest log likelihood is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site.

Molecular detection in animal tissues, feces and soil samples

Molecular detection based on Nested-PCR indicated positivity in at least one evaluated organ for all animals, including the spleen of armadillo #T21 that was negative for fungal culture (Table 2). Using this same technique, we also detected *Paracoccidioides* spp in the feces of one armadillo, collected at Edgardia Farm.

The pathogens *P. brasiliensis sensu lato* and *P. lutzii* were detected in most soil samples from animals' burrows and foraging areas, collected mainly in forests of the southeast (areas 1 and 2) and central region of Brazil (area 3), where positive samples were also detected in pasture and in a horticultural field (Table S5 and Figure S2). Eleven environmental soil amplicons generated by the inner primers PbITS-E/PbITS-T (supposed to amplify DNA of all *Paracoccidioides* species) were sequenced and compared with deposited sequences from GenBank, showing 99% identity with *P. lutzii* (in eight out of

eleven amplicons) and 100% with *P. brasiliensis sensu lato* (in three out of eleven amplicons), indicating that both species groups occur in soils of both regions. The soil amplicons phylogenetically associated with *P. lutzii* have a greater genetic variability compared to the amplicons associated with *P. brasiliensis* clade (Figure 3).

Table 2: Species and genotypes of *Paracoccidioides spp.* isolates obtained from armadillos (≠T17 to ≠T23) collected in three distinct geographic areas, as well as human patients from Botucatu PCM endemic area and reference strains.

Isolate	Host	Geographic Origin*	Molecular Approach			Reference
			ITS1/ITS2 rDNA sequencing	PCR/RFLP <i>tub1</i>	<i>gp43</i> EXON-2 sequencing	
T17LM1	Armadillo	Edgardia Farm	<i>P. brasiliensis</i>	ND	ND	This study
T17LM2	Armadillo	Edgardia Farm	<i>P. brasiliensis</i>	S1	S1b	This study
T17LM3	Armadillo	Edgardia Farm	<i>P. brasiliensis</i>	S1	S1a	This study
T17LM4	Armadillo	Edgardia Farm	<i>P. brasiliensis</i>	S1	S1b	This study
T18LM1	Armadillo	Edgardia Farm	<i>P. brasiliensis</i>	S1	S1a	This study
T18LM2	Armadillo	Edgardia Farm	<i>P. brasiliensis</i>	S1	ND	This study
T18LM3-1	Armadillo	Edgardia Farm	<i>P. brasiliensis</i>	S1	S1a	This study
T18LM3-3	Armadillo	Edgardia Farm	<i>P. brasiliensis</i>	S1	ND	This study
T18LM3-4	Armadillo	Edgardia Farm	<i>P. brasiliensis</i>	ND	ND	This study
T18LM3-5	Armadillo	Edgardia Farm	<i>P. brasiliensis</i>	PS2	PS2	This study
T19B7-2	Armadillo	Alta Floresta	<i>P. brasiliensis</i>	S1	S1b	This study
T19F24-1	Armadillo	Alta Floresta	<i>P. brasiliensis</i>	S1	ND	This study

T19F33-1	Armadillo	Alta Floresta	<i>P. brasiliensis</i>	S1	S1b	This study
T19B15-2	Armadillo	Alta Floresta	<i>P. brasiliensis</i>	S1	S1b	This study
T20B13-1	Armadillo	Alta Floresta	<i>P. brasiliensis</i>	ND	S1b	This study
T20B15-1	Armadillo	Alta Floresta	<i>P. brasiliensis</i>	ND	S1b	This study
T22LM1-1	Armadillo	Cerrito Island	<i>P. brasiliensis</i>	S1	S1b	This study
T22LM2-1	Armadillo	Cerrito Island	<i>P. brasiliensis</i>	ND	S1b	This study
T23LM1-1	Armadillo	Cerrito Island	<i>P. brasiliensis</i>	ND	S1b	This study
T23LM2-1	Armadillo	Cerrito Island	<i>P. brasiliensis</i>	S1	ND	This study
T23LM3-4	Armadillo	Cerrito Island	<i>P. brasiliensis</i>	ND	S1b	This study
T23B3-1	Armadillo	Cerrito Island	<i>P. brasiliensis</i>	S1	ND	This study
T23B9-1	Armadillo	Cerrito Island	<i>P. brasiliensis</i>	ND	S1b	This study
PbD	Human	Botucatu, SP	<i>P. brasiliensis</i>	ND	S1a	This study
PSM	Human	Botucatu, SP	<i>P. brasiliensis</i>	S1	S1a	This study
8652	Human	Botucatu, SP	<i>P. brasiliensis</i>	S1	S1a	This study
3051	Human	Botucatu, SP	<i>P. brasiliensis</i>	S1	S1a	This study
Pb18	Human	São Paulo, SP	<i>P. brasiliensis</i>	S1	S1b	Matute et al., 2006
T16B1	Armadillo	Botucatu, SP	<i>P. brasiliensis</i>	S1	S1a	Aranteset al., 2013
BACR	Human	Colombia	<i>P. brasiliensis</i>	PS3	PS3	Almeida et al., 2015
BT84	Human	Botucatu, SP	<i>P. brasiliensis</i>	PS2	ND	Theodoro et al., 2012
EPM83	Human	Colombia	<i>P. brasiliensis</i>	PS3	ND	Theodoro et al., 2012
EPM77	Human	Colombia	<i>P. brasiliensis</i>	PS3	ND	Theodoro et al., 2012
T10B1	Armadillo	Botucatu, SP	<i>P. brasiliensis</i>	PS2	ND	Matute et al., 2006
PbDog	Dog	Curitiba, PR	<i>P. brasiliensis</i>	PS2	ND	Theodoro et al., 2012
PbEE	Human	Cuiabá, MT	<i>P. lutzii</i>	ND	ND	Theodoro et al., 2012
Pb66	Human	Goiânia, GO	<i>P. lutzii</i>	ND	ND	Theodoro et al., 2012

* Edgardia Farm (Area 1, Botucatu, SP, Southeast Region); Cerrito Island (Area 2, São Manuel, SP, Southeast Region); Alta Floresta (Area 3, Alta Floresta, MT, Central Region).
 MT (Mato Grosso), SP (São Paulo), PR (Paraná) and GO (Goiás) are States of Brazil.
 ND: Not done.

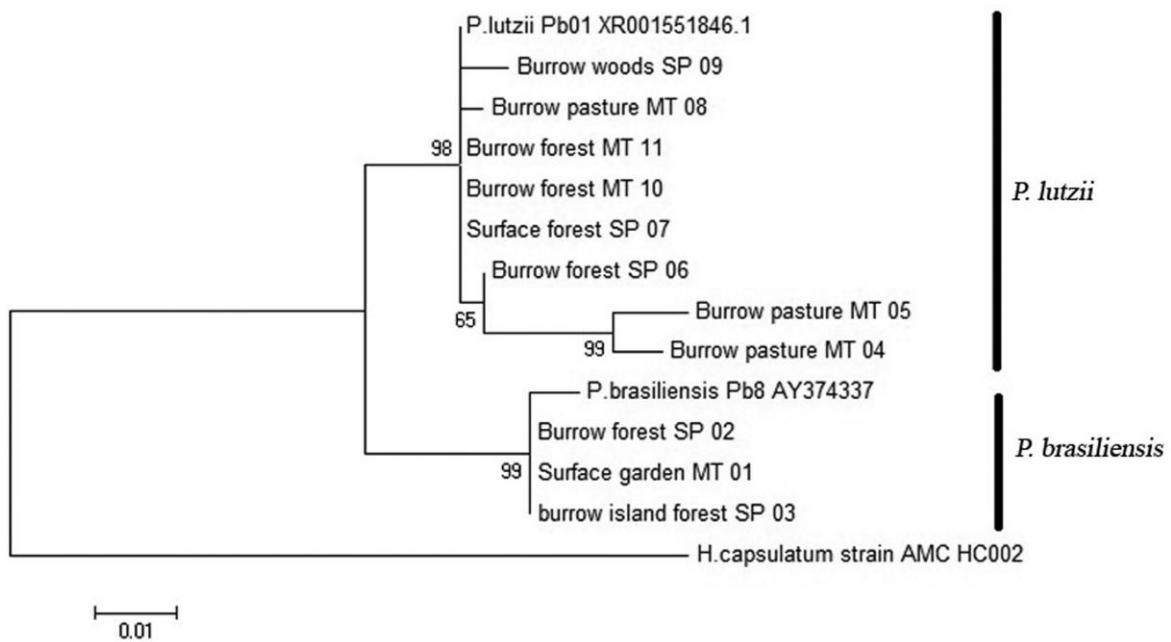


Figure 3. Phylogenetic analysis of ITS1/ITS2 rDNA partial sequences, obtained by amplification with the inner primers PbITSE/PbITST (Arantes et al.,2012) in soil samples collected in Central/MT and Southeast/SP regions of Brazil, and grouping pattern in relation to *P. brasiliensis* (accession number AY374337) and *P. lutzii* (accession number XR001551846) species. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Tamura 3-parameter model. The tree with the highest log likelihood is shown. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site positions in the final dataset.

***P. brasiliensis* and *P. lutzii* conversion to mycelial and conidial production in SEA**

Three isolates of *P. brasiliensis* and three of *P. lutzii* were evaluated in relation to mycelial conversion and conidial production in soil extract agar (SEA), using SEA prepared with soil samples from the southeast (SP) and central (MT) regions of Brazil.

All isolates of *P. brasiliensis* from both regions converted well, beginning their transition on the 4th day in SEA, while in *P. lutzii* species, the conversion started only at the 9th day in two of three isolates in SEA prepared with soil from the southeast region – in SEA from the central region the mycelial conversion was less effective, since it occurred in just one isolate of *P. lutzii* (Table 3). Conidial production appeared to be higher in *P. brasiliensis* than in *P. lutzii* isolates, whereas SEA from the southeast region seems to be more favorable both for mycelial growth and conidial production (Figure 4).

Table 3: Conversion from yeast (Y) to mycelium (M) of *P. brasiliensis* and *P. lutzii* isolates, at 9th day of growing in Soil Extract Agar (SEA), prepared with soil samples collected in Central and Southeast Regions, Brazil.

Isolate	Species	Soil Extract Agar	
		Central Region	Southeast Region
Pb01	<i>P. lutzii</i>	0	0
Pb66	<i>P. lutzii</i>	0	+
PbEE	<i>P. lutzii</i>	+	++
T17LM1	<i>P. brasiliensis</i>	+	++
T18LM1	<i>P. brasiliensis</i>	++	++
3051	<i>P. brasiliensis</i>	++	++

No Y to M conversion (0); moderate conversion (+); plenty conversion (++)

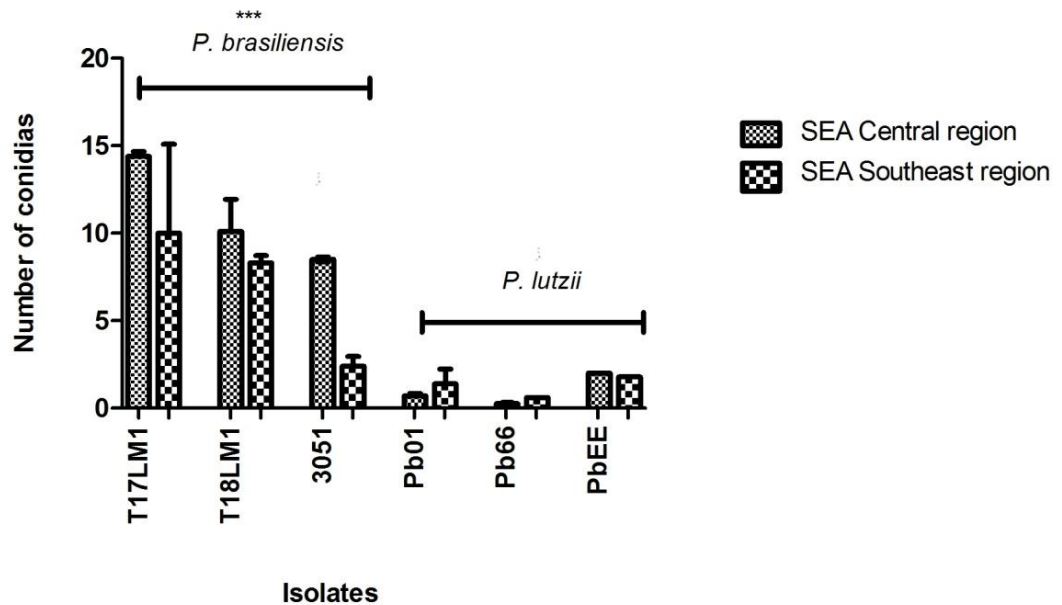


Figure 4. Conidia production of *P. brasiliensis* and *P. lutzii* isolates seeded in soil extract Agar (SEA), prepared with soil samples from Central (MT) and the Southeast (SP) regions of Brazil (25°C). Counting carried out at 35th day in the 40x magnification.

Giant colonies on PDA and preservation/viability after one year

All *P. brasiliensis* isolates obtained from armadillos presented typical mycelial colonies, such as white cotton and crater-like aspects on the verse, and the presence of brown pigments with some cracks and/or folds on the reverse. The growths were relatively slow, since the colony diameters at the 30th day were less than 2.0 cm in all isolates, except T17LM1 (originating from Botucatu, SP) that differs statistically from T19B7-2 and T20B13-1 (both originated from Alta Floresta, MT), as shown in Table 4.

Six isolates growing on sealed plates containing PDA at 25°C were maintained for one year under this condition, when they produced a sparse radial growth. Mycelial fragments, containing conidia (observed microscopically, not shown here), were then collected and seeded on GPYA at 35°C, which subsequently produced typical yeast colonies in three out of the six isolates evaluated (Table 5). Yeast cells in cotton blue preparation present evidence of excellent vigorous growth, such as yeasts with intense multi-budding daughter cells, well-defined walls and homogenous blue-colored cytoplasm.

Table 4: Colony morphology of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates from armadillos, evaluated at 30th day on Potato Dextrose Agar (PDA) at 25°C, and fungal viability after one year by direct culture and conversion to yeast form in GPYA at 35°C.

Isolate	Geographical origin	Colony Features			One year mycelia/conidia viability
		Diameter (cm)	Verse	Reverse	
T17LM1	Botucatu, SP	2.20 ± 0.08*	White cotton-like surface, well-defined crater in the center	Beige with folds	Not-evaluated
T18LM1	Botucatu, SP	1.73 ± 0.09	White cotton-like surface; well-defined protrusion in the center	Without cracks and folds; Brown pigment.	Not-evaluated
T19B7-2	Alta Floresta, MT	1.33 ± 0.04	White cotton-like surface	Without cracks and folded; dark brown	Positive
T19F33	Alta Floresta, MT	1.53 ± 0.20	White cotton-like surface; with depression in the center	Without cracks and folded; brownish	Positive
T20B13-1	Alta Floresta, MT	1.16 ± 0.28	White cotton-like surface; point of depression in the center	Without cracks and folds; brownish with white borders.	Positive
T22LM1-1	São Manuel, SP	1.6 ± 0.10	White cotton-like surface; with ripples. A "ring" surrounding the center in a yellowish tone	Without cracks and folds; brownish in the center with white borders	Negative
T23LM1-1	São Manuel, SP	1.6 ± 0.16	White cotton-like surface; with ripples	Without cracks and folded; dark brown in the center and beige in the borders	Not-evaluated
T23B1-1	São Manuel, SP	1.5 ± 0.28	White to yellowish cotton-like surface; with crater in the center.	Few cracks, without folds; dark brown in the center and beige in the borders	Not-evaluated

* T17LM1 differs statistically from T19B7-2 and T20B13-1, by one way ANOVA and Tukey's Test.

Discussion

This work took advantage of using armadillos as a natural animal model for studying biological aspects of PCM agents. Despite intense advances in the knowledge of fungal genomics and phylogeny, and the emergence of new important endemic areas of PCM, mostly in the central and northern regions of Brazil (VIEIRA et al., 2014), the ecology of *Paracoccidioides* species remains poorly comprehended. Herein we confirm the high frequency of *P. brasiliensis* infection in armadillos in three distinct areas, two located in the southeast and one in the central region of Brazil. The mesenteric lymph nodes were the organ with the highest positivity of isolation, followed by the spleen and liver. The recovery of *P. brasiliensis* in armadillos from the southeast region occurred exclusively in the mesenteric lymph nodes, whereas in those from the country's central region, the fungus was distributed among the three organs (spleen, liver and mesenteric lymph nodes).

It was possible to detect the presence of the pathogen, and at the same time define its genotypes, in the three well-defined geographic areas, which is particularly welcome for further ecological and epidemiological studies. All armadillo isolates, as well as some recent human clinical isolates from the Botucatu endemic area (São Paulo state), were genotyped in order to define species, according to the latest phylogenetical and taxonomical proposal for *Paracoccidioides* genus (MUÑOZ; FARRER; DESJARDINS, 2016; TURISSINI et al., 2017)

Despite persistent efforts, we have not succeeded in obtaining human clinical isolates from the Alta Floresta (MT) region, which was recently

characterized as an important endemic area for PCM(CARVALHOSA et al., 2016; VOLPATO et al., 2016). According to Volpato et al., 2016(VOLPATO et al., 2016), who evaluated oral manifestation in patients from Mato Grosso state, PCM occurs in 37% of counties in a heterogeneous manner, with most cases occurring in the north of the state, where Alta Floresta County ranks first in the number of cases.

Although *P. lutzii* is supposed to be prevalent in this endemic area(TEIXEIRA et al., 2009) and it has been isolated from patients of this region(HAHN et al., 2014), the two positive armadillos from Alta Floresta harbored only *P. brasiliensis* and no *P. lutzii* species. In fact, *P. lutzii* has never been isolated from armadillos(ARANTES et al., 2016). Curiously, we observe herein that all armadillos collected in Alta Floresta (central region) and on Cerrito Island (southeast region) presented the same S1b genotype, which was the most frequent genotype among armadillo isolates (12 occurrences).

The S1a genotype was the second most frequent in armadillos (three occurrences) and also the genotype found in the four recent human isolates from the Botucatu endemic area. The PS2 genotype (*P. americana* species) presented only one occurrence in the armadillos, confirming previous findings that this species is relatively rare both in human and armadillos, when comparing with *P. brasiliensis* (S1a and S1b genotypes)(THEODORO et al., 2012).

In the armadillos collected at Edgardia Farm (Southeast region), it was possible to determine the occurrence of multiple infection by distinct genotypes in the two evaluated animals - S1a and S1b genotypes of *P. brasiliensis* species in the armadillo #T17 and S1a and PS2 genotypes (*P. brasiliensis* and *P.*

americana) in armadillo #T18 - confirming what had already been observed by Sano et al.(SANO et al., 1998). It is also important to mention that the PS2 genotype (*P. americana*), which is phylogenetically highly distinct from other *P. brasiliensis* cryptic species(MATUTE et al., 2006; MUÑOZ; FARRER; DESJARDINS, 2016) was herein isolated in the armadillo #T18, which was collected in the same exact area (Edgardia Farm) where this genotype had already been isolated in a previous animal (#T10), evaluated 15 years ago(BAGAGLI et al., 2003; MATUTE et al., 2006).

The occurrence of three distinct fungal groups of *Paracoccidioides* (S1a, S1b and PS2) on Edgardia Farm might be associated with the local environmental conditions that comprise the simultaneous presence of diversified natural vegetation, such as semi-deciduous and savanna forest, as well as small rivers, channels, and flooded paddy-field agricultural areas(JORGE; SARTORI, 2002). The presence of these pathogens was also detected by molecular methods in tissues of all animals, in feces of one animal, and in soil samples collected in armadillos' burrows and foraging sites in the three environmental areas.

The sequencing of these environmental amplicons in an attempt to define the species suggested that *P. brasiliensis sensu lato* and *P. lutzii* species occur simultaneously in both the central and southeastern regions of Brazil, as reported previously(ARANTES et al., 2013)(ARANTES et al., 2016). The samples "Burrow Pasture MT05 and MT04" collected in Alta Floresta (MT) clustered in a different branch from the clinical isolate Pb01 (XR00155186) and the other *P. lutzii* amplicons. Arantes et al. (2016)(ARANTES et al., 2016) performed phylogenetic analysis on environmental sequences obtained from

soil and aerosols and observed that sequences of *P. lutzii* were grouped into two distinct clades, clade I of the Central-West (GO) and clade II of the Northern Regions (RO). These findings reinforce the genetic diversity of *Paracoccidioides* spp. in the environment and also suggest that cryptic species may exist within *P. lutzii*.

Paracoccidioides brasiliensis sensu lato was also detected by molecular methods in soil samples collected in a horticultural field of Alta Floresta (MT), whose owner presents PCM and was under treatment when the samples were collected. Horticultural fields present abundant organic matter, high humidity, since they are regularly irrigated, and the addition of fertilizers, which might comprise favorable environmental conditions for development of the fungus in its mycelial phase, as already suggested (BARROZO et al., 2010; RESTREPO; MCEWEN; CASTAÑEDA, 2001; SALAZAR; RESTREPO, 1985; TERÇARIOLI et al., 2007; THEODORO et al., 2005). In addition, the nine-banded armadillo frequently visits these areas in search of food, such as earthworms. Horticultural workers presenting intense daily activities in such endemic areas should be monitored for PCM infection.

The reason why *P. lutzii* has not been already isolated from armadillos is an open question. It has been argued that *P. lutzii* is less virulent or produces fewer infective conidia than *P. brasiliensis* or might occupy a distinct ecological niche, since they diverged from each other around 22.5 million years ago (MUÑOZ; FARRER; DESJARDINS, 2016; THEODORO et al., 2012). In addition, *P. lutzii* may have developed different evolutionary strategies and may have hosts other than armadillos.

The mycological findings herein observed seem to support the existence of ecological or other biological differences between *P. brasiliensis* and *P. lutzii* species, although additional experimental data must be obtained for confirmation. For instance, when these species were cultured on Soil Extract Agar (SEA), *P. brasiliensis* generally presents a faster conversion from yeast to mycelium, as well as larger mycelial colonies and more conidial production than *P. lutzii*.

It is worth noting that *P. brasiliensis* and *P. lutzii* differed in their ability to survive *in vitro* over a long period (5 months, 3 in SEA and 2 in Mycosel agar) under stress conditions (water deficit). This suggests that *P. brasiliensis* may be more tolerant of adverse conditions in the environment, thereby augmenting its chance of causing infection in their hosts in comparison with *P. lutzii*.

Lastly, another curious mycological observation was the ability of *P. brasiliensis* to maintain its viability when growing as a mycelial form in PDA at 25°C for one year and, most importantly, with the capacity for easily converting to yeast form when seeded directly in a relatively richer medium such as GPYA and cultured at 35°C. The yeast cells herein obtained, since the first-round growth, present evidence of good viability and vigor, presenting typical well-rounded mother cells with a large number of buddings. These findings indicate that the fungus might survive for a longer period in soil in a state of discrete mycelial form and easily convert to yeast when exposed to a richer substrate and higher temperature (35°C) or when introduced into a mammalian host.

Acknowledgements

We thank the owners of Cerrito Island – Edson Gruppi, Edson Luiz Gruppi and Silvio José Gruppi – for allowing our studies in this private area. We also thank the Foundation for Research Support of the State of Mato Grosso (FAPEMAT) for granting a scholarship and IBAMA for the environmental license, as well as the forestry engineer Gabriel Moraes Gasparoto for the services rendered in Geoprocessing and map elaboration.

Declaration of interest

The authors report that there are no conflicts of interest.

References

- ABBA, A. M.; SUPERINA, M. **Nine-banded armadillo**. Disponível em: <<http://xenarthrans.org/species/details/category/1/specie/28/Ninebanded+armadillo>>.
- ALBORNOZ, M. DE. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, v. 9, n. 3, p. 248–253, 1971.
- ALBORNOZ MCB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, v. 9, p. 248–253, 1971.
- ARANTES, T. D. et al. Detection of *Paracoccidioides* spp. in environmental aerosol samples. **Medical Mycology**, v. 51, n. 1, p. 83–92, jan. 2013.
- ARANTES, T. D. et al. Environmental Mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil Reveals New Clues into Genetic Diversity, Biogeography and Wild Host Association. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. 1–18, 2016.
- ARAUJO, F. G. DE. Primeiro isolamento de *Histoplasma capsulatum* de solo em Minas Gerais. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo.**, v. 12, n. 3, p. 185–191, 1970.
- BAGAGLI, E. et al. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 41, n. 3, p. 217–223, 2003.
- BAGAGLI, E. et al. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 6, n. 5, p. 344–51, set. 2006.
- BAGAGLI, E.; SANO, A. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, n. 4, p. 505–512,

1998.

BARROZO, L. V. et al. First description of a cluster of acute/subacute paracoccidioidomycosis cases and its association with a climatic anomaly.

PLoS neglected tropical diseases, v. 4, n. 3, p. e643, jan. 2010.

BARROZO, L. V et al. Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil. **International journal of epidemiology**, v. 38, n. 6, p. 1642–1649, dez. 2009.

BELITARDO, D. R. et al. Detection of Antibodies Against Paracoccidioides brasiliensis in Free-Range Domestic Pigs (Sus scrofa). **Mycopathologia**, v. 177, n. 1–2, p. 91–95, 2014.

CARDOSO, E. J. B. . **Microbiologia do Solo**. Campinas: Sociedade Brasileira da Ciência do Solo, 1992.

CARVALHOSA, A. A. DE et al. Paracoccidioidomycosis prevalence in a public laboratory of the Brazilian unified health system. **J. Oral Diag.**, v. 1, n. 1, p. 31–35, 2016.

CASADEVALL, A.; ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in Cryptococcus neoformans. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 354–358, 2000.

COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. **Medical Mycology**, v. 49, n. 8, p. 785–798, 2011.

CORREDOR, G. G. et al. Isolation of Paracoccidioides brasiliensis from the nine-banded armadillo Dasypus novemcinctus, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. **Revista iberoamericana de micologia : organo de la Asociacion Espanola de Especialistas en Micologia**, v. 16, n. 4, p. 216–220, 1999.

CORREDOR, G. G. et al. The naked-tailed armadillo Cabassous centralis (Miller 1899): a new host to Paracoccidioides brasiliensis . Molecular identification of the isolate. **Medical Mycology**, v. 43, n. 3, p. 275–280, 2005.

COUTINHO, Z. F. et al. Hospital morbidity due to paracoccidioidomycosis in Brazil (1998-2006). **Tropical Medicine and International Health**, v. 20, n. 5, p. 673–680, 2015.

COUTINHO ZF, SILVA D, LAZÉRA M, ET AL. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Caderno Saúde Pública**, v. 18, n. 5, p. 1441–1454, 2002.

DE FARIAS, M. R. et al. Paracoccidioidomycosis in a Dog: Case Report of Generalized Lymphadenomegaly. **Mycopathologia**, v. 172, n. 2, p. 147–152, 2011.

DE OLIVEIRA, H. C. et al. Importance of adhesins in virulence of Paracoccidioides spp. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAR, p. 1–14, 2015.

FERREIRA, J. B. et al. Evaluation of Paracoccidioides brasiliensis Infection in Dairy Goats. **Mycopathologia**, v. 176, n. 1–2, p. 95–99, 2013.

FERREIRA, M. S. et al. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dogfood probably contaminated with soil in Uberlândia, Brazil. **Medical Mycology**, v. 28, n. 3, p. 253–256, jan. 1990.

FLORIANO, A. Estudos comparativos do granuloma coccidioidico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasito brasileiro. **An. Fac. Med. S. Paulo**, v. 5, p. 125–142, 1930.

FRANCO, M. et al. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.

20, n. 2, p. 129–32, 1987.

FRANCO, M. et al. Review article A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. **Medical Mycology**, v. 38, n. February, p. 185–191, 2000.

GEZUELE, E. **Aislamento de Paracoccidioides sp. de heces de pinguino de la Antártida.** In. **International Meeting on Paracoccidioidomycosis, AnaisCaracas**, 1989.

HAHN, R. C. et al. Fatal Fungemia due to *Paracoccidioides lutzii*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 91, n. 2, p. 394–8, 6 ago. 2014.

HANNA, S. A.; MONTEIRO, J. L.; GIANNINI, M. J. S. M. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 877–884, 2000.

HEADLEY, S. A. et al. *Paracoccidioides brasiliensis*-associated dermatitis and lymphadenitis in a dog. **Mycopathologia**, v. 182, n. 3, p. 425–434, 2017.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.**, 2016. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>

ICMBIO. **Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade**, 2017. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br>>

INPE **Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais.** , 2016. Disponível em: <<http://www.inpe.br/>>

IRINYI, L. et al. International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database--the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. **Medical Mycology**, v. 53, n. 4, p. 313–337, 2015.

JORGE, L. A. B.; SARTORI, M. S. Uso do Solo e Análise Temporal da Ocorrência de Vegetação Natural na Fazenda Experimental Edgardia, em Botucatu-SP. **Revista Árvore**, v. 26, n. 3, p. 585–592, 2002.

KIMURA M. **A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences.**Journal of Molecular Evolution, , 1980.

LACAZ, C. DA S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico.** [s.l: s.n.]. v. 33

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de Micologia médica.** 9. ed. [s.l: s.n.].

LARONE, D. H. **Davise H.** 5. ed. Washington, DC: Medically important fungi: A guide to identification, 1939.

LOUGHRY, W. J.; MCDONOUGH, C. M. Spatial Patterns in a Population of Nine-banded Armadillos (*Dasyus novemcinctus*). **Am Midl Nat**, v. 140, n. 1, p. 161–169, 1998.

LUTZ, A. Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. **O Brazil-Medico, Revista Semanal de Medicina e Cirurgia**, n. 22, p. 121–141, 1908.

MARCOS, C. M. et al. Decreased expression of 14-3-3 in *Paracoccidioides brasiliensis* confirms its involvement in fungal pathogenesis. **Virulence**, v. 7, n. 2, p. 72–84, 2016.

MARQUES, A. F. et al. Peptide immunization as an adjuvant to chemotherapy in mice challenged intratracheally with virulent yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2814–

2819, 2006.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomicose. In: ZAITIS, C. et al. (Eds.). .

Compêndio de Micologia Médica. 2. ed. Rio de Janeiro: [s.n.]. p. 460.

MARTINEZ, R. Epidemiology of Paracoccidioidomycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 19, p. 11–20, 2015.

MARTINEZ, R. New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 1–13, 2017.

MATUTE, D. R. et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Molecular biology and evolution**, v. 23, n. 1, p. 65–73, jan. 2006.

MAYORGA, O. et al. The role of adjuvants in therapeutic protection against paracoccidioidomycosis after immunization with the P10 peptide. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. MAY, p. 1–6, 2012.

MCBEE, K.; BAKER, R. J. *Dasyus novemcinctus*. **Mammalian Species**, n. 162, p. 1–9, 1982.

MCCULLOUGH, M. et al. Molecular epidemiology of *Blastomyces dermatitidis*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, p. 328–335, 2000.

MCDONOUGH C M.; LOUGHRY W J. Behavioral ecology of armadillos. In: S. F. VIZCAÍNO & W. J. LOUGHRY (Ed.). . **The Biology of the Xenarthra**. Florida: University Press of Florida, 2008. p. 281–293.

MCNAB, B. K. Energetic and the limits to a temperature distribution in armadillos. **American Society of Mammalogists**, v. 61, n. 4, p. 606–627, 1980.

MONTENEGRO, M. R. et al. Isolation of fungi from nature in the region of Botucatu, State of São Paulo, Brazil, an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 665–670, 1996.

MONTENEGRO, M. R. G. Formas Clínicas da Paracoccidioidomicose. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 1986.

MUÑOZ, J. F.; FARRER, R. A.; DESJARDINS, C. A. ET AL. Genome Diversity, Recombination, and Virulence across the Major Lineages of *Paracoccidioides*. **mSphere**, v. 1, n. 5, p. 1–18, 2016.

NAIFF, R. D. et al. Paracoccidioidomicose enzoótica em tatus (*Dasyus novemcinctus*) no estado do Pará. **Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo**, v. 28, n. 1, p. 19–27, 1986.

NCBI. **Basic Local Alignment Search Tool**. Disponível em:

<<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast>>. Acesso em: 20 mar. 2015.

NEGRONI P. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente en suelo Argentino. **Pren Med Argent**, v. 53, p. 2381–2382, 1966.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cellular Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 203–223, 2003.

OLIVEIRA, G. G. et al. Serological Survey of Paracoccidioidomycosis in Sheep. **Mycopathologia**, v. 173, n. 1, p. 63–68, 2012.

ONO, M. A. et al. Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. **Medical Mycology**, v. 39, n. 3, p. 277–82, jun. 2001.

PAN AMERICAN SYMPOSIUM ON PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS.

Paracoccidioidomycosis; proceedings of the first Pan American symposium, 25-27 October 1971, Medellín, Colombia. Washington: Washington, Pan American Health Organization, 1972., 1971

PANIAGO, A. M. et al. Paracoccidioidomicose : estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no Estado de Mato Grosso do Sul
 Paracoccidioidomycosis : a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul. v. 36, n. 4, p. 455–459, 2003.

PAULA, A. et al. Seroepidemiology of Paracoccidioides brasiliensis infection in horses from Rio Grande do Sul , Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 517, p. 513–517, 2015.

PUCCIA, R. et al. Exocellular components of Paracoccidioides brasiliensis: Identification of a specific antigen. **Infection and Immunity**, v. 53, n. 1, p. 199–206, 1986.

RESTREPO, A. et al. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus Paracoccidioides brasiliensis: Implications for resistance of females to Paracoccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, v. 46, n. 2, p. 346–353, 1984.

RESTREPO, A. The ecology of Paracoccidioides brasiliensis: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia**, v. 23, n. 5, p. 323–334, 1985.

RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G.; CASTAÑEDA, E. The habitat of Paracoccidioides brasiliensis: how far from solving the riddle? **Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 39, n. 3, p. 233–241, 2001.

RICCI, G. et al. Canine paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**, v. 42, n. 4, p. 379–383, 2004.

RICHINI-PEREIRA, V. B. et al. provenientes de uma reserva de Cerrado do Instituto Lauro de Souza Lima (Bauru , SP) Paracoccidioides brasiliensis detection in armadillos (Dasypus novemcinctus) from a Savanna reserve at the Lauro de Souza Lima Institute (Bauru , SP). v. 5, n. 56, p. 4–8, 2008.

ROBERTO, T. N. et al. Identifying Paracoccidioides phylogenetic species by PCR-RFLP of the alpha-tubulin gene. **Medical Mycology**, v. 54, n. 3, p. 240–247, 2016.

SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A. Morphogenesis of the mycelium-to-yeast transformation in Paracoccidioides brasiliensis. **Sabouraudia**, v. 23, n. 1, p. 7–11, 1985.

SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus Paracoccidioides brasiliensis. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 3, p. 711–713, 1988.

SANO, A. et al. Pathogenicities and GP43kDa gene of three Paracoccidioides brasiliensis isolates originated from a nine-banded armadillo (Dasypus novemcinctus). **Mycopathologia**, v. 144, n. 2, p. 61–65, 1998.

SANTOS, S. S. et al. Targeting the P10 peptide to maturing dendritic cells via the Dec-205 receptor: P682in vivo:: P682a new vaccine strategy against Paracoccidioidomycosis: P682. **Mycoses**, v. 55, p. 309, 1 jun. 2012.

SES. **Secretaria de Estado de Saude**Cuiabá, 2016. Disponível em: <www.saude.mt.gov.br/legislacao>

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Guidelines in paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297–310, 2006.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. Paracoccidioidomycosis Treatment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 57 Suppl 1, n. 1, p. 31–37, 2015.

SHOME SK; BATISTA AC. Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* in the soil of Recife, Brazil. **Revista da Faculdade de Medicina Federal Ceara**, v. 3, p. 90–94, 1963.

SILVA-VERGARA, M. L. et al. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. **Medical Mycology**, v. 36, n. October 1997, p. 37–42, 1998.

SILVA-VERGARA, M. L. et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Medical mycology**, v. 38, n. 3, p. 193–199, 2000.

SPLENDRE, A. Zymonematoses with localization in the mouth cavity observed in Brazil. **Bull Soc Path Exot**, v. 5, p. 313 – 319, 1912.

STOCKER HJ. **of Mathematics and Computational Science**. New York: Springer, 1998.

TABORDA, C. P. et al. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi. **Growth (Lakeland)**, v. 165, n. 4–5, p. 331–339, 2008.

TABORDA, C. P. et al. Paracoccidioidomycosis: Challenges in the Development of a Vaccine Against an Endemic Mycosis in the Americas. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57 Suppl 1, n. 1, p. 21–24, 2015.

TAKAYAMA, A. et al. An atypical *Paracoccidioides brasiliensis* clinical isolate based on multiple gene analysis. **Medical Mycology**, v. 48, n. 1, p. 64–72, 2010.

TAMURA, K. Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions When There Are Strong Transition-Transversion and G+C-Content Biases '. **Molecular biology and evolution**, v. 9, n. 4, p. 678–687, 1992.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.

TEIXEIRA, M. D. M. et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. **Medical mycology**, v. 52, n. 1, p. 19–28, jan. 2013a.

TEIXEIRA, M. DE M. et al. Molecular and morphological data support the existence of a sexual cycle in species of the genus *Paracoccidioides*. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 3, p. 380–389, 2013b.

TEIXEIRA, M. M. et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 52, n. 2, p. 273–83, ago. 2009.

TERÇARIOLI, G. R. et al. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. **BMC Microbiology**, v. 7, p. 92, jan. 2007.

THEODORO, R. C. et al. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. **Medical Mycology**, v. 43, n. 8, p. 725–729, jan. 2005.

THEODORO, R. C. et al. Genus *Paracoccidioides*: Species recognition and biogeographic aspects. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

TRAVASSOS, L. R. et al. Attempts at a peptide vaccine against paracoccidioidomycosis, adjuvant to chemotherapy. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4–5, p. 341–352, 2008.

TURISSINI, D. A. et al. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 106, n. June, p. 9–25, 2017.

UNTEREINER, W. A. et al. The Ajellomycetaceae , a new family of vertebrate-associated Onygenales. v. 96, n. 4, p. 812–821, 2004.

VIEIRA, G. D. D. et al. Case Report Article Paracoccidioidomycosis in a western Brazilian Amazon State : Clinical-epidemiologic profile and spatial distribution of the disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 1, p. 63–68, 2014.

VOLPATO, M. C. P. F. et al. Distribuição Espacial dos Casos de Paracoccidioidomicose com Manifestações Bucais no Estado de Mato Grosso. **Revista Odontológica do Brasil Central**, v. 25, n. 72, p. 84–87, 2016.

WANKE, B., AIDÊ, M. A. Curso de Atualização – Micoses. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 12, p. 1245–1249, 2009.

WANKE B.; LONDERO, A. **Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection**. CRC Press: Boca Raton, 1994.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, MA., GELFAND DH., SNINSKY JJ., WHITE, T. (Ed.). . **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1990. p. 315–322.

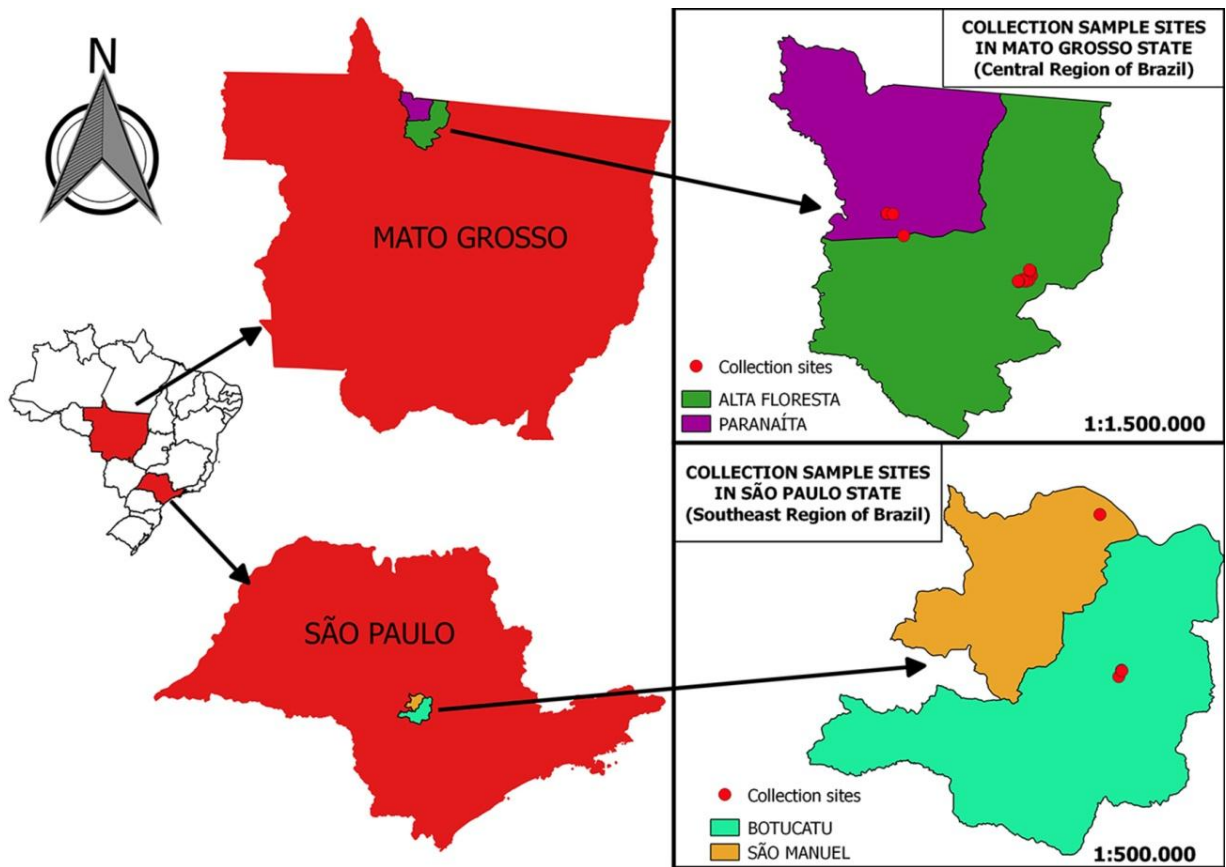


Figure 1: Collection areas of environmental samples (soil and animals) in Brazil. The evaluated states (MT and SP) are highlighted in same color and the samples site in different colors.

Table S1: Ecological characteristics of the three study areas where the armadillos (*D. novemcinctus*) and soil samples were collected.

Area	Focused area (ha)	Vegetation characteristics	Hydrological aspects	Land use	Soil pH	Köppen climate classification	Average annual temperature (°C)	Average annual precipitation (mm)
Area 1: Edgardia Farm Botucatu/SP	1, 200.32	Seasonal semi-deciduous and dense savanna forest (Cerrado Biome).	Flood plain areas, connected to the Capivara River Basin	Rice cultivation and livestock	5.1	Cwa Temperate climate	20.7°	1,358
Area 2: Cerrito Island, São Manuel/SP	193.26	Seasonal semi-deciduous and riparian forest; shrubs and grasses.	Surrounded by the Tietê River	Little use for livestock	5.1	Aw Tropical weather	22.6°	1, 278
Area 3: Alta Floresta and Paranaíta/MT	776.82	Ombrophilous and seasonal forests (Amazon Biome), with transitions to savanna forest (Cerrado Biome).	Presence of streams, dams, and the Santa Helena and Teles Pires rivers	Intensive use for livestock	3.8	Aw Tropical weather	26°	1,700

Collection period:

Area 1: January to February 2015 (rainy season)

Area 2: October to November 2015 (early rainy season)

Area 3: September to October 2015 (dry period)

Table S2: Geographic coordinates of the sites where the soil samples and the nine-banded armadillos were collected.

Collection Point	Location	Coordinate X	Coordinate Y*
P01	Burrow, Alta Floresta, MT	592076,198	8885920,93
P02	Burrow, Alta Floresta, MT	591041,488	8884091,7
P03	Burrow, Alta Floresta, MT	590125,431	8883653,56
P04	Burrow, Alta Floresta, MT	588395,92	8884363,71
P05	Burrow, Alta Floresta, MT	588797,867	8883695,58
P06	Burrow, Alta Floresta, MT	591668,548	8887921,56
P07	Burrow, Alta Floresta, MT	591234,744	8888272,82
P08	Surface, Paranaita, MT	540179,34	8902400,6
P09	Burrow, Paranaita, MT	533380,12	8911436,89
P10	Burrow, Paranaita, MT	533438,69	8911543,71
P11	Burrow, Alta Floresta, MT	586781,17	8883470,16
P12	Burrow, Alta Floresta, MT	586659,28	8883663,96
P13	Burrow, Alta Floresta, MT	535828,83	8911340,6
P14	Burrow, Sao Manuel, SP	765118,53	7500642,45
P15	Burrow, Sao Manuel, SP	765118,30	7500629,53
P16	Burrow, Sao Manuel, SP	765118,30	7500629,53
P17	Surface, Botucatu, SP	767504,45	7474136,38
P18	Burrow, Botucatu, SP	767933,06	7475170,75
P19	Burrow, Botucatu, SP	767971,43	7475097,43
P20	Burrow, Botucatu, SP	767991,39	7475080,15

* Coordinates by Universal Transverse Mercator (UTM)

Table S3: DNA regions, primers and annealing temperature used in the present study.

DNA Region	Primers Name	Sequence (5'-3')	Annealing Temp.	Source
ITS-1/5.8S/ITS-2 rDNA	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	55 °C	White et al, 1990
	ITS4	TCCGTAGGTGAACCTGCGG		
	ITS4	TCCGTAGGTGAACCTGCGG		
	ITS5	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
ITS-1 rDNA ITS-2 rDNA	PbITS-E PbITS-T	GAGCTTTGACGTCTGAGACC GTATCCCTACCTGATCCGAG	62 °C	Theodoro, et al, 2005; Arantes 2012
D1/D2 rDNA	NLS1	GCATATCAAAAGCGGAGGAAAAG	60 °C	White et al, 1990
	NLS4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG		
<i>gp43</i> gene	Gp43-E2 Gp43-E2	CTAGAATATCTCACTCCCAG GCCCCCTCCGTCTTCCATGTCC	58 °C	Cilsalpino et al, 1996
<i>arf</i> gene	ARF-fwd ARF-ver	TCTCATGGTTGG CCTCGATGC GACCCTCGACGACACGGTCACGAT C	60 °C	Kasuga et al, 2002
<i>tub1</i> gene	α -TubF α -TubR	CTGGGAGGTATGATAACACTGC CGTCGGGCTATTCAGATTTAAG	49 °C	Roberto et al, 2016
<i>tub1</i> gene	TubL-F TubL-R	GTCCTTCTKCAGAACTTYC CCRRGTACGTAGACAGTGG	55 °C	This work

Table S4: Polymorphic sites in the ITS and *gp43* Exon-2 regions in isolates of *Paracoccidioides* spp (S1a, S1b, PS2 e PS3).

Isolate		ITS			<i>gp43</i> Exon2													
		116	396	539	40	52	88	119	145	161	163	254	270	371	375	432	446	455
T18LM1	S1a	G	C	A	G	C	T	C	A	A	A	G	C	C	C	T	A	T
PSM*	S1a	G	C	A	G	C	T	C	A	A	A	G	C	C	C	T	A	T
T19B72	S1b	G	C	G	G	C	T	C	A	A	A	G	C	C	C	C	A	T
T20B13-1	S1b	G	C	G	G	C	T	C	A	A	A	G	C	C	C	C	A	T
T22LM1	S1b	G	C	A	G	C	T	A	A	A	A	G	C	C	C	C	A	T
T18LM3-5	PS2	A	T	A	A	G	G	T	G	T	C	A	T	A	T	C	G	G
BACR*	PS3	G	C	G	G	C	G	C	A	A	C	A	C	C	C	C	A	T

*Clinical isolates.

Table S5: Results of molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis sensu lato* and *P. lutzii* by Nested-PCR in soil samples collected in the surface or in the interior of armadillos' burrows.

Collection Point	Sample ID*	Geographic region (area)	Soil sample	Molecular detection	Species
P01		Central/MT (Alta Floresta)	Burrow	Negative	Negative
P02		Central/MT (Alta Floresta)	Burrow	Negative	Negative
P03		Central/MT (Alta Floresta)	Burrow	Negative	Negative
P04	MT04	Central/MT (Alta Floresta)	Burrow	Positive	<i>P. lutzii</i>
P05	MT01	Central/MT (Alta Floresta)	Surface	Positive	<i>P. brasiliensis</i>
P06	MT05	Central/MT (Alta Floresta)	Burrow	Positive	<i>P. lutzii</i>
P07	MT08	Central/MT (Alta Floresta)	Burrow	Positive	<i>P. lutzii</i>
P08		Central/MT (Alta Floresta)	Burrow	Negative	Negative
P09		Central/MT (Alta Floresta)	Burrow	Negative	Negative
P10		Central/MT (Paranaíta)	Burrow	Negative	Negative
P11	MT10	Central/MT (Paranaíta)	Burrow	Positive	<i>P. lutzii</i>

P12	MT11	Central/MT (Paranaíta)	Burrow	Positive	<i>P. lutzii</i>
P13		Central/MT (Paranaíta)	Burrow	Negative	Negative
P14		Southeast, SP (Cerrito Island)	Burrow	Negative	Negative
P15	SP02	Southeast, SP (Cerrito Island)	Burrow	Positive	<i>P. brasiliensis</i>
P16		Southeast, SP (Cerrito Island)	Burrow	Negative	Negative
P17	SP06	Southeast, SP (Edgardia Farm)	Surface	Positive	<i>P. lutzii</i>
P18	SP07	Southeast, SP (Edgardia Farm)	Burrow	Positive	<i>P. lutzii</i>
P19	SP03	Southeast, SP (Edgardia Farm)	Burrow	Positive	<i>P. brasiliensis</i>
P20	SP09	Southeast, SP (Edgardia Farm)	Burrow	Positive	<i>P. lutzii</i>

* Sample Identification according to Figure 4.

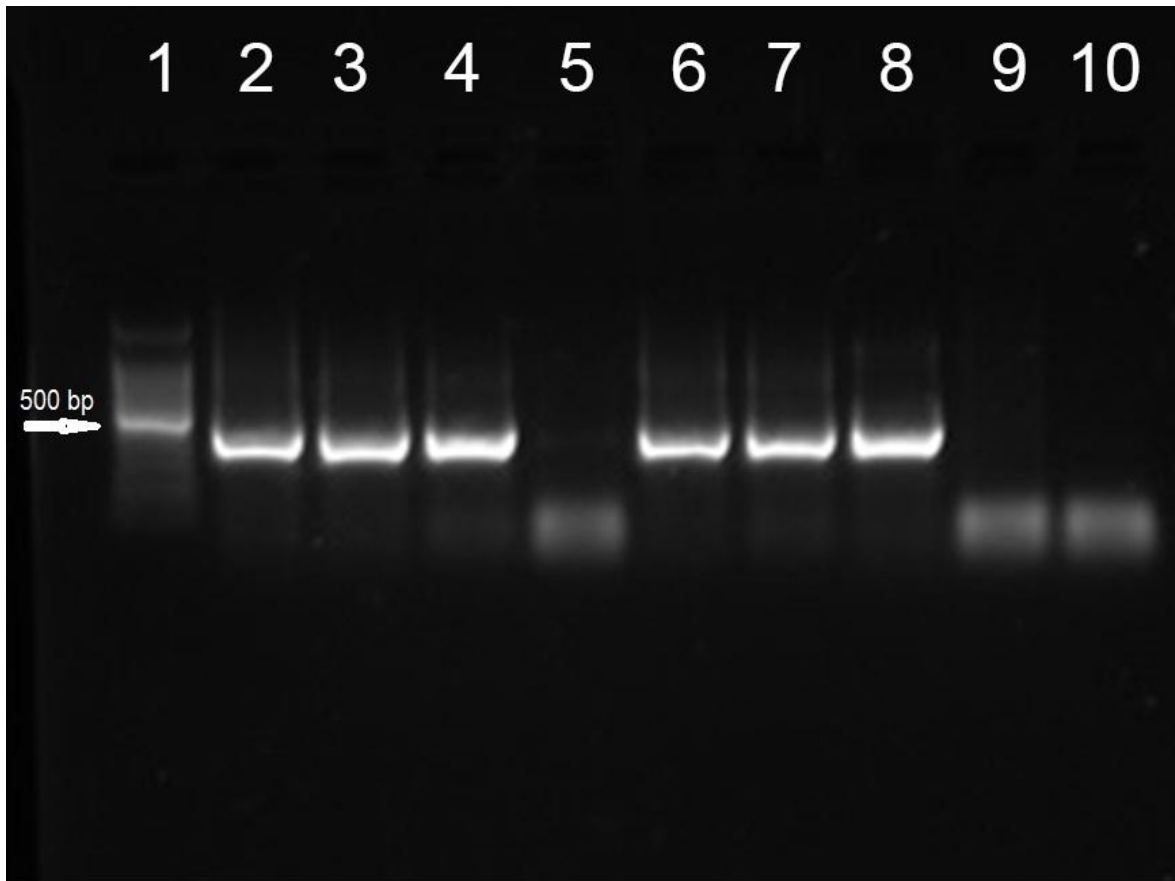


Figure S2: Detection *Paracoccidioides* spp by Nested/PCR using the primers PbITS-E and PbITS-T of environmental amplicons of soil from Central region do Brazil. 8: Positive control, 9 and 10: Negative control (nuclease-free water).

ANEXOS DA TESE

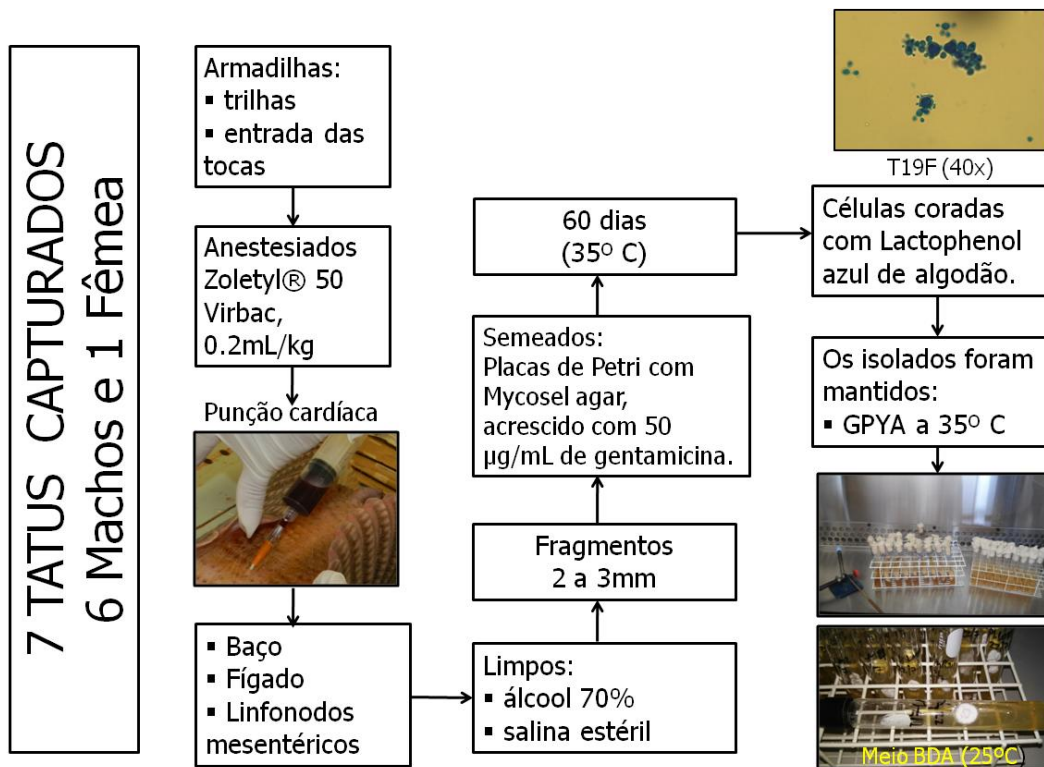


Figura 12: Fluxograma dos tatus (*D. novemcinctus*) capturados e processados neste estudo. Fonte: autoria própria.

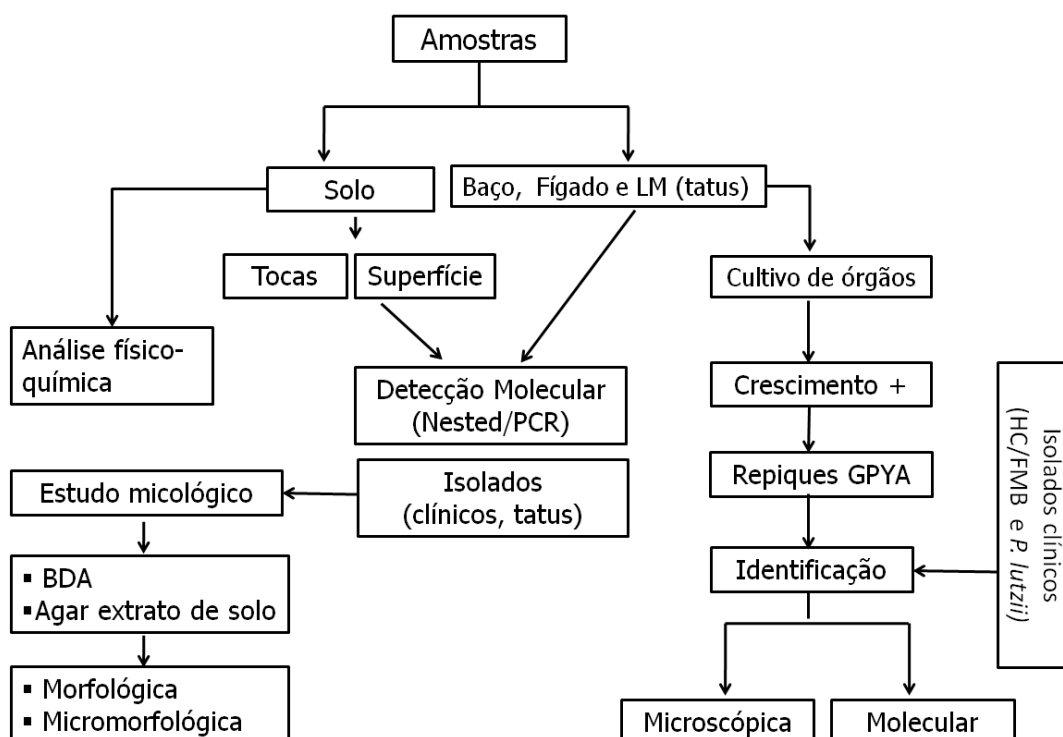


Figura 13: Fluxograma do processamento das amostras. Fonte: autoria própria.

ANÁLISE QUÍMICA E GRANULOMÉTRICA DO SOLO

O resultado da análise química e granulométrica do solo de Alta Floresta/MT, apresentou um solo de textura Média, com pH muito baixo (3,8), matéria orgânica (21g/dm^3) e H + Al (57).



Figura 14: Mapa que mostra a localização da Ilha do Cerrito no município de São Manuel/SP. Fonte: Google maps.

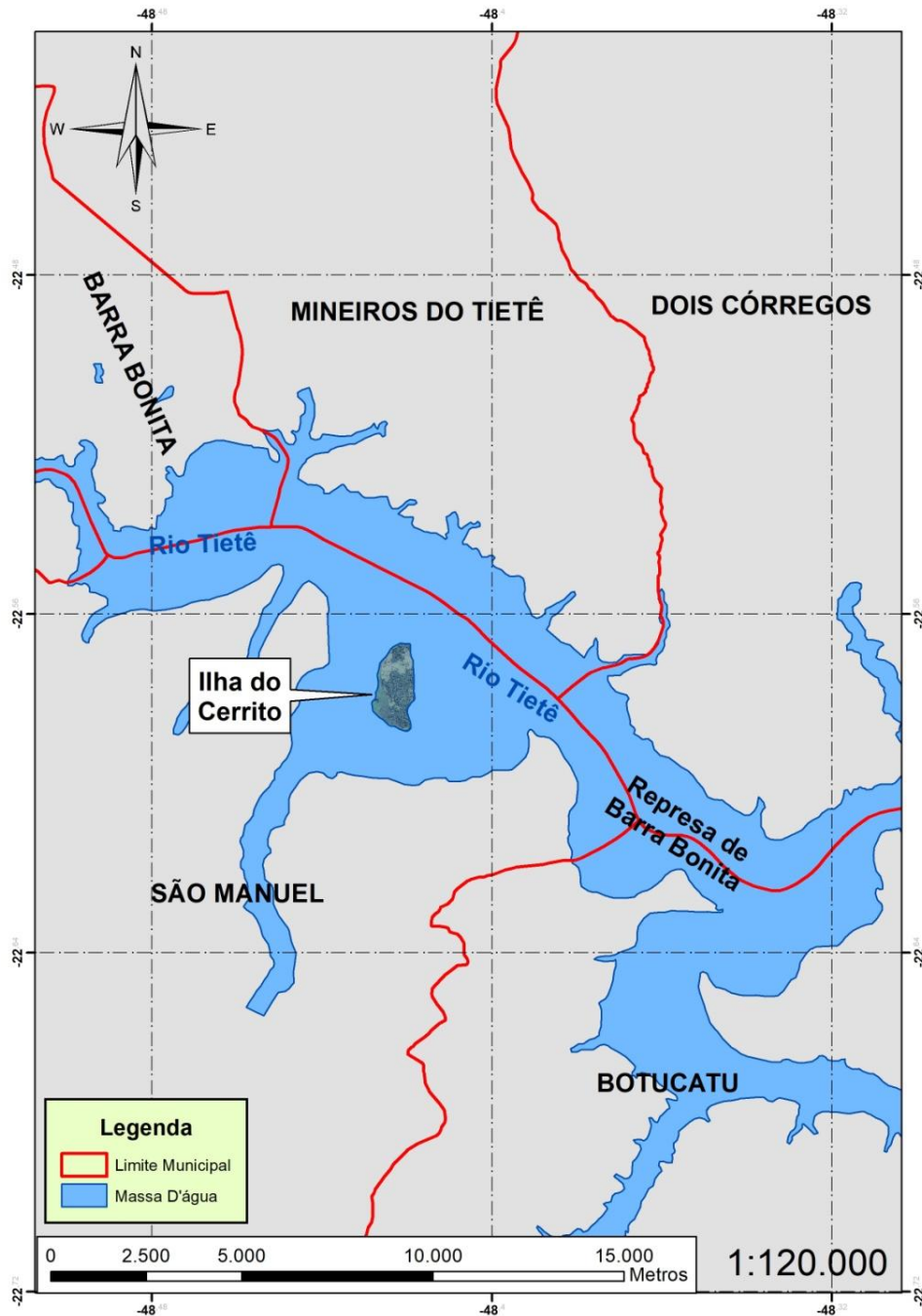


Figura 15: Localização da Ilha do Cerrito no município de São Manuel/SP.
 Fonte: Gasparoto, G. M.

DIREITOS AUTORAIS

As figuras citadas no capítulo 1 deste trabalho, foram retiradas de artigos que estão publicados como Free ou open access.

**PARTICIPAÇÃO COMO CO-AUTORA DO ARTIGO:
MOLECULAR IDENTIFICATION AND PHYLOGENETICAL ANALYSIS OF
DERMATOPHYTE FUNGI FROM LATIN AMERICA.**

Publicado em *Mycoses* doi: <https://doi.org/10.1111/myc.12532>

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27432316>

Garcia Garces H¹, Hrycyk MF¹, Giacobino J¹, Capela Machado G¹, Domingos Arantes T², Theodoro RC², Bosco SM¹, Bagagli E¹.

Abstract

Dermatophytes constitute a complex group of fungi, comprised of by the genera *Trichophyton*, *Epidermophyton* and *Microsporum*. They have the ability to degrade keratin and cause human and animal infections. Molecular techniques have made their identification faster and more accurate, and allowed important advances in phylogenetic studies. We aim to identify molecularly and to determine the phylogenetic relationships in dermatophyte fungi from Brazil and other Latin American countries, using DNA sequencing of the nuclear ribosome regions ITS1-5.8S-ITS2 and D1/D2. DNA of 45 dermatophytes was extracted and amplified by PCR for identification at the species level by sequencing of those ribosomal regions. The software mega 6.0 was used to establish the phylogenetic relationships via the Maximum Likelihood method. Out of 45 strains, 43 were identified by ITS (95.5%) and 100% by D1/D2 sequencing. Two strains could not be identified by ITS. Phylogenetic analyses separated the genera *Trichophyton* and *Microsporum*, which presented an uncertain relationship with *Epidermophyton floccosum*, depending on the ribosomal marker. Both regions can provide efficient identification of dermatophytes, whereas phylogenetic analysis revealed complex relations among dermatophyte fungi.

KEYWORDS: Arthrodermataceae; Dermatophytes; molecular identification; phylogeny