

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 27/08/2023.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Luciana Bonome Zeminian de Oliveira

**Genotipagem do *Paracoccidioides brasiliensis* de
diferentes amostras de pacientes atendidos no Hospital
das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção
do título de Doutora em Patologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Luciane Alarcão Dias-Melicio

Botucatu
2018

Luciana Bonome Zeminian de Oliveira

Genotipagem do *Paracoccidioides brasiliensis* de
diferentes amostras de pacientes atendidos no Hospital
das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção
do título de Doutor(a) em Patologia.

Orientadora: Prof^a.Dr^a. Luciane Alarcão Dias-Melicio

Botucatu
2018

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

Oliveira, Luciana Bonome Zeminian de.
Genotipagem do *Paracoccidioides brasiliensis* de
diferentes amostras de pacientes atendidos no Hospital das
Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu / Luciana Bonome
Zeminian de Oliveira. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Luciane Alarcão Dias-Melicio
Capes: 20202008

1. *Paracoccidioides brasiliensis*. 2. Sequenciamento de
nucleotídeo. 3. Técnicas de genotipagem. 4.
Paracoccidioidomicose. 5. Indicadores biológicos.

Palavras-chave: *Paracoccidioidomicose*; *Paracoccidioides
brasiliensis*; espécies crípticas; sequenciamento.

Dedicatória

*À minha mãe, Clara, por todo amor, carinho, suporte e amizade
que me dá; a meu pai, Reinaldo, onde quer que esteja, sei que
sempre olha por mim; e a meu marido, André pelo amor,
compreensão, paciência e companheirismo.*

Quando tudo parecer dar errado em sua vida, lembre-se de que o avião decola contra o vento, e não a favor dele (Henry Ford).

Agradecimientos

A Deus, por ter me dado força, paciência e resiliência para conduzir este trabalho.

À minha mãe Clara, pelo amor, carinho, dedicação, suporte e amizade durante toda minha vida, apoiando minhas decisões e incentivando a correr atrás dos meus sonhos. Minhas realizações são mérito dela por ser a pessoa essencial e indispensável na minha vida.

A meu pai Reinaldo, que me despertou o interesse pela área médica e por tudo que me proporcionou durante sua vida, e mesmo que não esteja fisicamente entre nós, está e estará sempre comigo.

A meu marido André, por ser uma pessoa tão especial, tão companheira, que me apoia, me compreende, me acalma, me aconselha, me protege, e por constantemente me inspirar a ser uma pessoa melhor. Eu te amo.

À minha avó Lourdes, por toda ajuda, amor e carinho durante minha criação e por estar sempre na torcida e rezando para que eu atinja meus objetivos.

À minha orientadora Dra Luciane Alarcão Dias-Melício, pela amizade, cuidado e carinho com que conduziu meus estudos nesses últimos anos e por todos os ensinamentos que me passou, por me estender a mão quando a procurei e aberto as portas de seu

laboratório para a realização desse doutorado.

A minhas grandes amigas e parceiras Amanda Manoel Della Coletta e Taiane Gardizani, pelo prazer de percorrermos juntas este caminho cheio de obstáculos; pelo companheirismo, conselhos, os momentos descontraídos e, principalmente, pela disposição de pôr a mão na massa quando fosse necessário, vocês foram imprescindíveis.

À minha querida amiga Juliane de Campos Inácio, por todo incentivo desde quando nos conhecemos durante o mestrado, pelas risadas e momentos leves, pelas conversas tão alegres e por ser sempre um ouvido aos desabafos quando houve a necessidade em nossos vários almoços, não consigo descrever o quanto sua amizade representa para mim.

À minha querida amiga Thálitta Hetamaro Ayalla Lima, por toda a ajuda no laboratório desde o início desse trabalho, pela sua energia contagiante, seu amor pela ciência e sua sede de saber que são inspiradores. Você foi uma das maiores surpresas que tive nesses quatro anos, uma amizade leal e sincera que vou levar comigo para sempre, muito obrigada.

A todo o grupo de alunos que já passaram e que hoje integram o grupo de pesquisa do Laboratório de Imunopatologia e Agentes

Infecciosos (LIAI), obrigada por tudo.

Ao funcionário Paulo, do Laboratório TOXICAM, pela disponibilidade de me ajudar logo no início do trabalho e, depois, novamente, quando repetimos os experimentos, sua ajuda foi indispensável nos resultados obtidos nessa pesquisa.

A todos os alunos e funcionários do Laboratório da Immunopatologia da Relação Materno-Fetal, representados na pessoa da Profa Dra Márcia Guimarães da Silva, por ter permitido o uso de seu laboratório e equipamentos.

A todos os alunos do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática, representados na pessoa do Prof Dr Erick da Cruz Castelli, por ter permitido o uso de seu laboratório e equipamentos.

Aos funcionários Leonardo e Flávia, do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu pela ajuda durante a realização de diversas análises, e a Profa Dra Maria Inês de Moura Campos Pardini, por ter aberto as portas de seu laboratório e permitido o uso de seus equipamentos.

À secretária do programa, Vânia Soler, por todo seu empenho em nos ajudar durante a caminhada da pós-graduação.

Ao Dr Julio de Faveri, por dividir seus conhecimentos e por todo o suporte para obtenção das amostras e dados clínicos utilizados

nessa pesquisa.

Aos funcionários e docentes do Departamento de Patologia, pela ajuda na separação das biópsias e informações dos mesmos.

Aos funcionários da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX), pelo suporte administrativo e acadêmico.

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo suporte financeiro durante os quatro anos desse doutorado (Processo FAPESP nº 2013/24877-9).

À minha segunda família, D. Vera, Eliane, José Laércio, Vera Maria, João, Junior, Érica, Vânia, Juliani, Mariah, Murilo e Camila, que sempre me acolheram com amor e carinho e hoje tenho muito orgulho de pertencer a família de vocês.

Aos meus tios Cacilda e Luiz Augusto, por serem tão presentes na minha vida e de minha família sempre nos apoiando.

À minha madrinha Carla, seu marido Antônio Carlos, Fabrício, e minha afilhadinha Natália, por acreditarem tanto em mim e por todo o carinho sempre.

Aos pacientes que tornaram possíveis os resultados expostos nessa tese.

A todos aqueles que direta ou indiretamente ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

Sumário

Resumo	13
Abstract	16
Capítulo 1	18
Revisão de Literatura.....	19
Referências.....	34
Capítulo 2	50
Artigo: “Genotyping of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> from formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissue samples from patients treated in the Hospital of Medical School of Botucatu, São Paulo State University (UNESP).....	51
Conclusões	96

Resumo

RESUMO

A paracoccidioidomicose é uma micose granulomatosa sistêmica, prevalente na América Latina, e que até recentemente acreditava-se ser causada apenas por uma espécie de fungo, o *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*). No entanto, em 2006, pesquisadores descreveram três espécies crípticas: S1, PS2, PS3 e, posteriormente o PS4. Em 2009, o *Paracoccidioides lutzii* (Pb01-like) foi descrito, e ano passado, em 2017, uma nova nomenclatura foi proposta para esses agentes etiológicos distintos: *P. brasiliensis* (S1), *P. Americana* (PS2), *P. restrepiensis* (PS3) e *P. venezuelensis* (PS4). Todos esses agentes são fungos termodimórficos que crescem como levedura *in vivo*, no hospedeiro, em tecidos ou em culturas *in vitro* a 37°C e como micélio à temperatura ambiente (4 a 28°C). As espécies não são uniformemente distribuídas pela América Latina, sendo algumas mais proeminentes em algumas regiões do que em outras. O Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu é polo de estudo da paracoccidioidomicose e situado na região centro-oeste do estado de São Paulo, considerada uma área endêmica. Devido à existência de espécies crípticas de *Paracoccidioides*, análises mais detalhadas nas amostras de pacientes tornaram-se necessárias para uma melhor compreensão de distribuição e ocorrência das espécies recentemente descritas nessa região, favorecendo uma possível correlação entre os grupos genéticos e características micológicas e clínicas. Os objetivos foram obtenção de dados epidemiológicos, geográficos e clínicos dos pacientes diagnosticados e tratados em um período de 10 anos, de 2004

até 2014 em Botucatu, a partir da análise dos prontuários médicos e genotipagem as espécies clínicas presentes nas amostras desses pacientes que foram aqui diagnosticados. Para a genotipagem, usamos técnicas de extração de DNA, PCR e sequenciamento de três genes alvo (ITS, CHS2 e ARF). Identificamos que em Botucatu a forma clínica prevalente foi a forma crônica (77,4%), mais comumente apresentada por indivíduos do sexo masculino acima dos 40 anos de idade, fumantes e etilistas. Identificamos que a maior parte dos pacientes, tanto da forma aguda, bem como da forma crônica, eram indivíduos auto declarados brancos. Em relação à genotipagem das espécies presentes nessas amostras, conseguimos identificar 44 amostras positivas. As sequências dos genes alvo foram avaliadas no GenBank para certificação da presença de *Paracoccidioides*. As árvores filogenéticas foram construídas usando as sequências de genes ITS, ARF e CHS2 e mostraram que 100% de nossas amostras positivas pertenciam à espécie críptica S1. Esse é um dado importante, demonstrando a possível ausência de outras espécies em nossa região. Além disso, a observação de que indivíduos brancos são mais acometidos pela doença abre novas perspectivas de estudos sobre uma possível resistência de indivíduos pardos e negros contra o fungo.

Palavras-chave: Paracoccidioomicose, *Paracoccidioides brasiliensis*, Espécies Crípticas, Sequenciamento.

Abstract

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis is a chronic granulomatous mycosis prevalent in Latin America, that until recently it was believed to be caused only by *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*). However, in 2006, researchers described cryptic species: S1, PS2, PS3, and PS4. In 2009, *Paracoccidioides lutzii* (Pb01-like) was described, and now, a new nomenclature was proposed for the other different agents: *P. brasiliensis* (S1), *P. Americana* (PS2), *P. restrepiensis* (PS3), and *P. venezuelensis* (PS4). All these agents are thermodimorphic fungi that develop as yeast *in vivo*, *in host* tissues or *in vitro* cultures at 37°C in culture media. It also grows as mycelium at room temperature ranging from 4 to 28°C. These species are not uniformly distributed throughout Latin America, some are more prominent in some regions than in others. The Hospital of Medical School of Botucatu - UNESP, which is a paracoccidioidomycosis study pole, is in São Paulo state midwest region, that is classified as an endemic area. Due to the existence of cryptic species of *Paracoccidioides*, further analyses of patient samples are needed for a better understanding the distribution and occurrence of these recently described species in Botucatu region, that could favor a possible correlation between genetic groups and mycological and clinical characteristics. Given the importance of this disease to the region, the aims of this study were to perform a retrospective epidemiological, geographical and clinical study gathering information available on medical records of patients treated in 10-year period from 2004

to 2014 in Botucatu and to genotype the clinical species present in the samples of our diagnosed patients. For the genotyping, it was used techniques for the removal of the paraffin from slices of the biopsies, followed by DNA extraction, PCR and sequencing of three target genes (ITS, CHS2 and ARF). It was that the most prevalent clinic form in Botucatu region is the chronic type (77,4%), most commonly presented in male individuals over 40 years old, smokers and alcoholics. It was also demonstrated that most of the patients, taking both clinical forms (acute and chronic) in consideration, are individuals self-declared as white. From the genotyping of species in the samples, we were able to find 44 positive samples. All the sequences were compared at with sequences deposited at GenBank to testify the presence of *P. brasiliensis*. The phylogenetic trees were constructed using the sequences of ITS, ARF and CHS2 genes and showed that 100% of our positive samples are from S1 cryptic species. This is an important data, demonstrating the possible absence of other species in our region. Moreover, the observation that white individuals are more prone to Paracoccidioidomycosis opens new perspectives of studies about a possible resistance of nonwhite individuals against the fungi.

Keywords: Paracoccidioidomycosis, *Paracoccidioides brasiliensis*, Cryptic species, Sequencing.

CONCLUSION

In this study we identified that in our region, white individuals were more affected by PCM than non-white ones. Also, it was obtained significant results regarding the prevalence of species in Botucatu region, the S1 cryptic species was predominant. It was also shown that working with fresh tissue collected from PCM lesions is much more effective for molecular analysis than FFPE samples, which resulted in 100% of positivity. This kind of analysis would enable the achievement of a more detailed epidemiological background of the affected individuals in the Botucatu city region.

REFERENCES

1. Ramos ESM, Saraiva Ldo E. Paracoccidioidomycosis. Dermatologic clinics. 2008;26(2):257-69, vii. doi: 10.1016/j.det.2007.11.005. PubMed PMID: 18346557.
2. Franco M, Sano A, Kera K, Nishimura K, Takeo K, Miyaji M. Chlamydospore formation by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1989;31(3):151-7. PubMed PMID: 2617011.
3. Blotta MH, Mamoni RL, Oliveira SJ, Nouer SA, Papaiordanou PM, Goveia A, et al. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. The

American journal of tropical medicine and hygiene. 1999;61(3):390-4.
PubMed PMID: 10497977.

4. Restrepo A. Paracoccidioidomycosis

In: Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD, editors. Clinical mycology. Oxford: Oxford University Press; 2003. p. 328-45.

5. Restrepo A, Gonzalez A, Agudelo CA. Paracoccidioidomycosis. In: Kauffman CA, Pappas PG, Sobel JD, Dismukes WE, editors. Essentials of Clinical Mycology. New York, NY: Springer New York; 2011. p. 367-85.

6. Mendes RP, Cavalcante RdS, Marques SA, Marques MEA, Venturini J, Sylvestre TF, et al. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. The Open Microbiology Journal. 2017;11(1):224-82. doi: 10.2174/1874285801711010224.

7. Van Damme PA, Bierenbroodspot F, Telgt DS, Kwakman JM, De Wilde PC, Meis JF. A case of imported paracoccidioidomycosis: an awkward infection in The Netherlands. Medical mycology. 2006;44(1):13-8. PubMed PMID: 16805088.

8. Bousquet A, Dussart C, Drouillard I, Charbel EC, Boiron P. [Imported mycosis: a review of paracoccidioidomycosis]. Medecine et maladies infectieuses. 2007;37 Suppl 3:S210-4. doi: 10.1016/j.medmal.2007.09.007. PubMed PMID: 17988812.

9. Mayayo E, Lopez-Aracil V, Fernandez-Torres B, Mayayo R, Dominguez M. Report of an imported cutaneous disseminated case of paracoccidioidomycosis. Revista iberoamericana de micologia. 2007;24(1):44-6. PubMed PMID: 17592892.

10. Restrepo A, McEwen JG, Castaneda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Medical mycology*. 2001;39(3):233-41. PubMed PMID: 11446526.
11. Restrepo A, Benard G, de Castro CC, Agudelo CA, Tobon AM. Pulmonary paracoccidioidomycosis. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2008;29(2):182-97. doi: 10.1055/s-2008-1063857. PubMed PMID: 18366000.
12. Restrepo A, Tobon AM, Cano LE. Paracoccidioidomycosis. In: Dolin R, Bennett JE, Blaser MJ, editors. *Principles and practice of infectious diseases*. Philadelphia: Elsevier; 2014. p. 2995-3002.
13. Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Molecular biology and evolution*. 2006;23(1):65-73. doi: 10.1093/molbev/msj008. PubMed PMID: 16151188.
14. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Molecular phylogenetics and evolution*. 2009;52(2):273-83. doi: 10.1016/j.ympev.2009.04.005. PubMed PMID: 19376249.
15. Teixeira MM, Theodoro RC, Nino-Vega G, Bagagli E, Felipe MS. *Paracoccidioides* species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. *PLoS pathogens*. 2014;10(10):e1004397. doi:

10.1371/journal.ppat.1004397. PubMed PMID: 25357210; PubMed Central PMCID: PMC4214758.

16. Turissini DA, Gomez OM, Teixeira MM, McEwen JG, Matute DR. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. *Fungal genetics and biology : FG & B*. 2017;106:9-25. doi: 10.1016/j.fgb.2017.05.007. PubMed PMID: 28602831.

17. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. *Paracoccidioidomycosis*: an update. *Clinical microbiology reviews*. 1993;6(2):89-117. PubMed PMID: 8472249; PubMed Central PMCID: PMC358272.

18. Bagagli E, Sano A, Coelho KI, Alquati S, Miyaji M, de Camargo ZP, et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1998;58(4):505-12. PubMed PMID: 9574800.

19. Colombo AL, Tobon A, Restrepo A, Queiroz-Telles F, Nucci M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Medical mycology*. 2011;49(8):785-98. doi: 10.3109/13693786.2011.577821. PubMed PMID: 21539506.

20. Desjardins CA, Champion MD, Holder JW, Muszewska A, Goldberg J, Bailao AM, et al. Comparative genomic analysis of human fungal pathogens causing paracoccidioidomycosis. *PLoS genetics*. 2011;7(10):e1002345. doi: 10.1371/journal.pgen.1002345. PubMed PMID: 22046142; PubMed Central PMCID: PMC3203195.

21. Matute DR, Sepulveda VE, Quesada LM, Goldman GH, Taylor JW, Restrepo A, et al. Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. J Clin Microbiol. 2006;44(6):2153-7. doi: 10.1128/JCM.02540-05. PubMed PMID: 16757613; PubMed Central PMCID: PMC1489427.
22. Teixeira Mde M, Theodoro RC, Derengowski Lda S, Nicola AM, Bagagli E, Felipe MS. Molecular and morphological data support the existence of a sexual cycle in species of the genus *Paracoccidioides*. Eukaryotic cell. 2013;12(3):380-9. doi: 10.1128/EC.05052-11. PubMed PMID: 23125354; PubMed Central PMCID: PMC3629771.
23. Theodoro RC, Teixeira Mde M, Felipe MS, Paduan Kdos S, Ribolla PM, San-Blas G, et al. Genus *paracoccidioides*: Species recognition and biogeographic aspects. PloS one. 2012;7(5):e37694. doi: 10.1371/journal.pone.0037694. PubMed PMID: 22666382; PubMed Central PMCID: PMC3364295.
24. Hahn RC, Rodrigues AM, Fontes CJF, Nery AF, Tadano T, Júnior LdPQ, et al. Fatal fungemia due to *Paracoccidioides lutzii*. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2014;91(2):394-8.
25. Marques-da-Silva SH, Rodrigues AM, de Hoog GS, Silveira-Gomes F, de Camargo ZP. Occurrence of *Paracoccidioides lutzii* in the Amazon region: description of two cases. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2012;87(4):710-4.
26. Teixeira Mde M, Theodoro RC, Oliveira FF, Machado GC, Hahn RC, Bagagli E, et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical

- implications. *Medical mycology*. 2014;52(1):19-28. doi: 10.3109/13693786.2013.794311. PubMed PMID: 23768243.
27. Futuyma D. *Evolutionary biology*. Sinauer.[JH] Gallup Organization (1999) Americans remain very religious, but not necessarily in conventional ways. 1998.
28. Taylor J, Jacobson D, Fisher M. THE EVOLUTION OF ASEXUAL FUNGI: Reproduction, Speciation and Classification. *Annual review of phytopathology*. 1999;37:197-246. doi: 10.1146/annurev.phyto.37.1.197. PubMed PMID: 11701822.
29. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. 1990;18(1):315-22.
30. Bellissimo-Rodrigues F, Bollela VR, Da Fonseca BAL, Martinez R. Endemic paracoccidioidomycosis: relationship between clinical presentation and patients' demographic features. *Medical mycology*. 2013;51(3):313-8. doi: 10.3109/13693786.2012.714529.
31. Fabris LR, Andrade ÚV, Santos AFD, Marques APdC, Oliveira SMdVL, Mendes RP, et al. Decreasing prevalence of the acute/subacute clinical form of paracoccidioidomycosis in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2014;56(2):121-5.
32. Barbosa W, Daher R, Oliveira Ad. Forma linfático-abdominal da blastomicose sul-americana. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1968;10:16-27.

33. Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infection and immunity*. 1984;46(2):346-53. PubMed PMID: 6500694; PubMed Central PMCID: PMC261537.
34. Castro RM, Del Negro G. [Clinical characteristics of paracoccidioidomycosis in children]. *Revista do Hospital das Clinicas*. 1976;31(3):194-8. PubMed PMID: 935722.
35. Aristizabal BH, Clemons KV, Stevens DA, Restrepo A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. *Infection and immunity*. 1998;66(11):5587-91. PubMed PMID: 9784579; PubMed Central PMCID: PMC108705.
36. Martinez R. Epidemiology of paracoccidioidomycosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2015;57:11-20.
37. Martinez R. New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology. *Journal of Fungi*. 2017;3(1):1.
38. Arantes TD, Theodoro RC, Da Graca Macoris SA, Bagagli E. Detection of *Paracoccidioides* spp. in environmental aerosol samples. *Medical mycology*. 2013;51(1):83-92. doi: 10.3109/13693786.2012.698444. PubMed PMID: 22762209.
39. LaBeaud AD. Why arboviruses can be neglected tropical diseases. *PLoS neglected tropical diseases*. 2008;2(6):e247.

40. Mendes R. Paracoccidioidomycosis surveillance and control. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2010;16:194-7.
41. Taborda CP, da Silva MB, Nosanchuk JD, Travassos LR. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. *Mycopathologia*. 2008;165(4-5):331-9. doi: 10.1007/s11046-007-9061-4. PubMed PMID: 18777637; PubMed Central PMCID: PMC2586806.
42. Bellissimo-Rodrigues F, Machado AA, Martinez R. Paracoccidioidomycosis epidemiological features of a 1,000-cases series from a hyperendemic area on the southeast of Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2011;85(3):546-50.
43. Ness RB, Haggerty CL, Harger G, Ferrell R. Differential distribution of allelic variants in cytokine genes among African Americans and White Americans. *American journal of epidemiology*. 2004;160(11):1033-8.
44. Batista LE, Escuder MML, Pereira JCR. The color of death: causes of death according to race in the State of Sao Paulo, 1999 to 2001. *Revista de saude publica*. 2004;38(5):630-6.
45. Pereira AC, Souza VBd, Dias-Baptista IMF. DNA extraction from formalin-fixed and paraffin-embedded skin biopsies and PCR amplification. *Hansenologia Internationalis (Online)*. 2008;33:25-9.
46. Thavarajah R, Mudimbaimannar VK, Elizabeth J, Rao UK, Ranganathan K. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP*.

2012;16(3):400-5. doi: 10.4103/0973-029X.102496. PubMed PMID: 23248474; PubMed Central PMCID: PMC3519217.

47. Stanta G, Bonin S, Perin R. RNA extraction from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Methods in molecular biology*. 1998;86:23-6. doi: 10.1385/0-89603-494-1:23. PubMed PMID: 9664448.

48. Specht K, Richter T, Muller U, Walch A, Werner M, Hofler H. Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue. *The American journal of pathology*. 2001;158(2):419-29. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63985-5. PubMed PMID: 11159180; PubMed Central PMCID: PMC1850313.

49. Titford ME, Horenstein MG. Histomorphologic assessment of formalin substitute fixatives for diagnostic surgical pathology. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2005;129(4):502-6. doi: 10.1043/1543-2165(2005)129<502:HAOFSF>2.0.CO;2. PubMed PMID: 15794674.

50. Feldman MY. Reactions of nucleic acids and nucleoproteins with formaldehyde. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*. 1973;13:1-49. PubMed PMID: 4573489.

51. Jackson V. Studies on histone organization in the nucleosome using formaldehyde as a reversible cross-linking agent. *Cell*. 1978;15(3):945-54. PubMed PMID: 569554.

52. Moller K, Rinke J, Ross A, Buddle G, Brimacombe R. The use of formaldehyde in RNA-protein cross-linking studies with ribosomal subunits from *Escherichia coli*. *European journal of biochemistry*. 1977;76(1):175-87. PubMed PMID: 407080.

53. Brutlag D, Schlehuber C, Bonner J. Properties of formaldehyde-treated nucleohistone. *Biochemistry*. 1969;8(8):3214-8. PubMed PMID: 5809221.
54. Ilyin YV, Georgiev GP. Heterogeneity of deoxynucleoprotein particles as evidenced by ultracentrifugation of cesium chloride density gradient. *Journal of molecular biology*. 1969;41(2):299-303. PubMed PMID: 5805452.
55. Varshavsky AJ, Ilyin YV. Salt treatment of chromatin induces redistribution of histones. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*. 1974;340(2):207-17. doi: [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(74\)90114-2](https://doi.org/10.1016/0005-2787(74)90114-2).
56. Varshavsky AJ, Sundin O, Bohn M. A stretch of "late" SV40 viral DNA about 400 bp long which includes the origin of replication is specifically exposed in SV40 minichromosomes. *Cell*. 1979;16(2):453-66. PubMed PMID: 222461.
57. Gilbert MT, Haselkorn T, Bunce M, Sanchez JJ, Lucas SB, Jewell LD, et al. The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when? *PloS one*. 2007;2(6):e537. doi: 10.1371/journal.pone.0000537. PubMed PMID: 17579711; PubMed Central PMCID: PMC1888728.
58. Kocjan BJ, Hosnjak L, Poljak M. Commercially available kits for manual and automatic extraction of nucleic acids from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissues. *Acta dermatovenerologica Alpina, Pannonica, et Adriatica*. 2015;24(3):47-53. PubMed PMID: 26399841.

59. Moelans CB, Oostenrijk D, Moons MJ, van Diest PJ. Formaldehyde substitute fixatives: effects on nucleic acid preservation. *Journal of clinical pathology*. 2011;64(11):960-7. doi: 10.1136/jclinpath-2011-200152. PubMed PMID: 21715573.
60. Greer CE, Peterson SL, Kiviat NB, Manos MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time. *American journal of clinical pathology*. 1991;95(2):117-24. PubMed PMID: 1846996.
61. Senguven B, Baris E, Oygur T, Berktaş M. Comparison of methods for the extraction of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissues. *International journal of medical sciences*. 2014;11(5):494-9. doi: 10.7150/ijms.8842. PubMed PMID: 24688314; PubMed Central PMCID: PMC3970103.
62. Kocjan BJ, Hosnjak L, Poljak M. Detection of alpha human papillomaviruses in archival formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue specimens. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2016;76 Suppl 1:S88-S97. doi: 10.1016/j.jcv.2015.10.007. PubMed PMID: 26514313.
63. Lin J, Kennedy SH, Svarovsky T, Rogers J, Kemnitz JW, Xu A, et al. High-quality genomic DNA extraction from formalin-fixed and paraffin-embedded samples deparaffinized using mineral oil. *Analytical biochemistry*. 2009;395(2):265-7. doi: 10.1016/j.ab.2009.08.016. PubMed PMID: 19698695; PubMed Central PMCID: PMC2764035.

64. Xie R, Chung JY, Ylaya K, Williams RL, Guerrero N, Nakatsuka N, et al. Factors influencing the degradation of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2011;59(4):356-65. doi: 10.1369/0022155411398488. PubMed PMID: 21411807; PubMed Central PMCID: PMC3201147.
65. Dugaard I, Kjeldsen TE, Hager H, Hansen LL, Wojdacz TK. The influence of DNA degradation in formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue on locus-specific methylation assessment by MS-HRM. *Experimental and molecular pathology*. 2015;99(3):632-40.
66. Arantes TD, Theodoro RC, Teixeira Mde M, Bosco Sde M, Bagagli E. Environmental Mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil Reveals New Clues into Genetic Diversity, Biogeography and Wild Host Association. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(4):e0004606. doi: 10.1371/journal.pntd.0004606. PubMed PMID: 27045486; PubMed Central PMCID: PMC4821608.
67. Bagagli E, Bosco SM, Theodoro RC, Franco M. 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*. 2006;6(5):344-51.
68. Bagagli E, Franco M, Bosco SDM, Hebelers-Barbosa F, Trinca L, Montenegro M. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. *Medical mycology*. 2003;41(3):217-23.

69. Machado GC, Moris DV, Arantes TD, Silva LRF, Theodoro RC, Mendes RP, et al. Cryptic species of *Paracoccidioides brasiliensis*: impact on paracoccidioidomycosis immunodiagnosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2013;108(5):637-43.
70. Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL, Queiroz-Telles F, Kono ASG, Paniago AM, et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2017;0. doi: 10.1590/0037-8682-0230-2017. PubMed PMID: 28746570.

Conclusão

Nesse trabalho, identificamos que na nossa região de Botucatu, indivíduos brancos foram mais afetados pela PCM que os negros e pardos. Além disso, obtivemos resultados significantes em relação à prevalência das espécies em nossa região, mostrando que a espécie S1 (*P. brasiliensis*) foi a única identificada nesse estudo. Também demonstramos que trabalhar com tecido fresco coletados de lesões de pacientes com PCM, que resultou em 100% de positividade, e, portanto, é muito mais eficiente para análises moleculares do que amostras fixadas em parafina.

