



**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.

Capítulo I

1. REVISÃO DE LITERATURA

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma infecção fúngica sistêmica, que induz uma resposta granulomatosa. A doença é endêmica na América Latina e está associada com ambientes rurais e atividades agrícolas com casos reportados da Argentina até o México, sendo os países mais afetados a Venezuela, Colômbia, Brasil e Argentina. Os agentes etiológicos são os fungos pertencentes ao gênero *Paracoccidioides* e o *Paracoccidioides lutzii*, que são fungos termodimórficos que se desenvolvem a 37°C como levedura *in vivo*, em tecidos do hospedeiro ou quando cultivados em meios de cultura enriquecidos e, na forma de micélio (filamentosa), à temperatura ambiente (4-28°C) [1-9].

No entanto, em 2006, pesquisadores [10] descreveram três espécies crípticas do *P. brasiliensis*: S1, PS2, PS3 e, posteriormente o PS4. Em 2009, o *Paracoccidioides lutzii* (Pb01-like) também 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).

A paracoccidioidomicose afeta principalmente trabalhadores que exercem funções ou atividades relacionadas ao manejo de solo com o fungo, como serviços agrícolas em geral, preparação de solo para cultivo, terraplanagem, jardinagem e transporte de produtos vegetais. Em sua maioria, os pacientes afetados com a PCM foram expostos, em algum momento, a atividades agrícola nas primeiras duas décadas de suas vidas,

quando, mais provavelmente, adquiriram a infecção mesmo sem apresentar sintomas [11-19].

Assim, a infecção acontece pela via respiratória, pela inalação de conídios, sendo a porta de entrada mais comum do fungo no corpo humano, os pulmões. Os esporos inalados atingem os alvéolos e os bronquíolos, e assim dessas áreas atingidas pelo fungo, esse se espalha pela via linfática para os linfonodos paratraqueais e parabronquiais o que dispara uma resposta granulomatosa. Uma vez no pulmão, o micélio (forma infectante inalada) sofre transformação para levedura (forma patogênica). As áreas afetadas inicialmente no pulmão e os linfonodos atingidos são conhecidos como complexo primário [3, 20-22].

A PCM pode comprometer qualquer órgão ou sistema, e várias manifestações clínicas da PCM já foram descritas baseadas em critérios diferentes como topografia da lesão, história natural da lesão, apresentação da severidade clínica e resultados de reações sorológicas. A primeira descrição foi realizada no *International Colloquium on Paracoccidioidomycosis* que aconteceu em 1986 em Medellín, na Colômbia [23, 24].

A resposta imune do paciente à infecção com *Paracoccidioides sp.* que determina a progressão da interação entre hospedeiro e parasita. Quando a resposta imune é satisfatória, o organismo impede a evolução da doença, durante a formação do complexo primário, e ao final ocorre a regressão da resposta inflamatória, o que pode ser chamado de cura espontânea. Pacientes com esses tipos de reação apresentam teste

intradérmico positivo à paracoccidioidina, determinando a PCM infecção [23, 25-28].

O fungo pode então, multiplicar-se e espalhar rapidamente via linfo-hematogênica para vários órgãos e sistemas, determinando a PCM-doença que pode se apresentar de duas formas distintas [23, 29]. A forma aguda/subaguda ou juvenil é responsável por 5-25% dos casos e pode ser mais frequente em algumas áreas endêmicas e pouco frequente em outras. No Brasil, os estados do Maranhão, Minas Gerais, Pará, Goiás e São Paulo são os mais afetados com essa manifestação clínica [23, 30]. Predominantemente, a forma aguda afeta crianças, adolescentes e jovens adultos, mas pode, esporadicamente, ocorrer em adultos com mais de 30 ou 40 anos. A incidência entre gêneros tende a ser equilibrada principalmente, entre os adolescentes [31-37].

Essa forma clínica evolui rapidamente e ocorre disseminação para múltiplos órgãos e sistemas e, em geral, os pacientes são diagnosticados dentro de algumas semanas desde a apresentação de sintomas. A maioria deles envolvem o sistema fagocítico-mononuclear incluindo a presença de linfadenomegalia, o que pode apresentar supuração, fistulização e hepatoesplenomegalia. Febre, perda de peso, anorexia podem acompanhar o quadro clínico e sintomas como manifestações digestivas, lesões cutâneas, envolvimento osteoarticular, e, envolvimento pulmonar também podem ocorrer raramente [35]. Um dado laboratorial importante é a identificação de que ocorre em 30 a 50% dos pacientes, a eosinofilia periférica e, às vezes pode ser tão significativa, chegando a 70% dos

leucócitos periféricos do sangue do indivíduo [33, 34, 38].

A segunda forma clínica da PCM doença é a forma crônica ou adulta, sendo que a maioria dos casos (74-96%) se apresentam dessa forma. Tipicamente, acomete adultos do sexo masculino (proporção de homens/mulheres afetados 22:1) com idade entre 30 e 60 anos. A PCM crônica tem desenvolvimento lento, podendo ficar anos sem manifestação de sinais clínicos, e muitas vezes, o paciente só é diagnosticado em exames rotineiros de trabalho. Em 90% dos pacientes observa-se acometimento de tecido pulmonar [35]. Depois dos pulmões, os órgãos mais afetados pela forma crônica são as mucosas da via aérea e digestiva e, também, a pele [34].

Dependendo do equilíbrio entre a resposta do hospedeiro, parasita e ambiente, o fungo pode ficar latente por muitos anos, ocasionalmente, pela vida toda. Porém, depois de um longo tempo, qualquer desequilíbrio entre esses fatores pode causar a reativação de fungos latentes, o que acaba desencadeando a doença. Devido ao grande número de pacientes que continuam exercendo as atividades agrícolas mantendo-se em constante contato com o solo após a exposição inicial é difícil de avaliar a contribuição que uma nova reinfecção pode exercer no desenvolvimento da doença nessa população [3].

A predominância de indivíduos do sexo masculino afetados em relação aos do sexo feminino, dá-se devido ao papel protetor do hormônio feminino estrógeno, que inibe ou prejudica a transformação da forma infectante (esporos ou conídios) para a forma patogênica (levedura), que

ocorre no pulmão devido à alteração de temperatura [24, 39, 40]. Dada essa predominância de casos ocorrendo em indivíduos do sexo masculino que trabalham em atividades rurais e agrícolas acometidos com a PCM, a ocupação também pode ser um fator que contribua para a baixa incidência em mulheres [41].

A forma crônica pode ser leve, moderada ou severa [23]. Os casos severos são definidos na presença de três ou mais desses critérios descritos: perda de peso acima de 10% do peso normal; envolvimento pulmonar intenso; envolvimento de outros órgãos tais como glândulas adrenais, sistema nervoso e ossos; presença de linfonodos afetados em cadeia tanto superficiais ou profundos com forma pseudotumoral ou supurativa; altos níveis de titulação de anticorpos. Também, os pacientes que possuem a forma mais severa da doença apresentam instabilidade clínica devido à insuficiência pulmonar, disfunção adrenal, síndrome neurológica ou abdominal aguda, e imunossupressão [1]. Às vezes, pacientes manifestam sinais clínicos tanto da forma aguda/subaguda e da forma crônica, dificultando a classificação exata da doença. Esses indivíduos apresentam também intensa supressão da imunidade celular e podem ser classificados como portadores da PCM mista [42].

A PCM também pode se apresentar na forma residual, que são manifestações clínicas que provocam mudanças anatômicas e funcionais após o tratamento. As sequelas são observadas em diversos órgãos, mas aparece com maior incidência nos pulmões, pele, laringe, traqueia, glândulas adrenais, mucosas do trato aero digestivo superior e sistema

nervoso central [43-45].

O diagnóstico da PCM é baseado na identificação do *Paracoccidioides* em amostras clínicas a partir de análises histopatológicas. O fungo é visualizado em microscopia ótica simples, onde sua morfologia e sua reprodução por brotamento exógeno múltiplo, típico da forma parasítica do fungo, permite sua identificação [46]. Testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-*P. brasiliensis* (anti- Gp43) são úteis para o diagnóstico da PCM e representa indicadores de severidade, e, também critérios para monitoramento a resposta ao tratamento [47].

A glicoproteína gp43 (peso molecular 43kDa) é considerada o antígeno imunodominante do *Paracoccidioides brasiliensis* e os pacientes afetados pela paracoccidioidomicose apresentam altos índices de anticorpos anti-gp43 o que diminui, na maioria dos casos, com a progressão do tratamento da doença [30, 48]. Batista Jr. *et al.* [35] testou por testes de imunodifusão que diferentes espécies de *Paracoccidioides* isoladas de diferentes regiões mostram diferenças em seus resultados sorológicos, produzindo uma alta frequência de resultados falso-negativos nesses testes. Há várias explicações para essa inexatidão, porém o preparado de cultura fúngica que é rico em gp43, apresenta uma alta variabilidade em sua produção dependendo da cepa/genótipo de *Paracoccidioides* utilizada [36, 37].

Um estudo feito por Machado *et al.* [49] avaliou 5 isolados de *Paracoccidioides* spp., sendo 1 da espécie S1 (*P. brasiliensis*) proveniente de Botucatu, 1 da espécie PS3 (*P. restrepiensis*) da Colômbia e 3 da

espécie *P. lutzii* provenientes da região de Goiás. Como diferentes espécies produzem diferentes antígenos pela região da gp43 e, sendo o anticorpo pesquisado por testes sorológicos usados atualmente, essa provavelmente deva ser a causa de resultados falso-negativos, já que o antígeno utilizado nos testes sorológicos possa não ser reconhecido pelo anticorpo produzido *in vivo* contra uma diferente espécie. Machado *et al.* [49] confirmaram a dificuldade de estabelecimento de um teste de pesquisa de anticorpos padronizado em um país tão grande como o Brasil, devido à alta taxa de mutação comparada entre os isolados de *Paracoccidioides*, somadas a menor produção e maior variabilidade dessa glicoproteína no *P. lutzii*. Porém, a especiação não é o único evento que explica a variabilidade da gp43, há também variações da região promotora do gene da gp43, interferência de processos pós-transcricionais com splicing alternativo e silenciamento por RNA de interferência [49], que acabam contribuindo para essa problemática.

Em outra pesquisa, Carvalho *et al.* [50] observaram que a subespécie PS2 (*P. americana*) mostrou baixa virulência quando inoculada em camundongos B10-A por vias intraperitoneal, intratraqueal e intravenosa, o que pode indicar uma relação com a regulação da gp43 observada em Pb03 (isolado de PS2); e que não foi observada em Pb18 ou Pb339 (isolado de S1), resultante de um choque térmico de calor à 42°C e uma alteração de temperatura para promover a transição de micélio para levedura.

Diferentemente, de outros fungos patogênicos, o *P. brasiliensis* e o *P. lutzii* são susceptíveis a maioria dos agentes antifúngicos, até mesmo,

derivados da sulfonamida podem impedir seu crescimento. Apesar do fungo apresentar resistências primária e secundária a medicamentos, várias drogas antifúngicas já se mostraram efetivas no seu tratamento, como derivados azólicos (cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol) [51-56], derivados sulfonamidicos (cotrimoxazol e sulfametoxazol), e anfotericina B para formas severas [57].

A predisposição racial ao desenvolvimento da PCM também não foi esclarecida ainda. No entanto, uma análise da micose em população miscigenada, realizada no sudeste do Brasil revelou que 84,4% dos pacientes acometidos com a forma crônica são brancos, e mais frequentemente, a população de negros e pardos apresentam lesões mais disseminadas na forma aguda do que indivíduos brancos [4]. A associação dos sinais clínicos e sintomas da micose com etnia pode ser devido à variação de constituição genética e possivelmente, discrepâncias de condições de moradia, e, também tipo de resposta imune [4, 58, 59].

Bellissimo-Rodrigues *et al* [13] também observaram uma predominância de pacientes brancos (79%) em seu estudo epidemiológico retrospectivo (1960-1999) dentro da amostragem de 1000 casos analisados provenientes de Ribeirão Preto, no sudoeste do Brasil. Os autores discutem que a origem étnica parece não estar associada à PCM, porque a distribuição de pacientes é comparável à população da área de Ribeirão Preto em relação à cor da pele.

A paracoccidiodomicose é uma doença com um impacto social profundo já que, como discutido, afeta em sua grande maioria, homens

trabalhadores rurais em idade produtiva (30-50 anos de idade) impedindo-os de retornar às suas funções remuneradas [34, 42, 60].

Apesar de acometer indivíduos envolvidos em atividade do agronegócio, que é a base da economia brasileira, a PCM ainda é uma doença negligenciada devido às seguintes características: ocorre em ambientes rurais; atinge desproporcionalmente uma população de baixa renda; perpetua o círculo vicioso da doença entre pobreza e assistência médica inadequada; não tem atenção de países desenvolvidos; está fora do alcance do Fundo Global e seus programas relacionados; promove a pobreza ao causar sequelas, o que provoca intenso impacto na produtividade do indivíduo e na sua qualidade de vida; geralmente deixa o indivíduo debilitado ou leva a óbito; envolve pacientes que não possuem condições econômicas de obter os medicamentos indicados; e, finalmente, esses indivíduos afetados, tipicamente, demoram para procurar assistência médica o que ocorre quando a doença está em estágio muito avançado [34, 38, 61].

O caráter casual e não repetitivo das observações, aliado às dificuldades de isolamento ambiental, dificultam a exata localização deste patógeno no ambiente. Além disso, a falta de surtos epidêmicos, o prolongado período de latência da doença e frequentes migrações das populações de áreas endêmicas, impossibilitam a identificação dos locais onde as infecções foram adquiridas [34, 60, 62].

Existe um “certo consenso”, baseado, também, em outras micoses sistêmicas provocadas por fungos termodimórficos relacionados, em que o

pulmão é o órgão mais afetado, de que os fungos do gênero *Paracoccidioides* vivam saprobioticamente no solo e/ou vegetais, produzindo estruturas assexuadas na forma de conídios [63], os quais seriam as responsáveis pela infecção principalmente pelo trato respiratório [64].

Assim, o solo é o habitat mais provável do fungo como sugerido por alguns isolados ambientais na Argentina, Venezuela e Brasil [18, 32, 65-68]. Animais domésticos e selvagens podem fornecer marcadores epidemiológicos valiosos para a paracoccidioidomicose e pode contribuir com pesquisas sobre o habitat dos fungos *Paracoccidioides* sp. [18, 33, 67, 68].

Os fungos do gênero *Paracoccidioides* spp. foram isolados de algumas espécies animais, tais como o morcego, o tatu, o cachorro e o gato [19, 67, 69, 70]. A infecção por esses agentes etiológicos também foi avaliada por testes sorológicos em animais domésticos e selvagens como em cachorros, bovinos, ovelhas, cavalos, galinhas, tatus e macacos [33, 71-78], e, também foi detectado por PCR Nested em várias espécies animais [79, 80].

O tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*) é considerado um reservatório natural do *P. brasiliensis* [67, 81-84]. Aparentemente, tatus podem ser infectados com diferentes genótipos de *Paracoccidioides* spp, isolados de diferentes órgãos e apresentando diferentes graus de virulência. No entanto, informações quanto aos polimorfismos genéticos foram restritos, até agora, a amostras de isolados de alguns animais [85, 86]. Linhagens de

Paracoccidioides spp, com morfologia típica foram isolados de baço, fígado e linfonodos mesentéricos de dez tatus capturados nas cidades de Botucatu, Pratânea e Manduri [18, 87], onde a paracoccidioidomicose é endêmica [88]. Foi identificado que esses isolados foram capazes de causar infecção em diferentes graus de virulência em hamsters [87].

Assim, todos os membros da família Ajellomycetaceae, a qual inclui o nosso fungo em questão, e as espécies *Blastomyces dermatitidis* (forma teleomórfica é o *Ajellomyces dermatitidis*), *Histoplasma capsulatum* (forma teleomórfica é o *Ajellomyces capsulatus*), *Emmonsia parva* e o *E. crescens* (forma teleomórfica é o *Ajellomyces crescens*), devem ter evoluído em associação com os hospedeiros vertebrados, apresentando uma fase saprofítica no solo ou em fezes e uma fase parasítica no tecido do hospedeiro [68, 89, 90].

A composição genética do *Paracoccidioides* começou a ser estudada a partir de alguns estudos de isolamento e caracterização de mutantes. A natureza multinucleada dos fungos, mesmo dos unicelulares, a forma de levedura, que é a forma patogênica, foi apontada como a razão pela instabilidade fenotípica e o elevado número das mutações convertidas em mutantes *in vitro* [64, 91].

Com o desenvolvimento da eletroforese de campo pulsado (PFGE), foi possível a caracterização genômica, o mapeamento de genes e a biotipagem epidemiológica molecular de linhagens de microrganismos refratários à análise genética [92-95].

Montoya *et al.* e Cano *et al.* [96, 97] estudaram dez isolados, sendo

dois isolados clínicos, que apresentavam as condições de separação das moléculas de DNA de tamanho cromossômico do *Paracoccidioides*, utilizando técnica da eletroforese de campo pulsado. Montoya *et al.* [96], em análise posterior, avaliando a tipagem cariotípica de cinco isolados ambientais, observaram um discreto polimorfismo quando comparado aos isolados clínicos. Os isolados ambientais se pareciam muito aos isolados clínicos, que exibiam cinco bandas de DNA cromossômico idênticos, sendo que, foram diferenciados apenas por uma pequena alteração na mobilidade de duas bandas. Duas sondas foram mapeadas em *chromo-blots* e concluiu-se que seria muito difícil correlacionar moléculas de DNA cromossômico e perfis cariotípicos de diferentes isolados de *Paracoccidioides* sem fazer a sondagem com um painel de sequências e genes específicos [97].

Outro estudo, publicado antes da descoberta das espécies do gênero *Paracoccidioides*, que usaram marcadores moleculares RAPD, já havia separado um grupo de isolados da região centro-oeste do Brasil do resto dos isolados de *P. brasiliensis*. Esses isolados eram mais suscetíveis *in vitro* ao sulfametoxazol e a trimetoprima, e, também produziram uma melhor resposta *in vivo* do que os isolados de outras regiões [98].

Assim, até 2006, acreditava-se que o gênero *Paracoccidioides* incluía apenas uma espécie, o *Paracoccidioides brasiliensis*, como o agente etiológico da paracoccidioidomicose. Nesse ano, Matute *et al.* [10] descreveram a especiação críptica do *P. brasiliensis*, por meio da análise de genealogia de *multilocus* demonstrando que a variabilidade genética do

P. brasiliensis pode ir além de um simples polimorfismo intraespecífico, caracterizando então, a presença das espécies crípticas [10], ou seja, espécies em divergência cujos caracteres fenotípicos até então conhecidos não eram suficientes para distingui-las. Por intermédio da análise por concordância de genealogia de genes foi possível detectar essas três espécies crípticas: S1, PS2, PS3 e, posteriormente o PS4 [99]. Em 2009, Teixeira *et al.* [100], a partir de análises filogenéticas de multilocus, demonstraram a existência de um grupo geneticamente bastante divergente de isolados de *P. brasiliensis* do complexo S1, PS2 e PS3, o Pb01-like, proveniente da região centro-oeste do Brasil que constitui na verdade uma quarta espécie críptica, o *Paracoccidioides lutzii*.

Definir os limites das espécies é bem difícil em fungos. Várias abordagens foram propostas usando parâmetros como características morfológicas isolamento reprodutivo [101-104] ou divergência genética [105-108]. Atualmente, a união de dados obtidos por testes moleculares com caracterização morfológica e análises de genética de populações pode revelar as discontinuidades genéticas. Por exemplo, as espécies que diferem morfológicamente são mais prováveis de terem completado o processo de especiação do que as espécies idênticas [31, 109, 110].

Portanto, nessa abordagem integrada, a estrutura filogenética revela a existência de grupos potencialmente isolados. As diferenças fenotípicas entre as espécies podem depois ser incorporados na descrição taxonômica. As análises de genética de populações determinam se as espécies crípticas tiveram a oportunidade de se reproduzirem com outras, trocar genes e,

possivelmente, até fundirem-se em uma única linhagem. Isso pode esclarecer as etapas nas quais as espécies divergem e descobrir a dinâmica evolucionária do desenvolvimento morfológico [111].

Assim, em 2017, Turissini e colaboradores [112] indicaram que as quatro espécies de *Paracoccidioides* raramente trocam genes mesmo sendo altamente simpátricos e, portanto, tendo menor chance de gerar híbridos. Também demonstraram que o *Paracoccidioides* não é totalmente clonal e as espécies podem trocar alelos, porém raramente o fazem. Finalmente, apresentam que as quatro espécies do complexo diferem na forma de levedura e que cada uma das espécies pode ser identificada molecularmente e morfológicamente. Portanto, Turissini *et al.* [112] propuseram o reconhecimento taxonômico das quatro espécies de *Paracoccidioides*: *Paracoccidioides brasiliensis* para o S1, *Paracoccidioides americana* para o PS2, *Paracoccidioides restrepiensis* para o PS3 e *Paracoccidioides venezuelensis* para o PS4.

S1 (*P. brasiliensis*) é a espécie disseminada mais amplamente no Brasil, na Argentina, no Paraguai, no Uruguai, no Peru e na Venezuela. O PS2 (*P. americana*) ocorre no Brasil e na Venezuela em simpatria com o S1, enquanto o PS3 (*P. restrepiensis*) é restrito à Colômbia e o PS4 (*P. venezuelensis*) à Venezuela [99, 112-115]. O *P. lutzii*, ocorre predominantemente, porém não exclusivamente, na região centro-oeste do Brasil [100].

Mesmo que não haja acordo se o S1, o PS2, o PS3 e o PS4 são variantes geográficas de uma só espécie [116] ou espécies distintamente

separadas [10], essas subespécies e o *P. lutzii* são reprodutivamente isoladas, como já discutido acima [10, 100]. O isolamento reprodutivo e genético é o primeiro passo na divergência das espécies [111], isso pode levar a diferenças morfológicas e fisiológicas, com consequências importantes para o diagnóstico e tratamento da paracoccidioidomicose.

Com a constatação por métodos moleculares da existência de espécies simpátricas de *Paracoccidioides*, tornam-se necessárias análises de amostras de pacientes, para um melhor entendimento a respeito da distribuição e ocorrência dessas espécies em nossa região e uma possível correlação entre grupo genético e características micológicas e clínicas, sendo a genotipagem de amostras clínicas do gênero *Paracoccidioides* sp. uma importante contribuição para estudos epidemiológicos e clínicos da paracoccidioidomicose. A região de Botucatu, onde se localiza a Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB/UNESP) é considerada uma área endêmica recebendo cerca de 15 novos casos por ano só no Serviço de Moléstias Infecciosas da FMB [47].

Dessa forma, com todo conhecimento acumulado até agora, torna-se extremamente interessante a avaliação das diferentes espécies, nas diferentes amostras coletadas de pacientes provenientes de diferentes áreas, e que foram atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

2. REFERÊNCIAS

1. Shikanai-Yasuda, M.A., et al., *Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis*. Rev Soc Bras Med Trop, 2017: p. 0.
2. Ramos, E.S.M. and E. Saraiva Ldo, *Paracoccidioidomycosis*. Dermatol Clin, 2008. **26**(2): p. 257-69, vii.
3. Franco, M., et al., *Chlamydospore formation by Paracoccidioides brasiliensis mycelial form*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 1989. **31**(3): p. 151-7.
4. Blotta, M.H., et al., *Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region*. Am J Trop Med Hyg, 1999. **61**(3): p. 390-4.
5. Restrepo, A., *Paracoccidioidomycosis*
in *Clinical mycology*, W.E. Dismukes, P.G. Pappas, and J.D. Sobel, Editors. 2003, Oxford University Press: Oxford. p. 328-345.
6. Restrepo, A., A. Gonzalez, and C.A. Agudelo, *Paracoccidioidomycosis*, in *Essentials of Clinical Mycology*, C.A. Kauffman, et al., Editors. 2011, Springer New York: New York, NY. p. 367-385.
7. Van Damme, P.A., et al., *A case of imported paracoccidioidomycosis: an awkward infection in The Netherlands*. Med Mycol, 2006. **44**(1): p. 13-8.

8. Bousquet, A., et al., *[Imported mycosis: a review of paracoccidioidomycosis]*. Med Mal Infect, 2007. **37 Suppl 3**: p. S210-4.
9. Mayayo, E., et al., *Report of an imported cutaneous disseminated case of paracoccidioidomycosis*. Rev Iberoam Micol, 2007. **24**(1): p. 44-6.
10. Matute, D.R., et al., *Cryptic speciation and recombination in the fungus Paracoccidioides brasiliensis as revealed by gene genealogies*. Mol Biol Evol, 2006. **23**(1): p. 65-73.
11. LACAZ, C.S., et al., *Tratado de Micologia médica*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 2002. **44**: p. 297-298.
12. Colombo, A.L., et al., *Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America*. Med Mycol, 2011. **49**(8): p. 785-98.
13. Bellissimo-Rodrigues, F., A.A. Machado, and R. Martinez, *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): p. 546-550.
14. Andrade, A.L.S.S.d., *Paracoccidioidomicose linfático-abdominal- Contribuição ao seu estudo*. Rev. patol. trop, 1983. **12**(2): p. 165-256.
15. Lazo, R., T. Fernández, and R. Mera, *Prevalencia de la paracoccidioidomicosis e histoplasmosis en la cuenca del Rio Guayas*. Rev Ecuat Hyg Med Trop, 1987. **37**: p. 15-35.

16. Carvalho, F., et al., *Polymorphisms on IFNG, IL12B and IL12RB1 genes and paracoccidioidomycosis in the Brazilian population.* Infection, Genetics and Evolution, 2016. **43**: p. 245-251.
17. Martinez, R., *Epidemiology of paracoccidioidomycosis.* Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 2015. **57**: p. 11-20.
18. Bagagli, E., et al., *High frequency of Paracoccidioides brasiliensis infection in armadillos (Dasypus novemcinctus): an ecological study.* Medical mycology, 2003. **41**(3): p. 217-223.
19. Corredor, G.G., et al., *Isolation of Paracoccidioides brasiliensis from the nine-banded armadillo Dasypus novemcinctus, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Columbia.* Revista Iberoamericana De Micologia, 1999. **16**(4): p. 216-220.
20. Severo, L., et al., *The primary pulmonary lymph node complex in paracoccidioidomycosis.* Mycopathologia, 1979. **67**(2): p. 115-118.
21. SINGER-VERMFS, L., et al., *Pathogenicity and immunogenicity of Paracoccidioides brasiliensis isolates in the human disease and in an experimental murine model.* Clinical & Experimental Immunology, 1994. **97**(1): p. 113-119.
22. Buccheri, R., et al., *Incubation period and early natural history events of the acute form of paracoccidioidomycosis: lessons from patients with a single Paracoccidioides spp. Exposure.* Mycopathologia, 2016. **181**(5-6): p. 435-439.

23. Franco, M., et al., *Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 1987. **20**(2): p. 129-132.
24. Bellissimo-Rodrigues, F., et al., *Endemic paracoccidioidomycosis: relationship between clinical presentation and patients' demographic features*. Medical Mycology, 2013. **51**(3): p. 313-318.
25. Fava, S.D.C. and C. Fava Netto, *Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidioidin sensitivity in Brazil*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 1998. **40**(3): p. 155-164.
26. Pereira, A. and W. Barbosa, *Inquérito intradérmico para paracoccidioidomicose em Goiânia*. Rev Pat trop, 1988. **17**: p. 157-186.
27. Kalmar, E., et al., *Paracoccidioidomycosis: an epidemiologic survey in a pediatric population from the Brazilian Amazon using skin tests*. The American journal of tropical medicine and hygiene, 2004. **71**(1): p. 82-86.
28. Marques, A.P.d.C., et al., *Evaluation of Paracoccidioides brasiliensis infection by gp 43 intradermal test in rural settlements in Central-West Brazil*. Mycopathologia, 2013. **176**(1-2): p. 41-47.
29. Martinez, R. and M.J. Moya, *Complexo primário da paracoccidioidomicose e hipereosinofilia*. Jornal Brasileiro de Pneumologia, 2009. **35**(12).

30. Mendes-Giannini, M.J.S., et al., *Binding of extracellular matrix proteins to Paracoccidioides brasiliensis*. Microbes and infection, 2006. **8**(6): p. 1550-1559.
31. Restrepo, A., A.M. Tobon, and L.E. Cano, *Paracoccidioidomycosis*, in *Principles and practice of infectious diseases*, R. Dolin, J.E. Bennett, and M.J. Blaser, Editors. 2014, Elsevier: Philadelphia. p. 2995-3002.
32. Silva-Vergara, M.L., et al., *Isolation of a Paracoccidioides brasiliensis strain from the soil of a coffee plantation in Ibia, State of Minas Gerais, Brazil*. Med Mycol, 1998. **36**(1): p. 37-42.
33. Oliveira, G.G., et al., *Serological Evidence of Paracoccidioides brasiliensis Infection in Chickens from Paraná and Mato Grosso do Sul States, Brazil*. Mycopathologia, 2011. **171**(3): p. 197-202.
34. Arantes, T.D., et al., *Detection of Paracoccidioides spp. in environmental aerosol samples*. Med Mycol, 2013. **51**(1): p. 83-92.
35. Batista Jr, J., et al., *Is the geographical origin of a Paracoccidioides brasiliensis isolate important for antigen production for regional diagnosis of paracoccidioidomycosis?* Mycoses, 2010. **53**(2): p. 176-180.
36. Casotto, M., S. Paris, and Z. Camargo, *Antigens of diagnostic value in three isolates of Paracoccidioides brasiliensis*. Journal of medical and veterinary mycology, 1991. **29**(4): p. 243-253.

37. Moura Campos, M., et al., *Expression and isoforms of gp43 in different strains of Paracoccidioides brasiliensis*. Journal of medical and veterinary mycology, 1995. **33**(4): p. 223-227.
38. Mendes, R., *Paracoccidioidomycosis surveillance and control*. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 2010. **16**: p. 194-197.
39. Fabris, L.R., 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): p. 121-125.
40. Barbosa, W., R. Daher, and A.d. Oliveira, *Forma linfático-abdominal da blastomicose sul-americana*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 1968. **10**: p. 16-27.
41. Restrepo, A., et al., *Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus Paracoccidioides brasiliensis: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis*. Infect Immun, 1984. **46**(2): p. 346-53.
42. Shikanai-Yasuda, M.A., et al., *Consenso em paracoccidioidomicose*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2006. **39**: p. 297-310.
43. Ferreira, M.S., *Paracoccidioidomycosis*. Paediatr Respir Rev, 2009. **10**(4): p. 161-5.

44. Mendes, R.P., *The gamut of clinical manifestations*, in *Paracoccidioidomycosis*, M. Franco, et al., Editors. 1994, Boca Raton: CRC Press: Boca Raton, Florida. p. 410.
45. Costa, A.N., et al., *The lung in paracoccidioidomycosis: new insights into old problems*. Clinics, 2013. **68**(4): p. 441-448.
46. FRANCO, M., C.d.S. LACAZ, and A. RESTREPO-MORENO, *Paracoccidioidomycosis*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 1994. **36**: p. 58-58.
47. Mendes, R.P., et al., *Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil*. The Open Microbiology Journal, 2017. **11**(1): p. 224-282.
48. Blotta, M. and Z. Camargo, *Immunological response to cell-free antigens of Paracoccidioides brasiliensis: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis*. Journal of clinical microbiology, 1993. **31**(3): p. 671-676.
49. Machado, G.C., et al., *Cryptic species of Paracoccidioides brasiliensis: impact on paracoccidioidomycosis immunodiagnosis*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2013. **108**(5): p. 637-643.
50. Carvalho, K.C., et al., *Virulence of Paracoccidioides brasiliensis and gp43 expression in isolates bearing known PbGP43 genotype*. Microbes and infection, 2005. **7**(1): p. 55-65.
51. Restrepo, A., et al., *Ketoconazole: a new drug for the treatment of paracoccidioidomycosis*. Reviews of infectious diseases, 1980. **2**(4): p. 633-642.

52. Shikanai-Yasuda, M., et al., *Randomized trial with itraconazole, ketoconazole and sulfadiazine in paracoccidioidomycosis*. Medical mycology, 2002. **40**(4): p. 411-417.
53. Diaz, M., et al., *A Pan-American 5-year study of fluconazole therapy for deep mycoses in the immunocompetent host*. Clinical infectious diseases, 1992. **14**(Supplement_1): p. S68-S76.
54. Naranjo, M., et al., *Treatment of paracoccidioidomycosis with itraconazole*. Journal of Medical and Veterinary Mycology, 1990. **28**(1): p. 67-76.
55. Telles, F.Q., et al., *An open-label comparative pilot study of oral voriconazole and itraconazole for long-term treatment of paracoccidioidomycosis*. Clinical infectious diseases, 2007. **45**(11): p. 1462-1469.
56. Thompson, G.R., et al., *Isavuconazole treatment of cryptococcosis and dimorphic mycoses*. Reviews of Infectious Diseases, 2016. **63**(3): p. 356-362.
57. Peçanha, P.M., et al., *Amphotericin B lipid complex in the treatment of severe paracoccidioidomycosis: a case series*. International journal of antimicrobial agents, 2016. **48**(4): p. 428-430.
58. Castro, R.M. and G. Del Negro, *[Clinical characteristics of paracoccidioidomycosis in children]*. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo, 1976. **31**(3): p. 194-8.

59. Aristizabal, B.H., et al., *Morphological transition of Paracoccidioides brasiliensis conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females*. Infect Immun, 1998. **66**(11): p. 5587-91.
60. Arantes, T.D., et al., *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): p. e0004606.
61. LaBeaud, A.D., *Why arboviruses can be neglected tropical diseases*. PLoS neglected tropical diseases, 2008. **2**(6): p. e247.
62. Restrepo M, A., *The ecology of Paracoccidioides brasiliensis: a puzzle still unsolved*. Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology, 1985. **23**(5): p. 323-334.
63. Bustamante-simon, B., et al., *Characteristics of the conidia produced by the mycelial form of Paracoccidioides brasiliensis*. Sabouraudia, 1985. **23**(6): p. 407-414.
64. McEwen, J.G., et al., *Nuclear staining of Paracoccidioides brasiliensis conidia*. Journal of medical and veterinary mycology, 1987. **25**(5): p. 343-345.
65. Negroni, P., *The Paracoccidioides brasiliensis lives saprophytically in the soil of Argentina*. Prensa medica argentina, 1966. **53**(39): p. 2381-2382.
66. de Albornoz, M.B., *Isolation of Paracoccidioides brasiliensis from rural soil in Venezuela*. Sabouraudia, 1971. **9**(3): p. 248-253.

67. Bagagli, E., et al., *Isolation of Paracoccidioides brasiliensis from armadillos (Dasypus noveminctus) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis*. Am J Trop Med Hyg, 1998. **58**(4): p. 505-12.
68. 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, 2006. **6**(5): p. 344-351.
69. Gonzalez, J.F., N.A. Montiel, and R.L. Maass, *First report on the diagnosis and treatment of encephalic and urinary paracoccidioidomycosis in a cat*. Journal of feline medicine and surgery, 2010. **12**(8): p. 659-662.
70. De Farias, M.R., et al., *Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly*. Mycopathologia, 2011. **172**(2): p. 147-152.
71. Ono, M.A., et al., *Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study*. Medical mycology, 2001. **39**(3): p. 277-282.
72. Fernandes, G.F., et al., *IgM and IgG antibody response to Paracoccidioides brasiliensis in naturally infected wild armadillos (Dasypus novemcinctus)*. Sabouraudia, 2004. **42**(4): p. 363-368.
73. Silveira, L.H., et al., *Serological detection of antibodies against Paracoccidioides brasiliensis in dogs with leishmaniasis*. Mycopathologia, 2006. **162**(5): p. 325-329.

74. Corte, A.C., et al., *Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Paraná State, Brazil*. Mycopathologia, 2007. **164**(5): p. 225-228.
75. Corte, A.C., et al., *Detection of antibodies to Paracoccidioides brasiliensis in horses from northern Region of Paraná State*. Semina: Ciências Agrárias, 2009. **30**(2): p. 441-446.
76. Silveira, L., et al., *Occurrence of antibodies to Paracoccidioides brasiliensis in dairy cattle from Mato Grosso do Sul, Brazil*. Mycopathologia, 2008. **165**(6): p. 367-371.
77. Fontana, F.F., et al., *Seroepidemiological survey of paracoccidioidomycosis infection among urban and rural dogs from Uberaba, Minas Gerais, Brazil*. Mycopathologia, 2010. **169**(3): p. 159-165.
78. de Oliveira, G.G., et al., *Serological survey of paracoccidioidomycosis in cats*. Mycopathologia, 2013. **176**(3-4): p. 299-302.
79. Richini-Pereira, V.B., et al., *Molecular detection of Paracoccidioides brasiliensis in road-killed wild animals*. Medical mycology, 2008. **46**(1): p. 35-40.
80. Mendes, G., et al., *Antifungal activity of extracts from Atacama Desert fungi against Paracoccidioides brasiliensis and identification of Aspergillus felis as a promising source of natural bioactive compounds*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2016. **111**: p. 209-217.

81. Naiff, R.D., et al., *Paracoccidioidomicose enzoótica em tatus (Dasypus novemcinctus) no estado do Pará*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 1986. **28**(1): p. 19-27.
82. Cisalpino, P.S., et al., *Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of Paracoccidioides brasiliensis*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(8): p. 4553-4560.
83. Restrepo, A., J.G. McEwen, and E. Castaneda, *The habitat of Paracoccidioides brasiliensis: how far from solving the riddle?* Med Mycol, 2001. **39**(3): p. 233-41.
84. Silva-Vergara, M., et al., *Isolation of Paracoccidioides brasiliensis from armadillos (Dasypus novemcinctus) in an area where the fungus was recently isolated from soil*. Medical mycology, 2000. **38**(3): p. 193-199.
85. Sano, A., *Pathogenicities and GP43kDa gene of three Paracoccidioides brasiliensis isolates originated from a nine-banded armadillo Dasypus novemcinctus*. Mycopathologia, 1998. **144**(2): p. 61-66.
86. Sano, A., et al., *Comparison between human and armadillo Paracoccidioides brasiliensis isolates by random amplified polymorphic DNA analysis*. Mycopathologia, 1998. **143**(3): p. 165-169.
87. Hebeler-Barbosa, F., et al., *Comparison of the sequences of the internal transcribed spacer regions and PbGP43 genes of*

- Paracoccidioides brasiliensis* from patients and armadillos (*Dasypus novemcinctus*). Journal of clinical microbiology, 2003. **41**(12): p. 5735-5737.
88. Marques, S., M. Franco, and R. Mendes, *Aspectos epidemiológicos da paracoccidioidomicose na área endêmica de Botucatu (São Paulo-Brasil)*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 1983: p. 87-92.
 89. Herr, R.A., et al., *Phylogenetic Analysis of Lacazia loboi Places This Previously Uncharacterized Pathogen within the Dimorphic Onygenales*. Journal of Clinical Microbiology, 2001. **39**(1): p. 309-314.
 90. Untereiner, W.A., et al., *The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales*. Mycologia, 2004. **96**(4): p. 812-821.
 91. Hallak, J., F. San-Blas, and G. San-Blas, *Isolation and wall analysis of dimorphic mutants of Paracoccidioides brasiliensis*. Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology, 1982. **20**(1): p. 51-62.
 92. Perfect, J.R., B. Magee, and P. Magee, *Separation of chromosomes of Cryptococcus neoformans by pulsed field gel electrophoresis*. Infection and immunity, 1989. **57**(9): p. 2624-2627.
 93. Steele, P., et al., *Electrophoretic analysis of Histoplasma capsulatum chromosomal DNA*. Molecular and cellular biology, 1989. **9**(3): p. 983-987.

94. Pan, S. and G.T. Cole, *Electrophoretic karyotypes of clinical isolates of Coccidioides immitis*. Infection and immunity, 1992. **60**(11): p. 4872-4880.
95. Altboum, Z., *Genetic studies in Candida albicans*, in *Pathogenic Yeasts and Yeast Infections*. 1994, CRC Press Boca Raton, FL. p. 33-48.
96. Montoya, A.E., et al., *Electrophoretic Karyotype of Clinical Isolates of Paracoccidioides brasiliensis*. Fungal Genetics and Biology, 1997. **21**(2): p. 223-227.
97. Cano, M.I.N., et al., *Electrophoretic karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus Paracoccidioides brasiliensis*. Journal of clinical microbiology, 1998. **36**(3): p. 742-747.
98. Hahn, R.C., et al., *Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and in vitro resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole*. Mycoses, 2003. **46**(8): p. 324-329.
99. Teixeira, M.M., et al., *Paracoccidioides species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence*. PLoS Pathog, 2014. **10**(10): p. e1004397.
100. Teixeira, M.M., et al., *Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the Paracoccidioides genus*. Mol Phylogenet Evol, 2009. **52**(2): p. 273-83.
101. Ajello, L. and S.-L. Cheng, *Sexual reproduction in Histoplasma capsulatum*. Mycologia, 1967. **59**(4): p. 689-697.

102. Naumov, G., *Genetic identification of biological species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1996. **17**(3): p. 295-302.
103. Bao, D., S. Kinugasa, and Y. Kitamoto, *The biological species of oyster mushrooms (*Pleurotus spp.*) from Asia based on mating compatibility tests*. Journal of wood science, 2004. **50**(2): p. 162-168.
104. Liti, G., D.B. Barton, and E.J. Louis, *Sequence diversity, reproductive isolation and species concepts in *Saccharomyces**. Genetics, 2006. **174**(2): p. 839-850.
105. Burt, A., et al., *Molecular markers reveal differentiation among isolates of *Coccidioides immitis* from California, Arizona and Texas*. Molecular Ecology, 1997. **6**(8): p. 781-786.
106. Dettman, J.R., D.J. Jacobson, and J.W. Taylor, *A multilocus genealogical approach to phylogenetic species recognition in the model eukaryote *Neurospora**. Evolution, 2003. **57**(12): p. 2703-2720.
107. Dettman, J.R., et al., *Reproductive isolation and phylogenetic divergence in *Neurospora*: comparing methods of species recognition in a model eukaryote*. Evolution, 2003. **57**(12): p. 2721-2741.
108. Hughes, K.W., R.H. Petersen, and E.B. Lickey, *Using heterozygosity to estimate a percentage DNA sequence similarity for environmental species' delimitation across basidiomycete fungi*. New Phytologist, 2009. **182**(4): p. 795-798.

109. Taylor, J.W., et al., *Eukaryotic microbes, species recognition and the geographic limits of species: examples from the kingdom Fungi*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 2006. **361**(1475): p. 1947-1963.
110. Uyeda, J.C., et al., *The million-year wait for macroevolutionary bursts*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(38): p. 15908-15913.
111. Taylor, J.W., et al., *Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi*. Fungal genetics and biology, 2000. **31**(1): p. 21-32.
112. Turissini, D.A., et al., *Species boundaries in the human pathogen Paracoccidioides*. Fungal Genet Biol, 2017. **106**: p. 9-25.
113. Marques-da-Silva, S.H., et al., *Occurrence of Paracoccidioides lutzii in the Amazon region: description of two cases*. The American journal of tropical medicine and hygiene, 2012. **87**(4): p. 710-714.
114. Theodoro, R.C., et al., *Genus paracoccidioides: Species recognition and biogeographic aspects*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e37694.
115. Teixeira Mde, M., et al., *Paracoccidioides lutzii sp. nov.: biological and clinical implications*. Med Mycol, 2014. **52**(1): p. 19-28.
116. Salgado-Salazar, C., et al., *The human fungal pathogen Paracoccidioides brasiliensis (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: phylogenetic evidence from five mitochondrial markers*. Cladistics, 2010. **26**(6): p. 613-624.

Capítulo II

Genotyping of *Paracoccidioides brasiliensis* from formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissue samples **from patients** treated in the Hospital of Medical **School of Botucatu, São Paulo State University (UNESP)**

Luciana Bonome Zeminian de Oliveira ¹, Amanda Manoel Della Coletta ¹, Taiane Priscila Gardizani ¹, Hans Garcia Garces ², Erick da Cruz Castelli ³, Márcia Guimarães da Silva ³, Julio Defaveri ³, Sílvio de Alencar Marques⁴ and Luciane Alarcão Dias-Melicio ^{1, 3, *}

¹ São Paulo State University (Unesp), Medical School of Botucatu, Laboratory of Immunopathology and Infectious Agents - LIAI, UNIPEX - Experimental Research Unity, Sector 5, Botucatu/SP - Brazil;

² São Paulo State University (Unesp), Institute of Biosciences, Department of Microbiology and Immunology, Botucatu/SP - Brazil;

³ São Paulo State University (Unesp), Medical School of Botucatu, Department of Pathology, Botucatu/SP – Brazil.

³ São Paulo State University (Unesp), Medical School of Botucatu, Department of Dermatology, Botucatu/SP – Brazil.

* Correspondence: Department of Pathology, São Paulo State University (Unesp), Medical School of Botucatu, Av. Professor Montenegro, s/n, Distrito de Rubião Júnior, CEP:18618-687, Botucatu, São Paulo, Brazil. Phone: +55 (14) 3880-1592 E-mail: ladiasmelicio@fmb.unesp.br

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis is a chronic granulomatous mycosis most prevalent in Latin America, that until recently was believed to be caused only by *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*). However, in 2006, researchers described three cryptic species: S1, PS2, PS3, and later, PS4. In 2009, *Paracoccidioides lutzii* (Pb01-like) was described, and now, a new nomenclature was proposed for the different agents: *P. brasiliensis* (S1), *P. Americana* (PS2), *P. restrepiensis* (PS3), and *P. venezuelensis* (PS4). These fungi are thermodimorphic fungi that develop as yeast *in vivo*, in host tissues or *in vitro* cultures at 37°C. 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. 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. The Hospital of Medical School of Botucatu - UNESP, which is a paracoccidioidomycosis study pole, located in São Paulo State midwest region, that is classified as an endemic area. Therefore, it was performed 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 the Hospital of Medical School of Botucatu –

UNESP; and a genotyping analyzes of clinical specimens from these patients that have been diagnosed and treated in our Hospital. For the genotyping, the paraffin from slices of the biopsies was removed, followed by DNA extraction, PCR and sequencing of three target genes (ITS, CHS2 and ARF). The sociodemographic data paired with clinical characteristics demonstrated 177 patients with confirmed paracoccidioidomycosis by histopathological tests. It was identified that most of the patients live in Botucatu region; the prevalent clinical form was the chronic type (76,3%), 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, were individuals self-declared as white. The genotyping of species in the samples demonstrated 44 positive samples. All the sequences were blasted at <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> to testify the presence of *P. brasiliensis*. The phylogenetic trees were constructed using the sequences of 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 this São Paulo State region. Moreover, the observation that white individuals are more susceptible to paracoccidioidomycosis opens new perspectives of studies about a possible resistance of non-white individuals against the fungi.

Keywords: Paracoccidioidomycosis, *Paracoccidioides brasiliensis*, Cryptic Species, Genotyping, Sequencing.

AUTHOR SUMMARY

Paracoccidioidomycosis is a chronic mycosis prevalent in Latin America that until recently was believed to be caused only by *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*). From 2006 onwards, cryptic species were described: S1, PS2, PS3, PS4 and *Paracoccidioides lutzii* (Pb01-like), in 2017, a new nomenclature was proposed for the different agents: *P. brasiliensis* (S1), *P. Americana* (PS2), *P. restrepiensis* (PS3), and *P. venezuelensis* (PS4). Knowing that more than one cryptic species could coexist in some regions, aimed to identify those species in patients' biopsies samples for a better understanding of their distribution and occurrence in our region, and possibly, a correlation between genetic group and mycological and clinical characteristics. Given the formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples collection of PCM patients treated in the Hospital of UNESP Medical School of Botucatu, we applied molecular techniques to differentiate *Paracoccidioides* species in these biopsies. We showed that the prevalent clinical form is the chronic type (76,3%), 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. We also demonstrated that 100% of our positive samples are from S1 cryptic species. Besides, data demonstrating that white individuals are more susceptible to Paracoccidioidomycosis open new avenues for the research about the possible resistance of non-white individuals on PCM.

INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic granulomatous disease that affects mainly the lungs, being restricted to it or it can be disseminated to any other organs through hematogenous lymph circulation resulting in several different clinical manifestations. It is an endemic systemic mycosis and most of the cases occurs in Brazil, Colombia, Venezuela and Argentina [1-5]. Cases described in other countries outside Latin America occurred in patients that previously lived in endemic areas [1-9].

The etiologic agents of PCM are the fungi encompassed in genus *Paracoccidioides*. They are thermodimorphic microorganisms that grow as yeast *in vivo*, in host tissues or *in vitro* cultures at 37°C in enriched culture media. They are also presented as mycelium at room temperature ranging from 4 to 28°C [10-12].

Paracoccidioides brasiliensis was believed to be the sole etiologic agent causing PCM, but studies of genomics and phylogeny pointed out that there is more than one species able to cause this mycosis. In 2006, it was described three cryptic species (S1, PS2, and PS3) and in 2009, *Paracoccidioides lutzii* [13, 14]. Later, it was described a fourth cryptic species, PS4 [15]. Recently, a new nomenclature for these species was suggested as it follows: S1 (*P. brasiliensis*), PS2 (*P. americana*), PS3 (*P. restrepiensis*), PS4 (*P. venezuelensis*) [16].

These species are not uniformly distributed in Latin America, some are more prominent in determined regions than in others [12, 13, 15, 17-23]. S1

(*P. brasiliensis*) is especially predominant disseminated in southeastern and southern Brazil, Argentina and Paraguay; PS2 has a sporadic distribution and is less frequently reported, within human cases being described in southeast Brazil and Venezuela. PS3 and PS4 are exclusively endemic in Colombia and Venezuela, respectively. *P. lutzii* is predominantly distributed in Central and Amazon regions of Brazil and Ecuador [15, 23-26].

Defining species boundaries is a challenge in fungi. The most commonly used parameters are morphological characteristics and, sometimes, the competence to produce fertile offspring [27]. In fungi, these characters that distinguish species are not simple to find and the species may become genetically isolated before developing such characteristics [28].

Matute *et al.* [13], described the speciation of *Paracoccidioides* spp. using *multilocus* genealogy analyzes demonstrating that its genetic variability could be more than just a polymorphism characterizing the cryptic species. This means that their divergence was not explained by the known phenotypic profiles, that could not distinguish the species. It was used 5 genes to make this distinction: CHS2 (chitin synthase), FKS (β -glucan synthase), α -tubulin, ARF (adenyl ribosylation factor) and GP43 (immunodominant glycoprotein).

Even though there are no agreement if the cryptic species are just geographic variants of the same species or totally distinct species, they are reproductively isolated [13, 14]. Since the reproductive and genetic isolation are the first steps on species divergence, it could lead to morphological and

physiological differences with important consequences to the diagnostic and treatment of PCM [28].

With the knowledge that more than one cryptic species coexists in some regions, it was extremely valuable to analyze the presence of different *Paracoccidioides* species in patient biopsies samples, for better understanding of distribution and occurrence of these species in our area and, also a possible correlation between genetic group and mycological and clinical analysis. Given the formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue samples collection of PCM patients treated in the Hospital of UNESP Medical School of Botucatu, this study sought to apply molecular techniques to differentiate these *Paracoccidioides* species in stored patient biopsies and analyze along with its clinical characteristics. Besides, it was performed 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.

MATERIALS AND METHODS

Study Setting, Data and Sample Collection

The Medical School of Botucatu (FMB) of São Paulo State University (UNESP) is a public institution, considered the mycosis study pole, located at Botucatu, a city located in midwest region of the São Paulo State which is classified as an hyperendemic area of this mycosis.

It was gathered 177 patients with confirmed PCM by histological

analysis performed by the Pathology Department of UNESP Medical School of Botucatu, in a period from 2004 to 2014. It was gathered their medical records and tabulated a sociodemographic profile and clinical history of all the 177 patients.

This research was conducted after approval from the Research Ethics Committee of UNESP Medical School of Botucatu (Document number 670.776 from 06/02/2014). The Research Ethics Committee exempted the need to use consent forms for our patients given the retrospective nature of our study.

Later, it was requested the inclusion of a control group, with fresh tissue samples collected from new patients treated in our hospital during the year of 2017. This request was approved, and all these patients agreed to participate by signing a consent form (document number 1.811.168 from 11/08/2016).

It was also gathered their medical records and charted a socio demographic profile and clinical history of all the patients included.

DNA Extraction

The DNA extracted from 177 tissue samples embedded in paraffin using techniques to dewax the tissue and used two different types of commercially available kits, QIAmp DNA Mini Kit and QIAmp FFPE DNA Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions.

The samples were cut in microtome and it was used 3 portions 8µm

thick for blocks that showed a large portion of tissue and, used 5-7 portions of 8µm thick for blocks with a smaller tissue sample. The blades were changed for each paraffin block to avoid contamination.

Once in Eppendorf tubes, the portions were submitted to xylol and alcohol washes until the paraffin melted completely. From this point the extraction was conducted according to manufacturer's instructions. The extracted DNA was quantified by spectrophotometry (Epoch Life Sciences, Inc).

PCR Amplification of Target Genes ITS, ARF, CHS2 and Agarose Gel Electrophoresis

For the genes PCR amplification, it was utilized a Nested PCR protocol for the ITS gene that was used to certify the presence of *P. brasiliensis*. The other two genes were amplified with common PCR protocol.

The primers used in this technique are displayed in table 1.

Table 1. Primers

Gene	Primer	Sequence (5'-3')	Amplicon	Reference
ITS First PCR	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	634bp	[29]
	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG		
ITS Nested	PbITS-E	GAGCTTTGACGTCTGAGACC	450bp	[23]
	Pb-ITST	GTATCCCTACCTGATCCGAG		
ARF	Arf - Fwd	TCTCATGGTTGGCCTCGATGCTGCC	407bp	[13]
	Arf - Rev	GAGCCTCGACGACACGGTCACGATC		
CHS2	CHS2 E2-4 Fwd	CTTAACGGTGCCTTCTTTGCGG	549bp	[13]
	CHS2 E2-4 Rev	GTGAAAGTATTGTTGCCAGCG		

Table 1: Primers used in PCR amplification for our target genes.

The master mix for the first PCR for the ITS gene consisted of 1x *Platinum* Taq DNA Polymerase 10 x buffer(Invitrogen), 1.5mM of MgCl₂ (Invitrogen), 0.2mM of deoxynucleotides (Invitrogen), 0,6µM of each primer

(ITS4 e ITS5) (Invitrogen), 1U of *Platinum* Taq DNA Polymerase (Invitrogen) and 4µl of DNA on final volume of 25µl. It was incubated at 94°C for 5 minutes; 35 cycles of 95° for 1 minute, 53°C for 1 minute, 72°C for 1 minute and a final extension at 72° for 5 minutes.

For the second (nested) PCR, the mixture was the same only using the inner pair of primers (PBITS-E and PBITS-T) and 4µl of the first PCR on final volume of 25µl and changing the annealing temperature to 54°C.

The master mix for the PCR for the ARF gene consisted of 1x *Platinum* Taq DNA Polymerase 10 x buffer(Invitrogen), 1.5mM of MgCl₂ (Invitrogen), 0.2mM of deoxynucleotides (Invitrogen), 0,6µM of each primer (ARF-FWD e ARF-REV) (Invitrogen), 1U of *Platinum* Taq DNA Polymerase (Invitrogen) and 4µl of DNA on final volume of 25µl. It was incubated at 94°C for 5 minutes; 35 cycles of 95° for 1 minute, 57°C for 1 minute, 72°C for 1 minute and a final extension at 72° for 5 minutes.

The master mix for the PCR for the CHS2 gene consisted of 1x *Platinum* Taq DNA Polymerase 10 x buffer(Invitrogen), 1.5mM of MgCl₂ (Invitrogen), 0.2mM of deoxynucleotides (Invitrogen), 0,6µM of each primer (CHS2 E2-4 Fwd e CHS2 E2-4 Rev) (Invitrogen), 1U of *Platinum* Taq DNA Polymerase (Invitrogen) and 4µl of DNA on final volume of 25µl. It was incubated at 94°C for 5 minutes; 35 cycles of 95° for 1 minute, 55°C for 1 minute, 72°C for 1 minute and a final extension at 72° for 5 minutes.

The revelation of the PCR assays was performed using agarose gel electrophoresis with agarose 2% gel electrophoresis using 1x TBE buffer and the conditions were 90 volts for 45 minutes.

Purification and Sequencing of Target Genes ITS, ARF and CHS2

The purification performed in the product amplified from the extracted DNA from FFPE tissue samples was the band cutting from agarose gel. Using agarose gel at 1.5% concentration made with 1X TAE buffer and excised the band with a scalpel. Then, it was used a protocol of freezing and thawing to extract the DNA from the gel.

For the fresh tissue samples, ExoProStar 1-Step Enzymatic PCR and Sequencing Clean-Up (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom) was used according to manufactures instructions.

For the sequencing reaction, the master mix used consisted of 1.5µl of Big Dye Terminator v3.1 5X Buffer, 1µl of Big Dye Terminator v3.1, 1µl of primer, 4µl of purified product and 2.5µl of sterile water. The reaction is performed separately for each primer (forward e reverse). The conditions were 95°C for 1 minute; 40 cycles 95°C for 10 seconds, 50°C for 10 seconds (temperature decrease 1°C per second), and 60° for 4 minutes.

The DNA precipitation protocol used was to add 50µl of ethanol, 2µl of sodium acetate (3M) and 2µl of EDTA (125mM) in each well. The plate is incubated for 15 minutes without light incidence and centrifuged for 45 minutes at 2000xg at 4°C. After that, invert the plate and briefly centrifuge at 200xg with the plate still inverted. Then, add 70µl of 70%ethanol in each well and centrifuge for 15 minutes at 2000xg at 4°C. Again, invert the plate and briefly centrifuge at 200xg with the plate still inverted. The excess of

ethanol was dried in a thermocycler with the lid open at 90°C for 2 minutes.

For the denaturation process, it was added 10µl of formamide in each well and incubate in a thermocycler for 3 minutes at 95°C. Put the plate on ice right after for 2 minutes to perform the thermal shock. The plates were read in a 3500 Series Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

Sequences Analysis

The ITS gene sequences were compared with sequences deposited at GenBank to testify the presence of *Paracoccidioides* sp. The ARF and CHS2 genes sequences were used to construct the phylogenetic trees using MEGA 7.0.

For the CHS2 and ARF gene phylogenetic trees, the evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Tamura 3-parameter model and 1000 copies of bootstrap. In the phylogenetic trees, our samples sequences were compared with sequences from S1, PS2, PS3 and Pb01-like deposited by Matute *et al.* [13].

Statistical Analysis

To check the normality of the data it was used the Kolmogorov-Smirnov test. The sociodemographic and relevant clinical characteristics such as gender, ethnicity, smoking and alcohol intake were analyzed using the Fisher exact test. Statistical analysis was made with SigmaStat Software version 3.1.

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. Daugaard 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.

