



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
DA SAÚDE NA AMAZÔNIA OCIDENTAL**

**OCORRÊNCIA DE *Paracoccidioides* spp. NO MUNICÍPIO DE RIO
BRANCO - ACRE**

IASMINY RANIELLY SILVA FERREIRA

**RIO BRANCO - AC
FEVEREIRO – 2019**

IASMINY RANIELLY SILVA FERREIRA

**OCORRÊNCIA DE *Paracoccidioides* spp. NO MUNICÍPIO DE RIO
BRANCO - ACRE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental, da Universidade Federal do Acre, para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Dra. Clarice Maia Carvalho

Co-orientadora: Dra. Rita do Socorro Uchoa da Silva

**RIO BRANCO - AC
FEVEREIRO – 2019**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE NA
AMAZÔNIA OCIDENTAL - MECS

OCORRÊNCIA DE *Paracoccidioides* spp. NO MUNICÍPIO DE
RIO BRANCO - ACRE

IASMINY RANIELLY SILVA FERREIRA

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 08/02/2019

Profa. Dra. Clarice Maia Carvalho
Universidade Federal do Acre - UFAC
Orientadora

Profa. Dra. Leila Priscila Peters
Universidade Federal do Acre - UFAC
Membro externo

Profa. Dra. Mariane Arnoldi da Silva
Centro Universitário Fameta – UNIMETA
Membro externo

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder proteção, saúde, paciência e discernimento para chegar ao dia de hoje.

Aos meus pais, João Ferreira e Ozair Jardim, pelo apoio, carinho e incentivo, fundamentais para esta conquista.

A minha irmã Jordana Ferreira, por me apoiar ao longo de tantos anos de dificuldades, alegrias e realizações.

Ao Atilon Araújo, pelo amor, paciência, companheirismo, e por me incentivar a concretizar meus objetivos.

A professora Dra. Clarice Maia Carvalho, agradeço pela sua paciência, carinho, profissionalismo e competência.

A professora Dra. Rita do Socorro Uchoa da Silva pela paciência e ensinamentos.

A professora Dra. Leila Priscila Peters, pelos seus ensinamentos, paciência e amizade.

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

A equipe do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Acre pela colaboração e incentivo.

A Veluma Martins, agradeço à companhia, colaboração, paciência e amizade.

A equipe do Laboratório da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), pela amizade e auxílio durante a realização do estágio.

A Karolina Sabino, pela amizade e confiança a mim depositada ao me acolher em sua casa.

À Universidade Federal do Acre e ao curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental.

À CAPES pela concessão da bolsa e ao CNPq pelo financiamento do projeto “Estudo clínico, epidemiológico, sorológico e molecular da Paracoccidiodomicose Pulmonar em Rio Branco, Acre, Brasil”.

“Esforçai-vos, e animai-vos; não temais, nem vos espanteis diante deles; porque o senhor teu Deus é o que vai contigo não te deixará nem te desampará”

(Deuteronômio: 31:6)

RESUMO

O estudo dos aspectos biológicos e ecológicos do gênero *Paracoccidioides* vem sendo desenvolvido por vários grupos de pesquisas nos últimos anos, com o intuito de isolar este microrganismo em amostras clínicas e ambientais, a fim de obter dados mais concretos sobre os fatores ecológicos que determinam sua distribuição geográfica. Desta forma, este estudo teve por objetivo determinar a ocorrência de *Paracoccidioides* spp. no município de Rio Branco-Acre. Para a análise epidemiológico na Amazônia brasileira, foi realizado levantamento dos casos registrados entre 1950 a 30 de junho de 2018, onde 4.515 casos de paracoccidioidomicose foram registrados em 27 estudos realizados, sendo Rondônia (94,3%), o mais frequente. Entre os casos analisados, 89,4% foram observados em homens e 11,6% mulheres, e a maioria dos casos (74,5%) foram identificados em pacientes com idade entre 41 e 60 anos. Além disso, a maioria dos pacientes trabalhavam no campo (37,8%), e a coinfeção mais observada foi a tuberculose (0,7%). Para o estudo da ocorrência ambiental de *Paracoccidioides* spp., foram coletadas 10 amostras de solos de fazendas com criação de gado leiteiro e utilizada para isolamento a técnica de diluição seriada inoculada em meio CTC (BDA - Batata, Dextrose e Ágar, suplementado com Cloranfenicol, Tiabendazol e Ciclohexamida). Foi possível realizar a identificação de quatro (1,86%) isolados ambientais que apresentaram morfoconversão e estruturas características do gênero *Paracoccidioides*. Para o estudo da ocorrência de *Paracoccidioides* spp. em amostras clínicas, foram coletadas 17 amostras de escarro de pacientes sintomáticos respiratórios. Para análise das amostras, foi utilizado o exame direto em KOH 10% e cultivo em meios Mycosel, Sabouraud, Infusão de Cérebro coração e Niger. Foi observada a ocorrência de *Paracoccidioides* spp. em uma amostra clínica (5,9%), sendo este paciente homem, com 43 anos e residente na zona rural. Em ambos os isolados fúngicos serão realizados estudos futuros para caracterização molecular utilizando primers específicos para os gêneros *Paracoccidioides*, a fim de determinar a espécie dos fungos isolados. Esses resultados indicam a região Norte como uma potencial zona endêmica da doença, estudos futuros devem ser realizados a fim de identificar as áreas de risco e contribuir para um melhor entendimento ecológico e biogeográfico de *Paracoccidioides* spp., assim como também auxilia no diagnóstico e tratamento da doença.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose; micoses sistêmicas; Acre.

ABSTRACT

The study of the biological and ecological aspects of the genus *Paracoccidioides* has been developed by several research groups in recent years with the aim of isolating this microorganism in clinical and environmental samples in order to obtain more concrete data on the ecological factors that determine its distribution geographical area. Thus, this study aimed to determine the occurrence of *Paracoccidioides* spp. in the municipality of Rio Branco-Acre. For the epidemiological analysis in the Brazilian Amazon, a survey of cases recorded between 1950 and June 30, 2018 was carried out, where 4,515 cases of Paracoccidioidomycosis were recorded in 27 studies, Rondônia (94.3%) being the most frequent. Among the analyzed cases, 89.4% were observed in men and 11.6% in women, and most cases (74.5%) were identified in patients aged between 41 and 60 years. In addition, the majority of the patients worked in the field (37.8%), and the most observed co-infection was tuberculosis (0.7%). For the study of the environmental occurrence of *Paracoccidioides* spp., 10 samples of soils from farms with dairy cattle were collected and the serial dilution technique inoculated in CTC medium (BDA - Potato, Dextrose and Agar, supplemented with Chloramphenicol, Thiabendazole and Cyclohexamide). It was possible to identify four (1.86%) environmental isolates that presented morphoconversion and characteristic structures of the genus *Paracoccidioides*. For the study of the occurrence of *Paracoccidioides* spp. in clinical samples, 17 sputum samples from respiratory symptomatic patients were collected. For the analysis of the samples, the direct examination in 10% KOH and culture in Mycosel, Sabouraud, Heart Infusion and Niger media was used. The occurrence of *Paracoccidioides* spp. in a clinical sample (5.9%), being this patient male, 43 years old and living in the rural area. Both fungal isolates will be carried out future studies for molecular characterization using primers specific for the genera *Paracoccidioides*, in order to determine the species of the isolated fungi. These results indicate the North region as a potential endemic area of the disease, future studies should be carried out in order to identify the areas of risk and contribute to a better ecological and biogeographic understanding of *Paracoccidioides* spp., as well as help in the diagnosis and treatment of the disease.

Keywords: Paracoccidioidomycosis; systemic mycoses; Acre.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. | Distribuição geográfica de <i>Paracoccidioides lutzii</i> e espécies crípticas de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | 17 |
| Figura 2. | Características macro-micromorfológicas do gênero <i>Paracoccidioides</i> | 18 |
| Figura 3. | Áreas geográficas de endemidade da paracoccidioidomicose na América Latina..... | 20 |
| Figura 4. | Propagação de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e <i>Paracoccidioides lutzii</i> | 22 |
| Capítulo I | | |
| Figura 1. | Fluxograma da identificação e seleção dos artigos de revisão de literatura sobre Paracoccidioidomicose na Amazônia Brasileira | 47 |
| Figura 2. | Frequência relativa de casos de paracoccidioidomicose por estado da Amazônia Brasileira entre 1950-2018 | 49 |
| Figura 3. | Frequência relativa dos métodos utilizados para o diagnóstico da paracoccidioidomicose..... | 51 |
| Capítulo II | | |
| Figura 1. | Caracterização macro e micromorfológica do gênero <i>Paracoccidioides</i> isolado de solo..... | 70 |
| Figura 2. | Análise filogenética da sequência de rRNA ITS1-5.8S-ITS2 de isolados ambientais do município de Rio Branco, Acre..... | 71 |
| Capítulo III | | |
| Figura 1. | Caracterização micromorfológica do gênero <i>Paracoccidioides</i> em amostra de escarro de pacientes suspeitos de tuberculose por meio do exame direto..... | 84 |
| Figura 2. | Caracterização macro e micromorfológica do gênero <i>Paracoccidioides</i> proveniente de amostras de escarro de pacientes suspeitos de Tuberculose Pulmonar..... | 85 |
| Figura 3. | Análise filogenética da sequência de rRNA ITS1-5.8S-ITS2 de isolados clínicos do município de Rio Branco, Acre | 86 |

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

| | | |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. | Frequência absoluta dos números de casos de paracoccidiodomicose entre 1950-2018 nos estados da Amazônia brasileira..... | 48 |
| Tabela 2. | Características sociodemográficas dos pacientes diagnosticados com paracoccidiodomicose na Amazônia Brasileira entre 1950-2018..... | 50 |

Capítulo II

| | | |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. | Frequência relativa e absoluta de fungos isolados de solos de propriedades rurais do município de Rio Branco, Acre..... | 69 |
| Tabela 2. | Análise de similaridade dos isolados no GenBank utilizando o programa algoritmo BLAST..... | 70 |

Capítulo III

| | | |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. | Frequência relativa e absoluta da análise do exame direto e cultura de <i>Paracoccidiodes</i> spp. de pacientes suspeitos de tuberculose pulmonar..... | 84 |
| Tabela 2. | Análise de similaridade dos isolados no GenBank utilizando o programa algoritmo BLAST..... | 86 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------|--------------------------------------------------------------------|
| BDA | Batata-Dextrose-Ágar |
| BHI | Infusão de Cérebro e Coração |
| DEPC | Água livre de Endonucleases |
| dNTP, | Desoxirribonucleotídeos Fosfatados |
| FISH | Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente |
| FR | Frequência Relativa |
| GMS | Gomari Metenamina Silver |
| HE | Hematoxilina Eosina |
| HIV | Vírus da Imunodeficiência Humana |
| IDD | Imunodifusão Dupla |
| ITS | Espaçador Interno Transcrito |
| KOH | Hidróxido de Potássio |
| LACEN | Laboratório Central do Estado do Acre |
| mL | Mililitros |
| mM | Milimolar |
| NaCl | Cloreto de Sódio |
| NSA | Ágar de Sementes do Niger |
| OR | Odds Ration |
| PAS | Ácido Peroxido de Schiff |
| Pb | <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> |
| PCM | Paracoccidioidomicose |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| PRISMA | Preferred Reporting Intems for Systematic Reviews and Meta Anlyses |
| RDC | Resolução da Diretoria Colegiada |
| SCIELO | Scientific Eletronic Library Online |
| SDA | Ágar Sabouraud Dextrose |
| TB | Tuberculose |
| TSA | Amplificação do Sinal da Tiramida |
| URAP | Unidade de Referência de Atenção Primária |
| µm | Micrômetro |

SUMÁRIO

| | Pág. |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 13 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA | 16 |
| 2.1 <i>Paracoccidioides</i> spp. | 16 |
| 2.2 Ecologia..... | 18 |
| 2.3 Epidemiologia..... | 20 |
| 2.4 Formas de infecção..... | 22 |
| 2.5 Imunopatogênese..... | 23 |
| 2.6 Mecanismo de virulência..... | 23 |
| 2.7 Aspectos clínicos da paracoccidioidomicose..... | 24 |
| 2.8 Coinfecções..... | 26 |
| 2.9 Diagnóstico Laboratorial..... | 27 |
| Referências..... | 29 |
| 3. OBJETIVOS | 41 |
| Geral..... | 41 |
| Específico..... | 41 |
| Capítulo I - Panorama da Paracoccidioidomicose na Amazônia Brasileira: Uma revisão de literatura | 42 |
| Resumo..... | 42 |
| Abstract..... | 43 |
| Introdução..... | 43 |
| Material e Métodos..... | 46 |
| Resultados..... | 47 |
| Discussão..... | 51 |
| Conclusão..... | 56 |
| Referências..... | 56 |
| CAPÍTULO II - Ocorrência de <i>Paracoccidioides</i> spp. em solos da Amazônia Sul-Occidental | 63 |
| Resumo..... | 63 |
| Abstract..... | 64 |
| Introdução..... | 64 |
| Material e Métodos..... | 66 |
| Isolamento..... | 66 |
| Caracterização Morfológica..... | 67 |
| Caracterização Molecular..... | 67 |
| Resultados..... | 69 |
| Discussão..... | 71 |
| Conclusão..... | 74 |
| Referências..... | 74 |
| CAPÍTULO III - Ocorrência de <i>Paracoccidioides</i> spp. em amostras de escarro de pacientes sintomáticos respiratórios suspeitos de Tuberculose pulmonar no município de Rio Branco | 78 |
| Resumo | 78 |
| Abstract | 79 |
| Introdução | 79 |
| Material e Métodos | 81 |
| Coleta de dados | 81 |

| | |
|-----------------------------------------------------|-----------|
| Caracterização morfológica | 81 |
| Caracterização molecular | 82 |
| Aspectos éticos | 83 |
| Resultados | 84 |
| Discussão | 86 |
| Conclusão | 90 |
| Referências | 90 |
| 4. CONCLUSÕES GERAIS | 95 |
| ANEXO | 96 |
| Parecer N° 2.987.220 2081 CEP / HCA/FUNDHACRE | 96 |
| Termo de Consentimento Livre e Esclarecido | 102 |

1. INTRODUÇÃO GERAL

Paracoccidioides spp. é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM) uma micose granulomatosa sistêmica, restrita à América Latina e causada por fungos termodimórficos pertencentes a este gênero (CAMACHO; NIÑO-VEGA, 2017; LACERDA PIGOSSO et al., 2017; MACEDO et al., 2018). Aproximadamente 80% dos casos são relatados no Brasil, com uma incidência anual de 0,71 a 3,7 a cada 100.000 habitantes e uma mortalidade de 1,45 por 1.000.000 habitantes (MUÑOZ et al., 2016; MARTINEZ, 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Os fungos termodimórficos do gênero *Paracoccidioides* são encontrados no meio ambiente na forma micelial (28 °C) e leveduriforme durante a fase parasitária (37 °C) (PARENTE-ROCHA et al., 2015; CHAVES et al., 2017; MUÑOZ et al., 2018). A doença ocorre caracteristicamente em pessoas provenientes da zona rural, que realizam atividades relacionadas ao manejo de solo (DE OLIVEIRA et al., 2015; CAMACHO; NIÑO-VEGA, 2017).

A infecção por *Paracoccidioides* spp. é adquirida pela inalação de conídios infectantes suspensos no ar e ao atingir o pulmão ocorrem alterações morfológicas dos micélios para leveduriforme, e em seguida a propagação por brotamento (SCORZONI et al., 2015; TABORDA et al., 2015; ARANTES et al., 2016; MARCOS et al., 2016). As células leveduriforme, podem ser eliminadas pelo sistema imune do hospedeiro ou disseminar-se para os tecidos, por vias linfáticas ou hematogênica, e conseqüentemente, levar a progressão da doença (DE OLIVEIRA et al., 2015; HOLANDA et al., 2017).

As formas clínicas da PCM foram classificadas em: PCM infecção que está relacionada geralmente a pacientes assintomáticos (DA SILVA et al., 2016; GHANI et al., 2018), e a PCM

doença, a qual pode ser subdivididas em: forma aguda/subaguda (tipo juvenil), afetando principalmente crianças e adolescentes com lesões disseminadas, e a PCM crônica que ocorre em sua maioria em adultos do sexo masculino, com o acometimento da mucosa oral, vias aéreas e lesões pulmonares (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017; TATAGIBA et al., 2018).

Embora o nicho ecológico de *Paracoccidioides* spp. não esteja ainda exatamente determinado, este fungo foi isolado esporadicamente no solo, em animais domésticos e silvestres (ARANTES et al., 2016; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). No Brasil, a primeira descrição foi realizada no ano de 1963, em Recife (PE), no entanto uma posterior identificação morfológica do mesmo isolado identificou este como sendo o fungo *Aspergillus penicillioides* (SHOME; BATISTA, 1963). Tendo em vista a necessidade de compreender melhor os fatores ambientais do fungo, diversos estudos foram realizado com o intuito de determinar a distribuição da espécie na natureza (FERREIRA et al., 1990; MONTENEGRO et al., 1996; SILVA-VERGARA et al., 1998; ARANTES et al., 2016; HRYCYK et al., 2018).

A maior concentração de casos de PCM no Brasil é reportada nas regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste (MARTINEZ, 2015; MARTINEZ, 2017). Entretanto, um crescente número de casos vem sendo relatado em áreas de colonização submetidas ao desmatamento, como em regiões do Tocantins, Pará, Mato Grosso, Rondônia e Acre onde a PCM pode ser considerada uma micose sistêmica emergente (MARTINEZ, 2015; MARTINEZ, 2017).

Os primeiros casos de PCM na região Norte foram relatados em 1950, em pacientes no estado do Pará. Sabe-se que a Região Amazônica reúne as condições fisiográficas para a ocorrência dos fungos do gênero *Paracoccidioides*, bem como as atividades desenvolvidas pela população (FONSECA et al., 1999; COUTINHO et al., 2015; MARTINEZ, 2017). Estudos prévios, demonstraram que o estado de Rondônia apresenta uma incidência anual de 9,4 casos por 100.000 habitantes, fator que classifica a região Amazônica como uma potencial zona endêmica (VIEIRA et al., 2014; MARTINEZ, 2015).

A PCM é uma doença negligenciada, sem notificação compulsória, e que têm impacto significativo na saúde pública. No entanto, pouco se conhece sobre a distribuição deste agravo no estado do Acre, onde apenas dois estudos relacionados à infecção por *Paracoccidioides* spp. foram realizados nos anos de 2005 e 2011, apresentando um índice de reatividade para paracoccidiodina de 34,1% e 41,2%, respectivamente (FIGUEIREDO, 2011). Assim, a presente proposta teve por objetivo verificar a ocorrência de fungo *Paracoccidioides* spp. no município de Rio Branco, Acre.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Paracoccidioides* spp.

Paracoccidioides foi relatado pela primeira vez em 1908 por Adolfo Lutz, que o reconheceu como causador de uma nova doença fúngica (ROBERTO et al., 2015; TABORDA et al., 2015; MARTINEZ, 2017). Taxonomicamente, este é classificado na família Ajellomycetaceae, ordem Onygenales e Filo Ascomycota (TEIXEIRA et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2015; MARTINEZ, 2017).

Durante sete décadas, *Paracoccidioides brasiliensis* permaneceu como a única espécie identificada (MATUTE et al., 2006). No entanto, análises moleculares de oito regiões gênicas em 5 loci nuclear de 65 isolados de *P. brasiliensis* registraram diversidade genética, sendo identificados os grupos filogenéticos S1, PS2 e PS3 (MATUTE et al., 2006; MUÑOZ et al., 2016; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Posteriormente, foi identificada a espécie *P. lutzii*, com base em análises filogenéticas (TEIXEIRA et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2014; TATAGIBA et al., 2018), e utilizando genômica populacional, o grupo filogenético S1 do complexo *P. brasiliensis* foi dividido em duas linhagens denominadas S1a e S1b (TEIXEIRA et al., 2014; MUÑOZ et al., 2016; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017; TAMAYO et al., 2017).

As espécies filogenéticas S1a e S1b são frequentemente isolada em diferentes regiões da América do Sul (Figura 1) (CAMACHO; NIÑO-VEGA, 2017; MARTINEZ, 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). A espécie PS2 tem uma distribuição esporádica, sendo relatados até agora na Venezuela e Brasil (Figura 1) (MARTINEZ, 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017; HRYCYK et al., 2018). As espécies PS3 e PS4 são exclusivamente endêmicas da Colômbia e Venezuela, respectivamente (Figura 1) (GONZALEZ; HERNANDEZ, 2016; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). *P. lutzii* engloba uma única espécie

e a distribuição geográfica está mais centrada nas regiões Centro-Oeste, Amazônia e Equador (Figura 1) (TEIXEIRA et al., 2014; ARANTES et al., 2016; MARTINEZ, 2017).

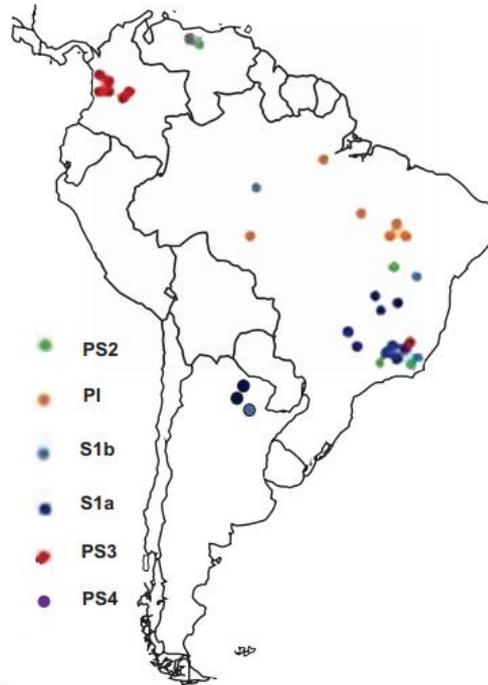


Figura 1. Distribuição geográfica de *Paracoccidioides lutzii* e espécies crípticas de *Paracoccidioides brasiliensis* na América Latina.

Fonte: SHIKANAI-YASUDA et al., 2017.

Paracoccidioides spp. é um fungo termodimórfico, visto que quando cultivado em temperatura ambiente (menor que 28 °C), produz colônias brancas, algodonas, aderentes ao meio, após 20 a 30 dias de incubação (GARCIA-RODAS; NOSANCHUK, 2016). Na microscopia óptica evidencia-se a forma micelial com hifas hialinas e septadas, capazes de formar diferentes tipos de conídios como clamidoconídios, conídios terminais e artroconídios, sendo esses últimos, com 4 a 5 µm de diâmetro, os propágulos infectantes (Figura 2B) (BOCCA et al., 2013; DE OLIVEIRA et al., 2015; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A forma de levedura é encontrada em cultivos incubados a 37 °C, como também em tecidos e fluidos humanos (GARCIA-RODAS; NOSANCHUK, 2016). As colônias crescem em 10 dias com coloração creme e aspecto cerebriforme. A morfologia de *Paracoccidioides*

spp. é de uma célula mãe arredondada, multinucleada, com 5 a 30 µm de diâmetro apresentando brotamentos simples ou múltiplos (blastoconídios), adquirindo a forma classicamente descrita como roda de leme com múltiplos brotamentos (Figura 2D) (BOCCA et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2014; RESTREPO et al., 2015; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

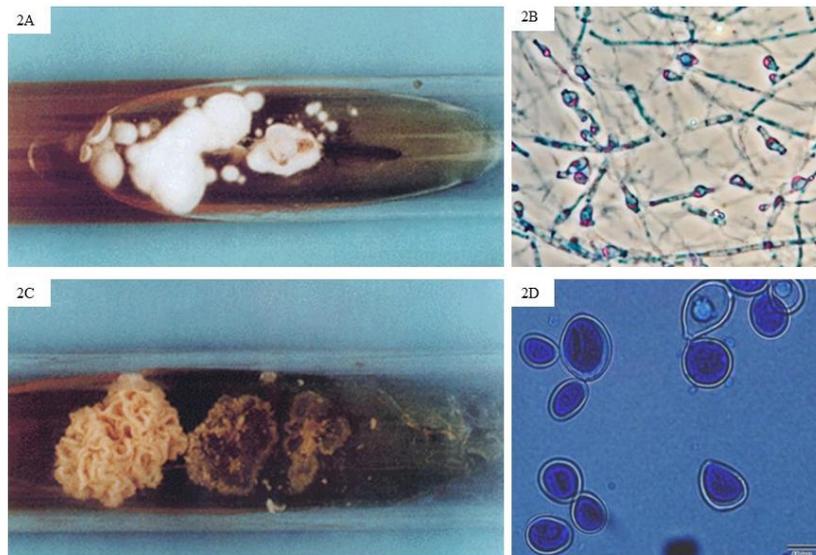


Figura 2. Características macro e micromorfológicas do gênero *Paracoccidioides*. 2A. Aspectos da colônia micelial crescida a 28 °C. 2B. Hifas septadas com conídios. 2C. Aspectos da colônia leveduriforme crescida a 37 °C. 2D. Células arredondadas simples e com brotamento múltiplos.

Fonte: LACAZ et al., 1999; TEIXEIRA et al., 2014; HRYCYK et al., 2018.

2.2 Ecologia

A ecologia do gênero *Paracoccidioides* spp. ainda necessita de estudos experimentais para ser melhor fundamentada, apesar de existir relatos do isolamento deste fungo em amostras ambientais e em animais (ARANTES et al., 2016; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). Recentes estudos comprovaram que este patógeno possui um sistema enzimático capaz de degradar a celulose no solo, tornando o solo um habitat provável para a espécie *Paracoccidioides* spp. (ARANTES et al., 2015; MUÑOZ et al., 2018).

Estudos prévios apontaram a umidade, associada à disponibilidade de água e a presença de vegetação, como fatores ecológicos favoráveis para o desenvolvimento do fungo no solo (TERÇARIOLI et al., 2007; HRYCYK et al., 2018). Além disso, foi constatado que as

condições climáticas associadas a textura do solo determinam o crescimento do patógeno em sua fase saprofítica. Entretanto, as amostras ambientais que contêm um elevado teor de Alumínio trocável (H + Al) pode inibir ou limitar o crescimento do fungo (HRYCYK et al., 2018).

O solo é um ambiente com uma grande diversidade de microrganismos (BREVIK et al., 2015). A comunidade de microrganismos do solo tem sido influenciada pelos fatores bióticos e abióticos, pela ação antrópica e cobertura vegetal nos diferentes biomas (GOURMELON et al., 2016; JACKSON et al., 2017). Além disso, com essa rica biodiversidade, isolar fungos diretamente do solo, especialmente aqueles que apresentam crescimento lento e são nutricionalmente exigentes como é o caso das espécies do gênero *Paracoccidioides*, torna-se um desafio devido à competição entre as espécies e a sobreposição daquelas de rápido crescimento (HRYCYK et al., 2018).

As dificuldades enfrentadas pelos estudos ambientais limitam o entendimento sobre a ecologia e a real distribuição deste gênero em áreas endêmicas e não endêmicas da paracoccidioidomicose (ARANTES et al., 2016). Os poucos casos de isolamento de patógenos ambientais foram de solo (SHOME; BATISTA, 1963; DE ALBORNOZ, 1971; DE MENDELOVICI et al., 1974; SILVA-VERGARA et al., 1998; TERÇARIOLI et al., 2007), folhagem (SILVA-VERGARA et al., 1998), ração para cachorro (FERREIRA et al., 1990), morcegos e fezes de pinguim (FRANCO et al., 2000), quase acidentalmente, com pouca ou nenhuma repetibilidade (SHOME; BATISTA, 1963; MONTENEGRO et al., 1996; SILVA-VERGARA et al., 1998; FRANCO et al., 2000).

O tatu é uma excelente fonte ambiental para o mapeamento da distribuição geográfica de *Paracoccidioides* spp., uma vez que este é um animal sem hábitos migratórios e a área de vida é muito limitada, o que contribui para a delimitação das áreas de infecção do tatu pelo fungo, tornando assim possível determinar a área de captura com sendo uma aérea de ocorrência

fúngica (BAGAGLI et al., 1998; SILVA-VERGARA et al., 2000; TERÇARIOLI et al., 2007; ARANTES et al., 2016).

2.3 Epidemiologia

Uma das características mais marcantes da PCM é sua distribuição geográfica. A doença tem sido relatada somente na América Latina, desde o México (23° Norte) até a Argentina (35° Sul) (HAHN et al., 2014; MARTINEZ, 2015). O Brasil aparece como principal foco da endemia seguido, por Colômbia, Venezuela, Equador e Argentina (Figura 3) (VIEIRA et al., 2014; SCORZONI et al., 2015; MENDES et al., 2017; TRINDADE et al., 2017).

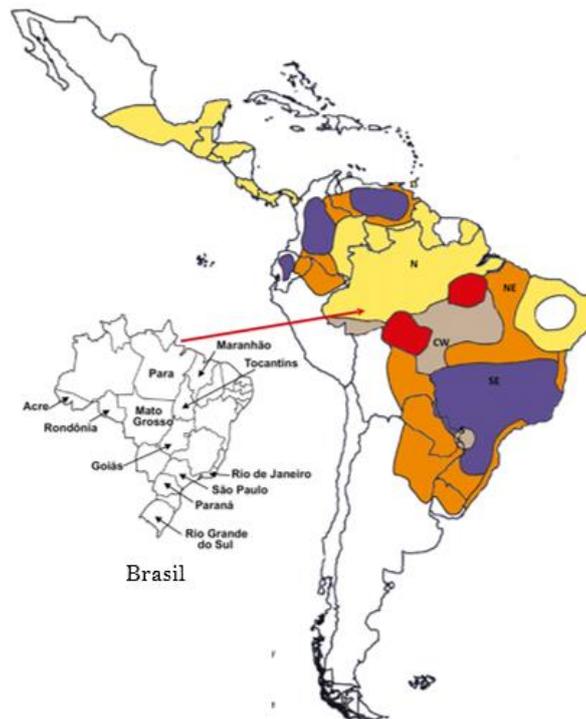


Figura 3. Áreas geográficas de endemicidade da paracoccidioidomicose na América Latina. (◆) Primeira área reconhecida altamente endêmica; (◆) Alta endemicidade observado nas últimas décadas; (◆) Áreas com recente aumento da endemicidade; (◆) Área de moderada endemicidade; (◆) Área de baixa endemicidade; (◆) Raros os casos reportados nesta região ou Países.

Fonte: MARTINEZ, 2017.

A taxa de incidência anual no Brasil varia entre 0,71 a 3,7 novos casos por 100.000 habitantes em áreas endêmicas, sendo o maior número de casos assinalado nas regiões Sudeste,

Centro-Oeste e Sul (MARTINEZ, 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). Nos últimos anos, houve um aumento do número de casos na região Norte e no estado do Maranhão, provavelmente relacionado ao desmatamento para abertura de novas fronteiras agrícolas (MARTINEZ, 2015; MARTINEZ, 2017; MENDES et al., 2017). Em contraste, grande parte do Nordeste Brasileiro tem baixa endemicidade da doença e ausência de casos autóctones, em áreas de clima árido (MARTINEZ, 2015; MENDES et al., 2017).

No Brasil, 3.181 mortes por PCM foram registrados no período de 1980 a 1995 correspondendo a uma taxa média anual de mortalidade de 1,45 por um milhão de habitantes, (2,59 para o sul, 2,35 para o centro-oeste, 1,81 para o sudeste, 1,8 para o Norte e 0,2 para a região nordeste), constituindo-se da oitava causa de óbito por doenças infecciosas e parasitárias crônicas e recorrentes no Brasil (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Dados recentes coletados de 13.683 pacientes hospitalizados com micoses sistêmicas entre janeiro de 1998 e dezembro de 2006 mostraram que a PCM é responsável pelo maior número de hospitalizações (49%) entre todas as micoses, com ênfase nas taxas de hospitalização das regiões Norte e Centro-oeste, sem grandes diferenças na mortalidade de pacientes hospitalizados (COUTINHO et al., 2015).

A PCM ocorre caracteristicamente em pessoas provenientes da zona rural, de baixa renda, que trabalham ou trabalhavam em atividades relacionadas ao manejo do solo, como terraplanagem, operação de máquinas agrícolas, jardinagem e serviços de pedreiro, também estão relacionados à doença (MAGALHÃES et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015).

A doença é incomum em crianças e adolescentes havendo, porém, grandes variações nesse comportamento entre regiões. Tem-se verificado que 10% dos casos ocorrem em menores de 20 anos e 90% em adultos (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). A distribuição por gênero tem característica bem peculiar. Entre os adultos, os homens são mais acometidos que as mulheres na razão de 6:1 (FERNANDES et al., 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Este fator está relacionado à capacidade das mulheres em produzir o 17β -estradiol (E2) que inibi a conversão da fase micelial para a fase parasitaria, e consequentemente a progressão

da doença no sexo feminino (CHADEGANIPOUR; MOHAMMADI, 2015; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). Entretanto na infância, mais precisamente no período pré-puberal, esta diferença de gênero não existe (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

2.4 Forma de infecção

A infecção por *Paracoccidioides* spp. é adquirida pela inalação dos esporos infectantes, chamados artrósporos ou conídios, os quais devem ser aerossolizado antes de infectar o hospedeiro susceptível pela via inalatória (DE OLIVEIRA et al., 2015). Após a infecção, as células se transformam em leveduras com multibrotamentos, que pode ser eliminada pelo sistema imune do hospedeiro ou disseminar-se para os tecidos, por vias linfáticas ou hematogênica, e assim desenvolver a doença, que pode progredir até a morte (Figura 4) (COSTA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016).

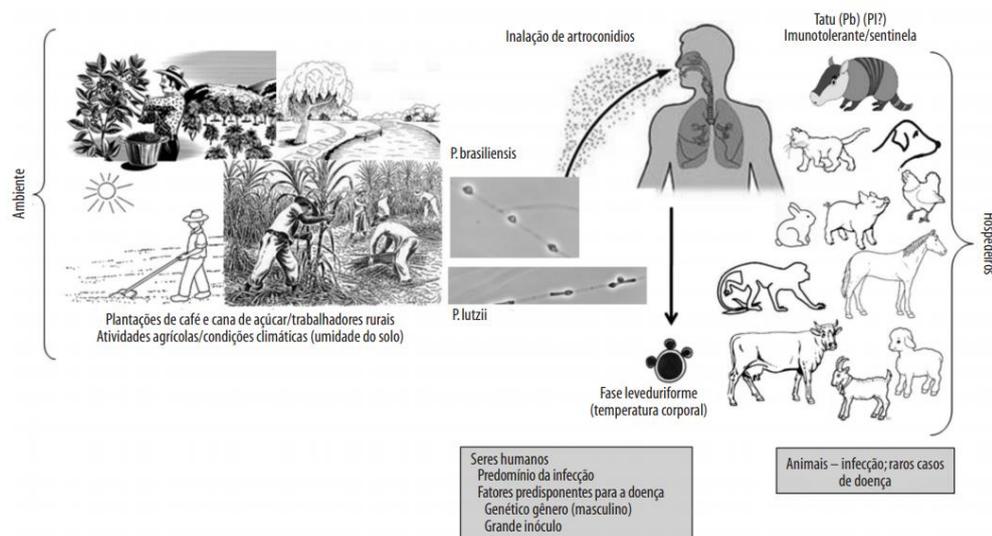


Figura 4. Propagação de *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii*.

Fonte: SHIKANAI-YASUDA et al., 2017.

2.5 Imunopatogênese

A forma de apresentação da PCM é condicionada pela resposta imune do paciente, com células T desempenhando um papel proeminente. A maioria dos indivíduos infectados que

vivem em áreas endêmicas não desenvolverá a doença (FERNANDES et al., 2015; MENDES et al., 2017). Esses indivíduos apresentam um padrão de resposta imune T-helper (Th-1) caracterizado pela liberação de citocinas que ativam macrófagos, TCD4⁺ e TCD8⁺, resultando na formação de granulomas compactos e controle de replicação fúngica, no entanto, as formas latentes do fungo ainda podem existir dentro desses granulomas (FERIOTTI et al., 2017; TRISTÃO et al., 2017).

Os indivíduos que desenvolveram a doença provavelmente apresentam depressão da resposta imune Th-1 (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). A infecção por PCM é caracterizada pela presença de resposta imune Th1, a forma aguda, por uma resposta mista Th2/Th19 e a crônica é caracterizada por perfis Th17/Th22, com substancial colaboração de células Th1 (CAMACHO; NIÑO-VEGA, 2017; MENDES et al., 2017).

2.6 Mecanismo de virulência

O mecanismo de virulência de *Paracoccidioides* spp. envolve metaloproteínas, adesinas, formação de biofilmes, produção de melanina e o dimorfismo, responsável pela transformação do micélio em levedura, fundamental na patogenicidade do fungo (SCORZONI et al., 2015; MENDES et al., 2017).

O dimorfismo fúngico envolve mudanças na composição percentual de β -1,3-glucana (micélio) e de α -1,5-glucana (levedura), além de outras alterações na composição química da parede celular (CAMACHO; NIÑO-VEGA, 2017; MENDES et al., 2017). O principal fator envolvido no dimorfismo é a temperatura, contribuindo, também, fatores como nutrientes e o ar (MENDES et al., 2017).

2.7 Aspectos clínicos

As formas clínicas foram classificadas em paracoccidioidomicose infecção e paracoccidioidomicose doença, sendo está subdividida em: forma aguda ou subaguda e crônica

de acordo com a proposta apresentada no Encontro Internacional da Paracoccidioidomicose, Medellín, em 1986 (SHIKANAI-YASUDA, 2015; DA SILVA et al., 2016; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017; GHANI et al., 2018).

A PCM infecção é definida como uma infecção assintomática causada pelo *Paracoccidioides* spp. em indivíduos saudáveis que vivem em área endêmica (MARTINEZ, 2015). Pode também ser evidenciada pelo encontro de lesões cicatriciais ou sorologia positiva (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A forma aguda/subaguda em geral representa 5-25% dos casos, acomete principalmente crianças, adolescentes e adultos de até 30 anos, de ambos os sexos (MENDES et al., 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017; TATAGIBA et al., 2018). Evolui rapidamente e dissemina-se para múltiplos órgãos e sistemas, em geral, os pacientes apresentam um período de latência curto e o diagnóstico é realizado dentro de algumas semanas após o início dos sintomas (FABRIS et al., 2014; DA SILVA et al., 2016; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A maioria dos sintomas envolve o sistema fagocítico-mononuclear, incluindo a presença de linfadenomegalia localizada ou generalizada, que pode apresentar supuração, fistulização e hepatoesplenomegalia (MARQUES et al., 2016; BERNARDES FILHO et al., 2018). Os sintomas também podem incluir manifestações digestivas, lesões cutâneas (ou mucosas), envolvimento osteoarticular, raramente envolvimento pulmonar, eosinofilia, e febre, perda de peso e a anorexia acompanham frequentemente a apresentação clínica (BRAGA et al., 2017; DE MACEDO et al., 2017).

A forma crônica da paracoccidioidomicose corresponde 96% dos casos, está manifesta-se meses ou anos após a infecção por *Paracoccidioides* spp., e geralmente resulta da reativação do foco pulmonar latente ou pelas reinfecções (BUCCHERI et al., 2016; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). E está associada a fatores de risco específicos com o uso de tabaco e álcool, acometendo em sua maioria adultos, do sexo masculino, entre 30 a 60 anos de idade e

que realizam atividades de manejo de solo (FERNANDES et al., 2017; VENTURINI et al., 2017; TATAGIBA et al., 2018).

A PCM crônica pode ser classificada como unifocal ou multifocal, de acordo com a presença de lesões em um ou mais órgãos, respectivamente. Estas classificações também podem ser subdivididas em leves, moderadas ou graves, dependendo da gravidade das manifestações clínicas (BOCCA et al., 2013; DIAS et al., 2015).

Os pacientes que apresentam a forma crônica da doença em sua maioria desenvolvem as seguintes manifestações clínicas: perda de peso superior a 10% do peso corporal normal; envolvimento pulmonar intenso; envolvimento de outros órgãos, como glândulas supra-renais, sistema nervoso central e ossos; a presença de linfonodos afetados em múltiplas cadeias em forma superficial ou profunda, pseudotumoral (> 2,0 cm de diâmetro, sem supuração) ou forma supurativa e títulos elevados de anticorpos na sorologia (SHIKANAI-YASUDA, 2015; GARCIA-RODAS; NOSANCHUK, 2016; WAGNER et al., 2016; DE ALMEIDA et al., 2018).

Em alguns casos, os pacientes apresentam manifestações clínicas das formas agudas/subagudas e crônicas, dificultando a classificação adequada da doença (MENDES et al., 2017). A maioria desses pacientes apresenta intensa supressão da imunidade celular e são rotulados como tendo forma mista da PCM (MENDES et al., 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A forma residual ou sequelar é uma resposta do hospedeiro ao agente infectante e consiste em inflamação granulomatosa crônica associada a um processo fibrosante (DE ARAUJO EYER-SILVA et al., 2017; MENDES et al., 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). Assim, além da formação de granulomas, há uma produção aumentada de citocinas, incluindo TNF- α e TGF- β , que podem induzir colágeno e acumulação de reticulina no tecido infectado (MENDES et al., 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Esta resposta fibrosante pode então levar a alterações anatômicas e funcionais nos órgãos afetados durante a infecção, especialmente os pulmões (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). As sequelas são observadas em órgãos múltiplos, mas têm uma maior taxa de incidência nos pulmões, pele, laringe, traqueia, glândulas supra-renais, mucosa do trato aerodigestivo superior, sistema nervoso central e sistema linfático, explicando assim a diversidade da apresentação clínica (MENDES et al., 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

2.8 Coinfecções

As doenças infecciosas crônicas e neoplasias tem sido relativamente comum em pacientes com PCM simultaneamente, antes ou depois da micose. A tuberculose (TB) tem sido relatada em aproximadamente 2% a 20% dos casos de PCM, e a doença pode ser diagnosticada antes, depois ou concomitantemente com a PCM (MENDES et al., 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

As dificuldades enfrentadas durante o diagnóstico da coinfecção da PCM com a TB estão relacionadas a superposição e as semelhanças entre as apresentações clínicas e radiológicas (ALMEIDA et al., 2017; ALMEIDA et al., 2017). Além disso, a maioria dos pacientes procuram o tratamento em unidades de saúde básicas, onde os profissionais têm mais experiência em lidar com TB, devido à sua alta incidência, e são menos propensos a solicitar um exame para diagnosticar a PCM (ALMEIDA et al., 2017; ALMEIDA et al., 2017).

Diversos estudos relatam que entre 0,16% e 14,1% dos pacientes com PCM apresentam neoplasia em algum momento de suas vidas (MENDES et al., 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). A suspeita diagnóstica é fundamental para o diagnóstico e tratamento precoces, pois as manifestações clínicas do câncer em pacientes com PCM podem ser mascaradas por sintomas decorrentes de sequelas de lesões fúngicas nos pulmões, laringe ou faringe, especialmente em fumantes e alcoólatras (MARTINEZ et al., 2015; MARTINEZ et al., 2017).

Assim como também a doença tem sido observada em pacientes infectados pelo HIV, com até 1,5% dos casos. Nesses pacientes coinfectados, a PCM progride rapidamente, com lesões disseminadas e na maioria dos casos apresentam manifestações clínicas mistas (MENDES et al., 2017).

2.9 Diagnóstico Laboratorial

A suspeita de que a doença em questão se trata de PCM se dá a partir dos dados clínicos e epidemiológicos. Entretanto, a confirmação laboratorial se faz pela visualização do agente etiológico em exames diretos, ou pelo isolamento e identificação do fungo por meio de cultura de material clínico, que são considerados o padrão ouro na definição da doença como escarro e conhecidas como técnicas diretas no diagnóstico de PCM (DE OLIVEIRA et al., 2015; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A identificação do gênero *Paracoccidioides* pelo exame direto é realizado pela adição de um espécime clínica a lâmina juntamente com uma gota de hidróxido de potássio a 10%, com a finalidade de clarificar a amostras (LACAZ et al., 2002). A positividade da amostra se dar pela visualização de células arredondadas com brotamento simples ou múltiplos, característico de uma roda de leme (LACAZ et al., 2002). A cultura é mais sensível se comparada ao exame direto, e é realizado para demonstrar o dimorfismo da fase micelial para leveduriforme (LACAZ et al., 2002).

O exame histopatológico é de grande valor para o diagnóstico de PCM. Embora células de levedura de *P. brasiliensis* possam ser vistas rotineiramente usando hematoxilina e eosina (HE), outras colorações como Gomori metenamina silver (GMS), ácido periódico de Schiff (PAS) e coloração imuno-histoquímica (ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2014; MENDES et al., 2017) também permitem a visualização. Os tecidos apresentam a formação de granuloma com células gigantes multinucleadas, um infiltrado polimorfonuclear e as células de levedura em

forma mickey mouse e ou roda de leme, é característica sugestiva do gênero *Paracoccidioides* (ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2014; MENDES et al., 2017).

As técnicas indiretas são representadas pela pesquisa de anticorpos de *Paracoccidioides* spp. no soro do paciente. Na rotina dos laboratórios de sorologia, os substratos antigênicos são derivados tanto de células de levedura inteiras quanto de filtrado de cultura, em seu estado bruto ou purificados (VIDAL et al., 2014).

A detecção de anticorpos no soro tem sido uma das principais ferramentas para o diagnóstico, como também pode ser utilizada para monitorar a evolução e resposta ao tratamento (DOS SANTOS et al., 2015). Dentre as diferentes técnicas sorológicas, o teste de imunodifusão dupla (IDD) é o mais comumente utilizado e tem uma sensibilidade de 80 a 95% (GEGEMBAUER et al., 2014; MENDES et al., 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Os métodos moleculares demonstraram ser técnica mais promissora de detecção nos últimos anos. Diversas pesquisas apontam como principal técnica, a reação em cadeia da polimerase (PCR), baseada na amplificação das sequências dos genes dos fungos de interesse, o material amplificado pode ser sequenciado e comparado em uma bases de dados, onde será identificada a espécie de acordo com as sequências específicas de DNA (THEODORO et al., 2005; TERÇARIOLI et al., 2007; ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2014).

A Nested PCR, é uma modificação da PCR, esta técnica consiste inicialmente em realizar a identificação e amplificação da região de interesse, e posteriormente uma segunda reação é realizada utilizando o produto da primeira PCR (THEODORO et al., 2005a; TERÇARIOLI et al., 2007). Para a execução desta técnica os primers mais utilizados são ITS4 e ITS5, que são complementares as regiões 18S e 28S e amplificam as regiões Internal Transcribed Spacer (ITS) ITS1, 5.8S e ITS2. Para a segunda PCR ou Nested PCR os primers internos específicos de *Paracoccidioides* spp. são utilizados (Pb-ITSE e Pb-ITSR) se anelando nas regiões ITS1 e ITS2 (THEODORO et al., 2005; ARANTES et al., 2016).

E recentemente, a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) associada à amplificação do sinal da tiramida (TSA) vem sendo considerada um método promissor para detecção e diferenciação de espécies de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* em amostras ambientais ou clínicas (ARANTES et al., 2017).

Referência

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

ALEIXO, R. Q.; RODRIGUES, M. T. V.; DO NASCIMENTO, D. O. R.; OLIVEIRA, D. T. Manifestações bucais da paracoccidioidomicose: a importância para o cirurgião-dentista—relato de caso. **Clínica e Pesquisa em Odontologia-UNITAU**, v. 8, n. 2, p. 45-50, 2016.

ALMEIDA, F. A. d.; NEVES, F. F.; MORA, D. J.; REIS, T. A. D.; SOTINI, D. M.; RIBEIRO, B. D. M.; ANDRADE-SILVA, L. E.; NASCENTES, G. N.; FERREIRA-PAIM, K.; SILVA-VERGARA, M. L. Paracoccidioidomycosis in Brazilian Patients With and Without Human Immunodeficiency Virus Infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 2, p. 368-372, 2017.

ALMEIDA, S. M.; ROZA, T. H.; SALVADOR, G. L.; IZYCKI, L. F.; LOCATELLI, G.; SANTOS, I. d.; ARAGÃO, A.; TORRES, L. F. B.; DE NORONHA, L. H. Autopsy and biopsy study of paracoccidioidomycosis and neuroparacoccidioidomycosis with and without HIV co-infection. **Mycoses**, v. 61, n. 4, p. 237-244, 2018.

ARANTES, T. D.; BAGAGLI, E.; NINO-VEGA, G.; SAN-BLAS, G.; THEODORO, R. C. *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*, a secret love affair. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 19, p. 25-30, 2015.

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

ARANTES, T. D.; THEODORO, R. C.; DE MELO TEIXEIRA, M.; BOSCO, S. d. M. G.; BAGAGLI, E. Environmental mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil reveals new clues into genetic diversity, biogeography and wild host association. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. 1-18, 2016.

ARANTES, T. D.; THEODORO, R. C.; TEIXEIRA, M. d. M.; BAGAGLI, E. Use of fluorescent oligonucleotide probes for differentiation between *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* in yeast and mycelial phase. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 2, p. 140-145, 2017.

AZEVEDO, P. **Algumas considerações sobre a blastomicose Sul-americana e seu agente etiológico**. 1954. 95 p. Tese -Universidade Federal do Pará, Belém, 1954.

BELLISSIMO-RODRIGUES, F.; MACHADO, A. A.; 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**, v. 85, n. 3, p. 546-550, 2011.

BERNARDES FILHO, F.; SGARBI, I.; SANTOS, F. d. S. D.; SAMPAIO, R. C. R.; QUEIROZ, R. M.; FONSECA, S. N. S.; HAY, R. J.; TOWERSEY, L. Acute paracoccidioidomycosis with duodenal and cutaneous involvement and obstructive jaundice. **Medical Mycology Case Reports**, v. 20, n. 1, p. 21-25, 2018.

BOCCA, A. L.; AMARAL, A. C.; TEIXEIRA, M. M.; SATO, P. K.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; SOARES FELIPE, M. S. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. **Future Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 1177-1191, 2013.

BONFIM, J. A.; VASCONCELLOS, R. L. F.; BALDESIN, L. F.; SIEBER, T. N.; CARDOSO, E. J. B. N. Dark septate endophytic fungi of native plants along an altitudinal gradient in the Brazilian Atlantic forest. **Fungal Ecology**, v. 20, n. 1, p. 202-210, 2016.

BOULOS, M.; LABONIA FILHO, W.; DRAIBE, S. Inquérito imuno-alérgico com paracoccidioidina e histoplasmina nas localidades de Itupiranga e São João do Araguaia. Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 1975.

BRAGA, F. G.; RUAS, L. P.; PEREIRA, R. M.; LIMA, X. T.; ANTUNES, E.; MAMONI, R. L.; BLOTTA, M. H. S. L. Functional and phenotypic evaluation of eosinophils from patients with the acute form of paracoccidioidomycosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 5, p. 1-17, 2017.

BRAGA, R. M.; DOURADO, M. N.; ARAÚJO, W. L. Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. p. 86-98, 2016.

BREVIK, E.; CERDÀ, A.; MATAIX-SOLERA, J.; PEREG, L.; QUINTON, J.; SIX, J.; VAN OOST, K. The interdisciplinary nature of Soil. **Soil**, v. 1, n. 1, p. 117-129, 2015.

BUCCHERI, R.; KHOURY, Z.; BARATA, L. C. B.; BENARD, G. Incubation period and early natural history events of the acute form of paracoccidioidomycosis: lessons from patients with a single *Paracoccidioides* spp. exposure. **Mycopathologia**, v. 181, n. 5-6, p. 435-439, 2016.

CAMACHO, E.; NIÑO-VEGA, G. A. *Paracoccidioides* spp.: Virulence Factors and Immune-Evasion Strategies. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, n. 1, p., 2017.

CASTRILLÓN, A. L.; CARVALHO, R. F. d.; BORBOREMA, C. A.; PECHER, S. A. Paracoccidioidomycose na Amazônia. (Registro de um caso). **Acta Amazonica**, v. 2, n. 3, p. 55-58, 1972.

CHADEGANIPOUR, M.; MOHAMMADI, R. Steroid-binding receptors in fungi: implication for systemic mycoses. **Current Medical Mycology**, v. 1, n. 2, p. 46, 2015.

CHAVES, A. F.; CASTILHO, D. G.; NAVARRO, M. V.; OLIVEIRA, A. K.; SERRANO, S. M.; TASHIMA, A. K.; BATISTA, W. L. Phosphosite-specific regulation of the oxidative-stress response of *Paracoccidioides brasiliensis*: a shotgun phosphoproteomic analysis. **Microbes and Infection**, v. 19, n. 1, p. 34-46, 2017.

CHITHRA, S.; JASIM, B.; SACHIDANANDAN, P.; JYOTHIS, M.; RADHAKRISHNAN, E. Piperine production by endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Piper nigrum*. **Phytomedicine**, v. 21, n. 4, p. 534-540, 2014.

COIMBRA, C. J. **From shifting cultivation to coffee farming: The impact of change on the health and ecology of the Surui Indians in the Brazilian Amazon**. 1990. Tese - Universidade de Indiana, Estados Unidos da América, U.S.A., 1990.

COIMBRA JR, C.; WANKE, B.; SANTOS, R.; VALLE, A. D.; COSTA, R.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. Paracoccidioidin and histoplasmin sensitivity in Tupí-Mondé Amerindian populations from Brazilian Amazonia. **Annals of Tropical Medicine e Parasitology**, v. 88, n. 2, p. 197-207, 1994.

COSTA, V. E. A. C.; DE BRITO, I. P.; MEIRA, A. A.; MILAGRES, F. A. d. P. Relato de caso: paracoccidioidomicose juvenil. **Revista de Patologia do Tocantins**, v. 3, n. 3, p. 3-9, 2016.

COUTINHO, Z. F.; WANKE, B.; TRAVASSOS, C.; OLIVEIRA, R. M.; XAVIER, D. R.; COIMBRA, C. E. Hospital morbidity due to paracoccidioidomycosis in Brazil (1998–2006). **Tropical Medicine and International Health**, v. 20, n. 5, p. 673-680, 2015.

DA COSTA, T. A.; DI GANGI, R.; THOMÉ, R.; FELISBINO, M. B.; BONFANTI, A. P.; ISHIKAWA, L. L. W.; SARTORI, A.; BURGER, E.; VERINAUD, L. Severe Changes in Thymic Microenvironment in a Chronic Experimental Model of Paracoccidioidomycosis. **PLoS One**, v. 11, n. 10, p. 1-15, 2016.

DA SILVA, J. d. F.; DE OLIVEIRA, H. C.; MARCOS, C. M.; ASSATO, P. A.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Advances and challenges in paracoccidioidomycosis serology caused by *Paracoccidioides* species complex: an update. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 84, n. 1, p. 87-94, 2016.

DE ALBORNOZ, M. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, v. 9, n. 3, p. 248-253, 1971.

DE ALMEIDA, S. M.; SALVADOR, G. L.; ROZA, T. H.; IZYCKI, L. F.; DOS SANTOS, I.; ARAGÃO, A.; KULIK, A.; MURO, M.; TORRES, L. F. B.; DE NORONHA, L. H. Geographical evaluation of Neuroparacoccidioidomycosis and Paracoccidioidomycosis in Southern Brazil. **Mycoses**, v. 61, n. p. 587-593, 2018.

DE ARAUJO EYER-SILVA, W.; SANTANA, A. C.; DA SILVA, G. A. R.; DE AZEVEDO, M. C. V. M.; BARRETO, J. L. T. M. S.; NEUMANN, M. A.; DE CASTRO, I. J.; BASÍLIO-DE-OLIVEIRA, R. P.; DE ARAUJO, L. F.; RÉ, N. Z. Laryngeal paracoccidioidomycosis presenting as solitary true vocal fold disease. **IDCases**, v. 10, n. 1, p. 71-74, 2017.

DE ARRUDA, J. A. A.; SCHUCH, L. F.; ABREU, L. G.; SILVA, L. V. d. O.; MOSCONI, C.; MONTEIRO, J. L. G. C.; BATISTA, A. C.; HILDEBRAND, L. d. C.; MARTINS, M. D.; SOBRAL, A. P. V. A multicentre study of oral paracoccidioidomycosis: Analysis of 320 cases and literature review. **Oral Diseases**, v. 24, n. 8, p. 1492-1502, 2018.

DE MACEDO, P. M.; ALMEIDA-PAES, R.; FREITAS, D. F. S.; VARON, A. G.; PAIXÃO, A. G.; ROMÃO, A. R.; COUTINHO, Z. F.; PIZZINI, C. V.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; DO VALLE, A. C. F. Acute juvenile Paracoccidioidomycosis: A 9-year cohort study in the endemic area of Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 3, p. 1-11, 2017.

DE MACEDO, P. M.; DE OLIVEIRA, L. C.; FREITAS, D. F. S.; DA ROCHA, J. A.; FREITAS, A. D. Á.; NUCCI, M.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; ALMEIDA-PAES, R.; DO VALLE, A. C. F. Acute Paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides brasiliensis* S1 mimicking hypereosinophilic syndrome with massive splenomegaly: diagnostic challenge. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. 1-4, 2016.

DE MENDELOVICI, M.; SALFELDER, K.; MENDELOVICI, E.; DE ROMÁN, A. Intento de aislamiento del *Paracoccidioides brasiliensis* del suelo. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, v. 52, n. 1, p. 45-53, 1974.

DE OLIVEIRA, H. C.; ASSATO, P. A.; MARCOS, C. M.; SCORZONI, L.; DE PAULA, E. S.; ANA, C.; DA SILVA, J. D. F.; SINGULANI, J. d. L.; ALARCON, K. M.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Paracoccidioides-host interaction: an overview on recent advances in the paracoccidioidomycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n.1, p. 1-20, 2015.

DO VALLE, A. C. F.; DE MACEDO, P. M.; ALMEIDA-PAES, R.; ROMÃO, A. R.; DOS SANTOS LAZÉRA, M.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis after Highway Construction, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 11, p. 1917, 2017.

DOS SANTOS, P. O.; RODRIGUES, A. M.; FERNANDES, G. F.; DA SILVA, S. H. M.; BURGER, E.; DE CAMARGO, Z. P. Immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides brasiliensis* using a latex test: detection of specific antibody anti-gp43 and specific antigen gp43. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. 1-16, 2015.

DUTRA, L. M.; SILVA, T. H.; FALQUETO, A.; PEÇANHA, P. M.; SOUZA, L. R.; GONÇALVES, S. S.; VELLOSO, T. R. Oral paracoccidioidomycosis in a single-center retrospective analysis from a Brazilian southeastern population. **Journal of infection and public health**, v. 11, n. 4, p. 530-533, 2018.

FABRIS, L. R.; ANDRADE, Ú. V.; SANTOS, A. F. D.; MARQUES, A. P. d. C.; OLIVEIRA, S. M. d. V. L.; MENDES, R. P.; PANIAGO, A. M. M. 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**, v. 56, n. 2, p. 121-125, 2014.

FAVA, S. D. C.; FAVA NETTO, C. Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidioidin sensitivity in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40, n. 3, p. 155-164, 1998.

FERIOTTI, C.; DE ARAÚJO, E. F.; LOURES, F. V.; DA COSTA, T. A.; GALDINO, N. A. d. L.; ZAMBONI, D. S.; CALICH, V. L. G. NOD-like receptor P3 inflammasome controls protective Th1/Th17 immunity against pulmonary paracoccidioidomycosis. **Frontiers in immunology**, v. 8, n. 1, p. 786, 2017.

FERNANDES, F. F.; OLIVEIRA, A. F.; LANDGRAF, T. N.; CUNHA, C.; CARVALHO, A.; VENDRUSCOLO, P. E.; GONÇALES, R. A.; ALMEIDA, F.; DA SILVA, T. A.; RODRIGUES, F. Impact of Paracoccin Gene Silencing on *Paracoccidioides brasiliensis* Virulence. **Mbio**, v. 8, n. 4, p. 1-12, 2017.

FERNANDES, N. C.; CÔRTEZ, J. G.; AKITTI, T.; QUINTELLA, D. C.; CUZZI, T. Sarcoid-like cutaneous lesions in chronic adult paracoccidioidomycosis: report of two cases. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, n.1, p., 2017.

FERNANDES, R. K.; BACHIEGA, T. F.; RODRIGUES, D. R.; GOLIM, M. d. A.; DIAS-MELICIO, L. A.; BALDERRAMAS, H. d. A.; KANENO, R.; SOARES, Â. M. *Paracoccidioides brasiliensis* interferes on dendritic cells maturation by inhibiting PGE2 production. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. 1-17, 2015.

FERREIRA, M.; FREITAS, L.; LACAZ, C. d. S.; DEL NEGRO, G.; DE MELO, N.; GARCIA, N.; DE ASSIS, C.; SALEBIAN, A.; HEINS-VACCARI, E. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dogfood probably contaminated with soil in Uberlândia, Brazil. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 28, n. 3, p. 253-256, 1990.

FIGUEIREDO, M. B. **Inquérito com paracoccidioidina e Histoplasmina em Distrito Docente-assistencial do Tucumã**. 2005. Dissertação (Mestrado em Medicina e Saúde), Universidade Federal do Pará, Belém, 2005.

FIGUEIREDO, M. B. **Inquérito com paracoccidioidina em cinco cidades do Estado do Acre**. 2011. Tese (Doutorado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários), Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

FONSECA, E. R.; PARDAL, P. P.; SEVERO, L. C. Paracoccidioidomycosis in children in Belém, Pará State, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 1, p. 31-33, 1999.

FORJAZ, M. H.; FISCHMAN, O.; CAMARGO, Z. P. d.; VIEIRA FILHO, J. P. B.; COLOMBO, A. L. Paracoccidioidomycosis in Amerindian populations of the Brazilian Surui tribe: a clinical and laboratory study of two cases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 5, p. 571-575, 1999.

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

GARCIA-RODAS, R.; NOSANCHUK, J. D. Effects of silencing 14-3-3 protein in *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Virulence**, v. 7, n. 2, p. 68, 2016.

- GAVIRIA, M.; RIVERA, V.; MUÑOZ-CADAVID, C.; CANO, L. E.; NARANJO, T. W. Validation and clinical application of a nested PCR for paracoccidioidomycosis diagnosis in clinical samples from Colombian patients. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 4, p. 376-383, 2015.
- GEGEMBAUER, G.; ARAUJO, L. M.; PEREIRA, E. F.; RODRIGUES, A. M.; PANIAGO, A. M. M.; HAHN, R. C.; DE CAMARGO, Z. P. Serology of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 7, p. 1-12, 2014.
- GHANI, A.; WEINBERG, M.; PATHAN, N.; VIDHUN, R.; SIEBER, S. *Paracoccidioides brasiliensis* Infection Mimicking Recurrent Hodgkin Lymphoma: A Case Report and Review of the Literature. **Mycopathologia**, v.183, n.6, p. 1-5, 2018.
- GONZALEZ, A.; HERNANDEZ, O. New insights into a complex fungal pathogen: the case of *Paracoccidioides* spp. **Yeast**, v. 33, n. 4, p. 113-128, 2016.
- GOURMELON, V.; MAGGIA, L.; POWELL, J. R.; GIGANTE, S.; HORTAL, S.; GUEUNIER, C.; LETELLIER, K.; CARRICONDE, F. Environmental and geographical factors structure soil microbial diversity in New Caledonian ultramafic substrates: a metagenomic approach. **PloS one**, v. 11, n. 12, p. 1-25, 2016.
- GUIMARÃES, F.; MACEDO, D. Contribuição ao estudo das blastomicoses na Amazônia (blastomicose sul-americana). **Hospital**, v. 38, n. p. 223-253, 1950.
- HAHN, R. C.; RODRIGUES, A. M.; FONTES, C. J. F.; NERY, A. F.; TADANO, T.; JÚNIOR, L. d. P. Q.; DE CAMARGO, Z. P. Fatal fungemia due to *Paracoccidioides lutzii*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 91, n. 2, p. 394-398, 2014.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic acids symposium series**, v. 41, n. 41, p. 95-98, 1999.
- HOLANDA, R. A.; MUÑOZ, J. E.; DIAS, L. S.; SILVA, L. B. R.; SANTOS, J. R. A.; PAGLIARI, S.; VIEIRA, É. L. M.; PAIXÃO, T. A.; TABORDA, C. P.; SANTOS, D. A. Recombinant vaccines of a CD4+ T-cell epitope promote efficient control of *Paracoccidioides brasiliensis* burden by restraining primary organ infection. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 9, p. 1-20, 2017.
- HRYCYK, M. F. **Ecologia de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii* e sua associação com o tatu *Dasypus novemcinctus* nos estados de São Paulo e Mato Grosso, Brasil**. 2018. Tese (Doutorado em Biologia de Parasitas), Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2018.
- HRYCYK, M. F.; GARCIA GARCES, H.; BOSCO, S. d. M. G.; DE OLIVEIRA, S. L.; MARQUES, S. A.; BAGAGLI, E. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*, *P. lutzii* and related species: infection in armadillos, soil occurrence and mycological aspects. **Medical mycology**, v.1, n.1, p. 1-13, 2018.
- JACKSON, R. B.; LAJTHA, K.; CROW, S. E.; HUGELIUS, G.; KRAMER, M. G.; PIÑEIRO, G. The ecology of soil carbon: pools, vulnerabilities, and biotic and abiotic controls. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 48, n.1, p. 419-445, 2017.

JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. Evolution of protein molecules (In Munro HN). **Mammalian protein metabolism**. New York, v. 33, p. 21-132. 1969.

LACAZ, C. d. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; TAKAHASHI DE MELO, N. (2002). **Tratado de micologia médica. 9 ed. São Paulo, Sarvier, 2002. p.1104.**

LACAZ, C. d. S.; VIDAL, M. S. M.; HEINS-VACCARI, E. M.; DEL NEGRO, G. M. B.; ARRIAGADA, G. L. H.; FREITAS, R. d. S. *Paracoccidioides brasiliensis*: a mycologic and immunochemical study of two strains. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, n. 2, p. 79-86, 1999.

LACERDA PIGOSSO, L.; BAEZA, L. C.; VIEIRA TOMAZETT, M.; BATISTA RODRIGUES FALEIRO, M.; BRIANEZI DIGNANI DE MOURA, V. M.; MELO BAILÃO, A.; BORGES, C. L.; ALVES PARENTE ROCHA, J.; ROCHA FERNANDES, G.; GAUTHIER, G. M. *Paracoccidioides brasiliensis* presents metabolic reprogramming and secretes a serine proteinase during murine infection. **Virulence**, v. 8, n. 7, p. 1417-1434, 2017.

MACEDO, P. M.; ALMEIDA-PAES, R.; DE MEDEIROS MUNIZ, M.; OLIVEIRA, M. M. E.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; COSTA, R. L. B.; DO VALLE, A. C. F. *Paracoccidioides brasiliensis* PS2: first autochthonous paracoccidioidomycosis case report in Rio de Janeiro, Brazil, and literature review. **Mycopathologia**, v. 181, n. 9-10, p. 701-708, 2016.

MACEDO, P. M. d.; ALMEIDA-PAES, R.; ALMEIDA, M. d. A.; COELHO, R. A.; ANDRADE, H. B.; FERREIRA, A. B. T. B. C.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; VALLE, A. C. F. d. Paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides brasiliensis* S1 plus HIV co-infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 3, p. 167-172, 2018.

MARCOS, C. M.; DA SILVA, J. d. F.; DE OLIVEIRA, H. C.; ASSATO, P. A.; SINGULANI, J. d. L.; LOPEZ, A. M.; TAMAYO, D. P.; HERNANDEZ-RUIZ, O.; MCEWEN, J. G.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Decreased expression of 14-3-3 in *Paracoccidioides brasiliensis* confirms its involvement in fungal pathogenesis. **Virulence**, v. 7, n. 2, p. 72-84, 2016.

MARQUES-DA-SILVA, S. H.; RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; SILVEIRA-GOMES, F.; DE CAMARGO, Z. P. Occurrence of *Paracoccidioides lutzii* in the Amazon region: description of two cases. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 87, n. 4, p. 710-714, 2012.

MARQUES, S.; STOLF, H.; DILLON, N. Inquérito epidemiológico com paracoccidioidina e histoplasmina em Itaporanga, SP In: COLÓQUIO INTERNACIONAL SOBRE LA PARACOCCIDIOIDOMICOSIS. **Recinto Quirama, Rio Negro, Antioquia, Colômbia**, v. n.1, p. 66, 1986.

MARQUES, S. A.; LASTÓRIA, J. C.; CAMARGO, R. M. P. d.; MARQUES, M. E. A. Paracoccidioidomycosis: acute-subacute clinical form, juvenile type. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 91, n. 3, p. 384-386, 2016.

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

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

MARTINEZ, R. New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 1-13, 2017.

MATUTE, D. R.; MCEWEN, J. G.; PUCCIA, R.; MONTES, B. A.; SAN-BLAS, G.; BAGAGLI, E.; RAUSCHER, J. T.; RESTREPO, A.; MORAIS, F.; NIÑO-VEGA, G. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Molecular biology and evolution**, v. 23, n. 1, p. 65-73, 2006.

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

MENDES, R. P.; DE SOUZA CAVALCANTE, R.; MARQUES, S. A.; MARQUES, M. E. A.; VENTURINI, J.; SYLVESTRE, T. F.; PANIAGO, A. M. M.; PEREIRA, A. C.; DA SILVA, J. d. F.; FABRO, A. T. Paracoccidioidomycosis: current perspectives from Brazil. **The open microbiology journal**, v. 11, n. p. 224, 2017.

MOHER, D.; SHAMSEER, L.; CLARKE, M.; GHERSI, D.; LIBERATI, A.; PETTICREW, M.; SHEKELLE, P.; STEWART, L. A. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. **Systematic reviews**, v. 4, n. 1, p. 1, 2015.

MOK, W.; NETTO, C. F. Paracoccidioidin and histoplasmin sensitivity in Coari (State of Amazonas), Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 27, n. 4, p. 808-814, 1978.

MOK, W. Y.; AYRES, C.; MCMILLEN, S. Levantamento sorológico de quatro micoses profundas no Estado do Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 9, n. 1, p. 75-78, 1979.

MONTENEGRO, M.; MIYAJI, M.; FRANCO, M.; NISHIMURA, K.; COELHO, K.; HORIE, Y.; MENDES, R.; SANO, A.; FUKUSHIMA, K.; FECCHIO, D. Isolation of fungi from nature in the region of Botucatu, state of Sao Paulo, Brazil, an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 665-670, 1996.

MÜLLER, S. F. R.; MIRANDA, M. F. R. d. Sarcoid-like paracoccidioidomycosis presenting with perineural granuloma. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 88, n. 6, p. 994-995, 2013.

MUÑOZ, J. F.; FARRER, R. A.; DESJARDINS, C. A.; GALLO, J. E.; SYKES, S.; SAKTHIKUMAR, S.; MISAS, E.; WHISTON, E. A.; BAGAGLI, E.; SOARES, C. M. Genome diversity, recombination, and virulence across the major lineages of *Paracoccidioides*. **American Society for Microbiology**, v. 1, n. 5, p. 1-18, 2016.

MUÑOZ, J. F.; MCEWEN, J. G.; CLAY, O. K.; CUOMO, C. A. Genome analysis reveals evolutionary mechanisms of adaptation in systemic dimorphic fungi. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2018.

NOGUEIRA, L. M. C.; SANTOS, M.; FERREIRA, L. C. d. L.; TALHARI, C.; RODRIGUES, R. R.; TALHARI, S. AIDS-associated paracoccidioidomycosis in a patient with a CD4+ T-cell count of 4 cells/mm³. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 129-132, 2011.

PALHETA-NETO, F. X.; MOREIRA, J. S.; MARTINS, A. C. d. C.; CRUZ, F. J.; GOMES, E. R.; PEZZIN-PALHETA, A. C. Estudo de 26 casos de Paracoccidioidomicose avaliados no Serviço de Otorrinolaringologia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 69, n. p. 622-627, 2003.

PAN, F.; LIU, Z.-Q.; CHEN, Q.; XU, Y.-W.; HOU, K.; WU, W. Endophytic fungus strain 28 isolated from *Houttuynia cordata* possesses wide-spectrum antifungal activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 480-488, 2016.

PARENTE-ROCHA, J. A.; PARENTE, A. F. A.; BAEZA, L. C.; BONFIM, S. M. R. C.; HERNANDEZ, O.; MCEWEN, J. G.; BAILÃO, A. M.; TABORDA, C. P.; BORGES, C. L.; DE ALMEIDA SOARES, C. M. Macrophage interaction with *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells modulates fungal metabolism and generates a response to oxidative stress. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. 1-18, 2015.

PEÇANHA, P. M.; FERREIRA, M. E. B.; PEÇANHA, M. A. M.; SCHMIDT, E. B.; DE ARAÚJO, M. L.; ZANOTTI, R. L.; POTRATZ, F. F.; NUNES, N. E. D.; FERREIRA JR, C. U. G.; DELMAESTRO, D. Paracoccidioidomycosis: epidemiological and clinical aspects in 546 cases studied in the State of Espírito Santo, Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 97, n. 3, p. 836-844, 2017.

PEREIRA, P. M. R.; AKEL, P. B. d. M.; LIMA, L. L. d.; KIMURA, E. N.; JALKH, A. P. Multifocal paracoccidioidomycosis: a diagnostic challenge due to late cutaneous manifestation. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 86, n. 1, p. 149-152, 2011.

PIGOSSO, L. L.; PARENTE, A. F. A.; COELHO, A. S. G.; SILVA, L. P.; BORGES, C. L.; BAILÃO, A. M.; DE ALMEIDA SOARES, C. M. Comparative proteomics in the genus *Paracoccidioides*. **Fungal genetics and biology**, v. 60, n.1, p. 87-100, 2013.

PONTES, H. A. R.; GUIMARÃES, D. M.; PONTES, F. S. C.; PAIVA, H. B.; PINTO, L. C. D. a.; DE FREITAS SILVA, B. S.; DOS SANTOS PINTO JR, D. Kaposi sarcoma and paracoccidioidomycosis in the same fragment of oral mucosa biopsy: a rare association in human immunodeficiency virus-positive patient. A case report. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 69, n. 2, p. 196-199, 2011.

RESTREPO, A.; CANO, L. E.; GONZALEZ, A. The power of the small: the example of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. p. 5-10, 2015.

ROBERTO, T. N.; RODRIGUES, A. M.; HAHN, R. C.; DE CAMARGO, Z. P. Identifying *Paracoccidioides* phylogenetic species by PCR-RFLP of the alpha-tubulin gene. **Medical Mycology**, v. 54, n. 3, p. 240-247, 2015.

SAFE, I. P.; VALLE, F. F. d.; MAIA, D. C. C.; AGONIO, B.; MONTE, R. L.; ARAUJO, J. d. R.; CORDEIRO-SANTOS, M. Extra-pulmonary manifestations of

paracoccidioidomycosis associated with acquired immunodeficiency syndrome: a case report. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 89, n. 1, p. 150-153, 2014.

SCORZONI, L.; DE PAULA E SILVA, A. C. A.; SINGULANI, J. d. L.; LEITE, F. S.; DE OLIVEIRA, H. C.; MORAES DA SILVA, R. A.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Comparison of virulence between *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* using *Galleria mellonella* as a host model. **Virulence**, v. 6, n. 8, p. 766-776, 2015.

SHAMSEER, L.; MOHER, D.; CLARKE, M.; GHERSI, D.; LIBERATI, A.; PETTICREW, M.; SHEKELLE, P.; STEWART, L. A. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015: elaboration and explanation. **British Medical Journal**, v. 349, n.1, p. 1-25, 2015.

SHARMA, S.; KUMAR, V.; TRIPATHI, R. B. Isolation of phosphate solubilizing microorganism (PSMs) from soil. **Journal of microbiology and Biotechnology Research**, v. 1, n. 2, p. 90-95, 2017.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. Paracoccidioidomycosis treatment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. p. 31-37, 2015.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; QUEIROZ-TELLES, F. d.; KONO, A. S. G.; PANIAGO, A. M.; NATHAN, A.; VALLE, A. C. F. d.; BAGAGLI, E.; BENARD, G. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 715-740, 2017.

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

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

SOUZA, A. R. C. d.; BALDONI, D. B.; LIMA, J.; PORTO, V.; MARCUZ, C.; MACHADO, C.; FERRAZ, R. C.; KUHN, R. C.; JACQUES, R. J.; GUEDES, J. V. Selection, isolation, and identification of fungi for bioherbicide production. **Brazilian Journal of microbiology**, v. 48, n. 1, p. 101-108, 2017.

TABORDA, C.; URÁN, M.; NOSANCHUK, J. D.; TRAVASSOS, L. Paracoccidioidomycosis: challenges in the development of a vaccine against an endemic mycosis in the Americas. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 19, p. 21-24, 2015.

TALHARI, C.; BRAGA DE SOUZA, J. V.; PARREIRA, V. J.; REINEL, D.; TALHARI, S. Oral exfoliative cytology as a rapid diagnostic tool for paracoccidioidomycosis. **Mycoses**, v. 51, n. 2, p. 177-178, 2007.

TALHARI, S.; CUNHA, M. d. G. S.; SCHETTINI, A. P. M.; TALHARI, A. C. Deep mycoses in Amazon region. **International journal of dermatology**, v. 27, n. 7, p. 481-484, 1988.

TAMAYO, D.; MUÑOZ, J. F.; ALMEIDA, A. J.; PUERTA, J. D.; RESTREPO, Á.; CUOMO, C. A.; MCEWEN, J. G.; HERNÁNDEZ, O. *Paracoccidioides* spp. catalases and their role in antioxidant defense against host defense responses. **Fungal genetics and biology**, v. 100, n. p. 22-32, 2017.

TAMAYO, D.; MUÑOZ, J. F.; LOPEZ, Á.; URÁN, M.; HERRERA, J.; BORGES, C. L.; RESTREPO, Á.; SOARES, C. M.; TABORDA, C. P.; ALMEIDA, A. J. Identification and Analysis of the Role of Superoxide Dismutases Isoforms in the Pathogenesis of *Paracoccidioides* spp. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004481, 2016.

TATAGIBA, L. S.; PIVATTO, L. B.; FACCINI-MARTÍNEZ, Á. A.; PEÇANHA, P. M.; VELLOSO, T. R. G.; GONÇALVES, S. S.; RODRIGUES, A. M.; CAMARGO, Z. P.; FALQUETO, A. A case of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii* presenting sarcoid-like form. **Medical Mycology Case Reports**, v. 19, n. p. 6-8, 2018.

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

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

TEIXEIRA, M. M.; THEODORO, R. C.; NINO-VEGA, G.; BAGAGLI, E.; FELIPE, M. S. *Paracoccidioides* species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, p. 1-4, 2014.

TEIXEIRA, M. M.; THEODORO, R. C.; NINO-VEGA, G.; BAGAGLI, E.; FELIPE, M. S. *Paracoccidioides* species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, p. e1004397, 2014.

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

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

THEODORO, R. C.; DE MELO TEIXEIRA, M.; FELIPE, M. S. S.; DOS SANTOS PADUAN, K.; RIBOLLA, P. M.; SAN-BLAS, G.; BAGAGLI, E. Genus *Paracoccidioides*: species recognition and biogeographic aspects. **PloS One**, v. 7, n. 5, p. 1-15, 2012.

TRINDADE, A. H.; MEIRA, H. C.; PEREIRA, I. F.; DE LACERDA, J. C. T.; DE MESQUITA, R. A.; SANTOS, V. R. Oral paracoccidioidomycosis: Retrospective analysis of 55 Brazilian patients. **Mycoses**, v. 60, n. 8, p. 521-525, 2017.

TRISTÃO, F. S. M.; ROCHA, F. A.; CARLOS, D.; KETELUT-CARNEIRO, N.; SOUZA, C. O. S.; MILANEZI, C. M.; SILVA, J. S. Th17-inducing cytokines IL-6 and IL-23 are crucial for granuloma formation during experimental paracoccidioidomycosis. **Frontiers in immunology**, v. 8, n. p. 949, 2017.

TURISSINI, D. A.; GOMEZ, O. M.; TEIXEIRA, M. M.; MCEWEN, J. G.; MATUTE, D. R. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 106, n.1, p. 9-25, 2017.

VENTURINI, J.; CAVALCANTE, R. S.; SYLVESTRE, T. F.; SANTOS, R. F. d.; MORIS, D. V.; CARVALHO, L. R.; ARRUDA, M. S. P. d.; GOLIM, M. d. A.; MENDES, R. P. Increased peripheral blood TCD4+ counts and serum SP-D levels in patients with chronic paracoccidioidomycosis, during and after antifungal therapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 11, p. 748-755, 2017.

VIDAL, M. S. M.; DEL NEGRO, G. M. B.; VICENTINI, A. P.; SVIDZINSKI, T. I. E.; MENDES-GIANNINI, M. J.; ALMEIDA, A. M. F.; MARTINEZ, R.; DE CAMARGO, Z. P.; TABORDA, C. P.; BENARD, G. Serological diagnosis of paracoccidioidomycosis: high rate of inter-laboratorial variability among medical mycology reference centers. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 9, p. e3174, 2014.

VIEIRA, C.; WEBER, O. Base Saturation on Growth and on Nutrition of Yellow Ipê Seedlings. **Floresta e Ambiente**, v. 24, n.1, p. 1-10, 2017.

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

WAGNER, G.; MOERTL, D.; ECKHARDT, A.; SAGEL, U.; WRBA, F.; DAM, K.; WILLINGER, B. Chronic Paracoccidioidomycosis with adrenal involvement mimicking tuberculosis—A case report from Austria. **Medical Mycology Case Reports**, v. 14, n.1, p. 12-16, 2016.

ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; PIZZINI, C. V.; DE MEDEIROS MUNIZ, M.; DO VALLE, A. C. F.; ALMEIDA-PAES, R. Diagnostic aspects of paracoccidioidomycosis. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 1, n. 2, p. 111-118, 2014.

3. OBJETIVOS

Geral

Determinar a ocorrência de *Paracoccidioides* spp. no município de Rio Branco-Acre.

Específicos

- ✓ Realizar a análise epidemiológica da Paracoccidioidomicose na Amazônia Brasileira com base em dados da literatura;
- ✓ Relatar a ocorrência do fungo *Paracoccidioides* spp. em amostras de solos da Amazônia Sul-Occidental;
- ✓ Verificar a ocorrência de *Paracoccidioides* spp. em amostras de escarro de pacientes sintomáticos respiratórios suspeitos de Tuberculose pulmonar no município de Rio Branco-Acre.

Capítulo I - Panorama da Paracoccidioidomicose na Amazônia Brasileira: Uma revisão de literatura

Iasminy Ranielly Silva Ferreira¹; Clarice Maia Carvalho^{1,2}.

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil.

² Centro de Ciências Biológicas e da Natureza da Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil.

Resumo

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose granulomatosa sistêmica, que possui um grande impacto na saúde pública nas áreas de maior endemicidade, não só pelo relevante número de casos, mas também pela cronicidade da doença, tratamento prolongado e as frequentes sequelas que incapacitam o indivíduo de realizar suas atividades laborais. Por não ser uma doença de notificação compulsória, a prevalência deste agravo na saúde pública é pouco conhecida. Portanto, o objetivo deste estudo foi realizar uma revisão de literatura abordando os aspectos epidemiológicos da Paracoccidioidomicose nos estados do Brasil que compõem a Amazônia Brasileira. Os artigos indexados nas bases Pubmed, Scielo, Web of Science e Google acadêmico, foram identificados utilizando os descritores: *Paracoccidioides*, paracoccidioidomycosis, Brazilian amazon, Acre, Amapá, Pará, Tocantins, Rondônia, Amazonas, Roraima. Apenas artigos publicados em inglês, português e espanhol, entre 1950 a 30 de junho de 2018 foram selecionados para esta revisão. Os critérios de inclusão dos artigos nesta revisão foram estudos com a descrição da prevalência ou incidência da paracoccidioidomicose nos estados do Brasil que compõem a Amazônia Brasileira, e os critérios de exclusão foram os estudos realizados em outras regiões do Brasil e dados de morbimortalidade. Os dados obtidos foram analisados por meio da frequência relativa e absoluta. Entre 1950 a 30 de junho de 2018, 4.515 casos de PCM foram registrados em 27 estudos realizados na Amazônia Brasileira, sendo Rondônia (94,3%), o mais frequente. Entre todos os casos analisados, 89,4% e 11,6% foram observados em homens e mulheres, respectivamente, e a maioria dos casos (74,5%) foram identificados em pacientes com idade entre 41 e 60 anos. Além disso, a maior frequência de pacientes trabalhavam no campo (37,8%), e apresentavam coinfeção com a tuberculose (0,7%). Dos métodos utilizados para realizar o diagnóstico da paracoccidioidomicose, 42,5% casos foram com base em exames clínicos epidemiológicos e 26,6% foram através de exames diretos. O Estado de Rondônia apresentou maior endemicidade da doença, e os Estados do Acre e Amapá não apresentaram relatos da doença. No Acre e Amapá foram realizados o levantamento de paracoccidioidomicose infecção através do teste intradérmico com a paracoccidioidina, e em ambos apresentaram resultado positivo para infecção, mostrando a necessidade de novos estudos com o intuito de determinar a frequência da doença nestes estados.

Palavras-chaves: *Paracoccidioides*, paracoccidioidomycosis, Brazilian amazon, Acre, Amapá, Pará, Tocantins, Rondônia, Amazonas, Roraima.

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic granulomatous mycosis, which has a great impact on public health in areas of greater endemicity, not only due to the relevant number of cases, but also due to the chronicity of the disease, prolonged treatment and frequent sequelae that incapacitate the individual to carry out their work activities. Because it is not a compulsory notification disease, the prevalence of this disease in public health is little known. Therefore, the objective of this study was to perform a literature review addressing the epidemiological aspects of Paracoccidioidomycosis in the Brazilian states that make up the Brazilian Amazon. The articles indexed in Pubmed, Scielo, Web of Science and Google academic were identified using the following descriptors: *Paracoccidioides*, Paracoccidioidomycosis, Brazilian amazon, Acre, Amapá, Pará, Tocantins, Rondônia, Amazonas, Roraima. Only papers published in English, Portuguese and Spanish between 1950 and June 30, 2018 were selected for this review. The criteria for inclusion of the articles in this review were studies with a description of the prevalence or incidence of paracoccidioidomycosis in the states of Brazil that make up the Brazilian Amazon, and the exclusion criteria were studies performed in other regions of Brazil and morbidity and mortality data. The obtained data were analyzed by means of the relative and absolute frequency. Between 1950 and 30 June 2018, 4,515 PCM cases were recorded in 27 studies conducted in the Brazilian Amazon, with Rondônia (94.3%) being the most frequent. Among all the analyzed cases, 89.4% and 11.6% were observed in men and women, respectively, and most cases (74.5%) were identified in patients aged 41-60 years. In addition, the highest frequency of patients worked in the field (37.8%), and they had a co-infection with tuberculosis (0.7%). Of the methods used to perform the diagnosis of paracoccidioidomycosis, 42.5% of cases were based on epidemiological clinical exams and 26.6% were through direct examinations. The State of Rondônia presented greater endemicity of the disease, and the States of Acre and Amapá did not present reports of the disease. In Acre and Amapá, paracoccidioidomycosis infection was carried out through the intradermal test with paracoccidioidin, and in both, they showed a positive result for infection, showing the need for new studies in order to determine the frequency of the disease in these states.

Keywords: *Paracoccidioides*, Paracoccidioidomycosis, Brazilian amazon, Acre, Amapá, Pará, Tocantins, Rondônia, Amazonas. Roraima.

Introdução

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada pelo fungo *Paracoccidioides* spp., endêmica na América Latina (GAVIRIA et al., 2015; TABORDA et al., 2015). Os países com maiores casuísticas são o Brasil, Venezuela e a Argentina. O Brasil, que responde por 80% dos casos, tem a maior incidência de casos concentrados em suas regiões sudeste, sul e centro-oeste (MARTINEZ, 2015; MARTINEZ, 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Análises filogenéticas levaram à descoberta de que o gênero *Paracoccidioides* compreende duas espécies: *P. brasiliensis* e *P. lutzii* (TAMAYO et al., 2016; TAMAYO et al., 2017; TATAGIBA et al., 2018). Por sua vez, *P. brasiliensis* foi classificado em diferentes linhagens filogenéticas (S1, PS2, PS3 e PS4) (DA SILVA et al., 2016; DE MACEDO et al., 2016; TURISSINI et al., 2017) e, recentemente, utilizando genômica populacional, foi identificado uma divisão no grupo S1, em duas linhagens denominadas S1a e S1b (MUÑOZ et al., 2016; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017; TAMAYO et al., 2017).

O fungo termodimórfico do gênero *Paracoccidioides* é encontrado no meio ambiente na forma micelial (28°C) e leveduriforme durante a fase parasitaria (37°C) (PARENTE-ROCHA et al., 2015; CHAVES et al., 2017; MUÑOZ et al., 2018). A infecção por *Paracoccidioides* spp. é adquirida pela inalação de conídios infectantes suspensos no ar, que ao atingir o epitélio dos alvéolos se diferencia na forma parasitaria (SCORZONI et al., 2015; TABORDA et al., 2015; ARANTES et al., 2016; MARCOS et al., 2016). E a doença ocorre caracteristicamente em pessoas provenientes da zona rural, que realizam atividades associados ao manejo de solo (DE OLIVEIRA et al., 2015; CAMACHO; NIÑO-VEGA, 2017).

Estudos prévios indicam que populações susceptíveis podem ser infectadas pelo fungo, porém não desenvolvem a doença clínica, sendo essa condição conhecida como paracoccidioidomicose infecção (MARTINEZ, 2015; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A paracoccidioidomicose doença, os indivíduos apresentam sintomas clínicos, e pode ser subdividida em forma aguda, subaguda ou crônica (MARTINEZ, 2015; MARTINEZ, 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). A forma aguda ou subaguda afeta principalmente crianças e adolescentes, que podem apresentar lesões disseminadas,

surgindo após semanas ou meses após a infecção por *Paracoccidioides* spp. (MARTINEZ, 2015; MACEDO et al., 2016; BRAGA et al., 2017).

A forma crônica acomete em sua maioria adultos do sexo masculino, esta forma da doença se manifesta de meses a anos após a infecção por *Paracoccidioides* spp. e tem sido associado a fatores de riscos específicos como alcoolismo e tabagismo (MARTINEZ, 2015; TATAGIBA et al., 2018). A forma residual é uma resposta do hospedeiro ao agente infectante e consiste em inflamação granulomatosa crônica associada a um processo fibrosante sobrejacente (DE ARAUJO EYER-SILVA et al., 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). Esta resposta fibrosante pode então levar a alterações anatômicas e funcionais após o tratamento do indivíduo acometido (MARTINEZ, 2015; VENTURINI et al., 2017).

A paracoccidioidomicose possui um grande impacto na saúde pública das áreas de maior endemicidade (DE OLIVEIRA et al., 2015; FERNANDES et al., 2017), não só pelo relevante número de casos, mas também pela cronicidade da doença, tratamento prolongado e as frequentes sequelas que incapacitam o indivíduo de realizar suas atividades laborais (DE OLIVEIRA et al., 2015; CAMACHO; NIÑO-VEGA, 2017). A paracoccidioidomicose é a maior causadora de óbitos entre as micoses sistêmicas no Brasil, resultando em uma taxa de mortalidade de 1,45 casos por um milhão de habitantes, e na região Norte de 1,8 casos por milhão de habitantes (COUTINHO et al., 2015; DE MACEDO et al., 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Por não ser uma doença de notificação compulsória, a prevalência deste agravo na saúde pública é pouco conhecida (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). Portanto, o objetivo deste estudo foi realizar revisão de literatura abordando os aspectos epidemiológicos desta doença nos estados do Brasil que compõem a Amazônia Brasileira.

Materiais e Métodos

Trata-se de uma revisão sistemática, conduzida a partir de uma adaptação das diretrizes propostas no guia “Preferred Reporting Intems for Systematic Reviews and MetaAnalyses” (PRISMA) (MOHER et al., 2015; SHAMSEER et al., 2015), tendo como enfoque a identificação de estudos sobre paracoccidioidomicose nos estados do Brasil que compõem a Amazônia brasileira.

Os artigos indexados nas bases Pubmed, Scientific Eletronic Library Online (Scielo), Web of Science e Google acadêmico foram identificados por dois revisores durante um período de um ano, utilizando os descritores: *Paracoccidioides*, paracoccidioidomycosis, brazilian amazona, Acre, Amapá, Pará, Tocantins, Rondônia, Amazonas. Roraima. Apenas artigos publicados em inglês, português e espanhol, entre 1950, ano do primeiro relato da doença na Amazônia Brasileira, a 30 de junho de 2018 foram utilizados na pesquisa para o propósito desta revisão.

Os critérios de inclusão dos artigos nesta revisão foram estudos com a descrição da prevalência ou incidência da paracoccidioidomicose nos estados do Brasil que compõem a Amazônia brasileira. Quanto aos critérios de exclusão, os seguintes estudos foram considerados inadequados para o objetivo proposto: estudos realizados em outras regiões do Brasil e dados de morbimortalidade.

As informações epidemiológicas contidas em todos os trabalhos foram reunidas e sistematizadas em uma planilha do Excel, com o objetivo de detectar repetições de documentos garantindo maior precisão e confiabilidade dos resultados. Essa planilha foi utilizada posteriormente para extrair dados dos estudos selecionados e reunir informações sobre a data e local de publicação, exames laboratoriais utilizados para o diagnóstico da doença e o número de casos de pacientes positivos para Paracoccidioidomicose. Os resultados foram analisados utilizando a frequência absoluta e relativa.

Resultados

Foram identificados 3.284 registros: 1.112 no Pubmed, 73 na Scielo, 142 na Web of Science, 1.957 no Google acadêmico. Um total de 1.278 registros foram replicados entre as bases de dados e, assim, 2.006 documentos foram identificados.

Após a aplicação dos critérios de seleção com leitura dos temas e resumos, 500 documentos foram selecionados, destes apenas 25 artigos foram considerados adequados para os propósitos do estudo. A consulta das listas de referências desses artigos produziu outros dois artigos que atenderam aos critérios de seleção e, portanto, um total de 27 artigos foram lidos e sistematizados (Figura 1).

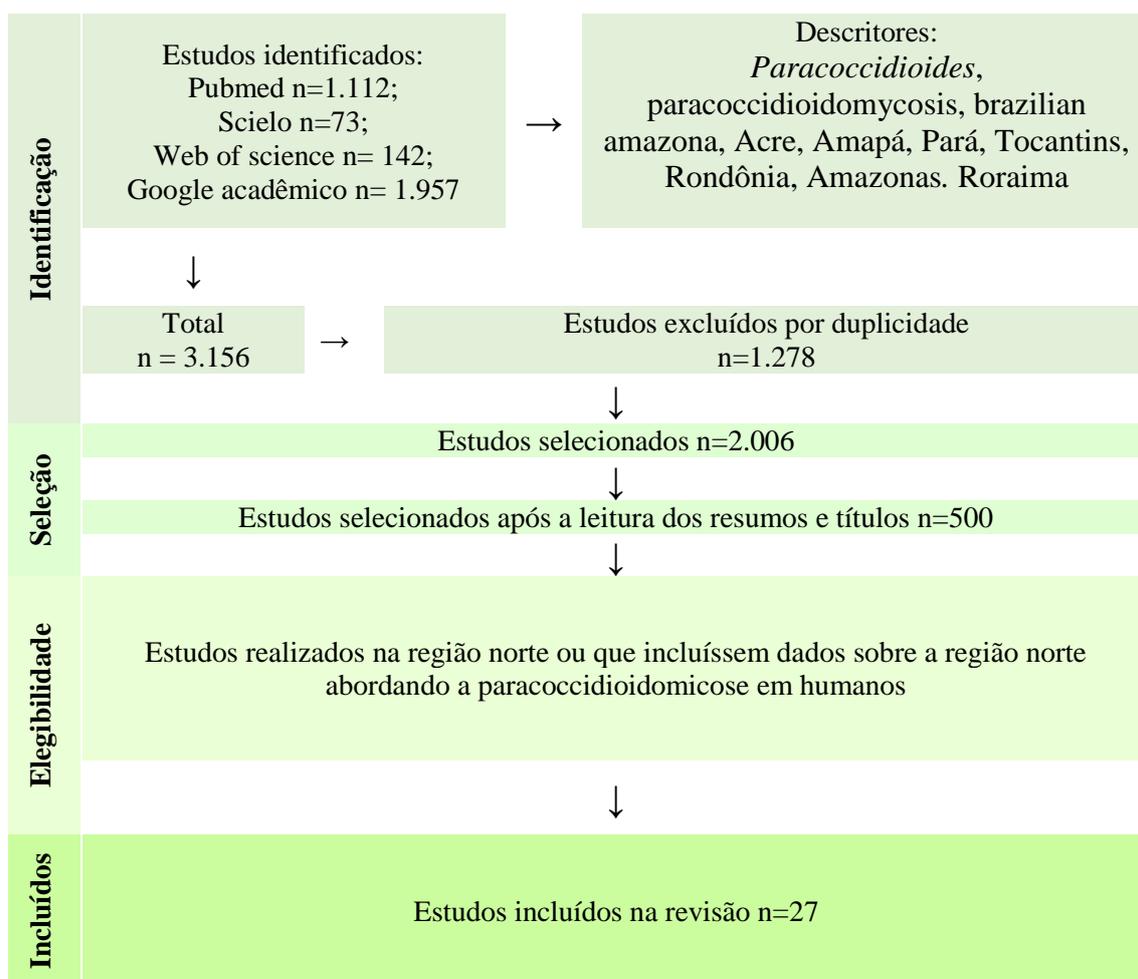


Figura 1. Fluxograma da identificação e seleção dos artigos de revisão de literatura sobre Paracoccidioidomicose na Amazônia Brasileira.

Entre 1950 a 30 de junho de 2018, 4.515 casos de PCM foram registrados nos estudos realizados nos estados da Amazônia brasileira (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência absoluta dos números de casos de paracoccidiodomicose entre 1950-2018 nos estados da Amazônia brasileira.

| Estado | Período | Nº de casos | Referências |
|---------------|----------------|--------------------|-------------------------------|
| Pará | 1950 | 1 | GUIMARÃES; MACEDO, 1950 |
| | 1954 | 6 | AZEVEDO, 1954 |
| | 1980-1994 | 91 | VERAS, 1995 |
| | 1988-1996 | 14 | FONSECA et al., 1999 |
| | 2003 | 26 | PALHETA-NETO et al., 2003 |
| | 2011 | 1 | PONTES et al., 2011 |
| | 2012 | 2 | MARQUES-DA-SILVA et al., 2012 |
| | 2013 | 1 | MÜLLER; MIRANDA, 2013 |
| Total | | 142 | |
| Rondônia | 1952 | 2 | LEITE, 1952 |
| | 1983-1986 | 7 | COIMBRA, 1990 |
| | 1990 | 2 | COIMBRA JR et al., 1994 |
| | 1991 | 1 | VALLE et al., 1991 |
| | 1999 | 2 | FORJAZ et al., 1999 |
| | 1997-2008 | 1.608 | LIMA; ESCOBAR, 2010 |
| | 1997-2012 | 2.163 | VIEIRA et al., 2014 |
| | 2011-2014 | 364 | TOYOTANI, 2018 |
| | 2016 | 1 | ALEIXO et al., 2016 |
| 2017 | 107 | DURLACHER, 2017 | |
| Total | | 4.257 | |
| Amazonas | 1972 | 1 | CASTRILLÓN et al., 1972 |
| | 1988 | 19 | TALHARI et al., 1988 |
| | 2007 | 1 | TALHARI et al., 2007 |
| | 2011 | 1 | PEREIRA et al., 2011 |
| | 2011 | 1 | NOGUEIRA et al., 2011 |
| | 2014 | 1 | SAFE et al., 2014 |
| | 2016 | 3 | MATSUDA, 2016 |
| Total | | 27 | |
| Tocantins | 1985-1996 | 88 | FONSECA et al., 1999 |
| | 2016 | 1 | COSTA et al., 2016 |
| Total | | 89 | |
| Total Geral | | 4.515 | |

Rondônia, apresentou uma alta ocorrência de casos, com 94,3% (4.257). Nos estados do Pará foram relatados 3,1% (142) casos, Tocantins 1,9% (89) e Amazonas 0,6%

(27). Em contraste, os estados do Acre, Amapá e Roraima não apresentaram nenhum relato de caso da doença (Figura 2).

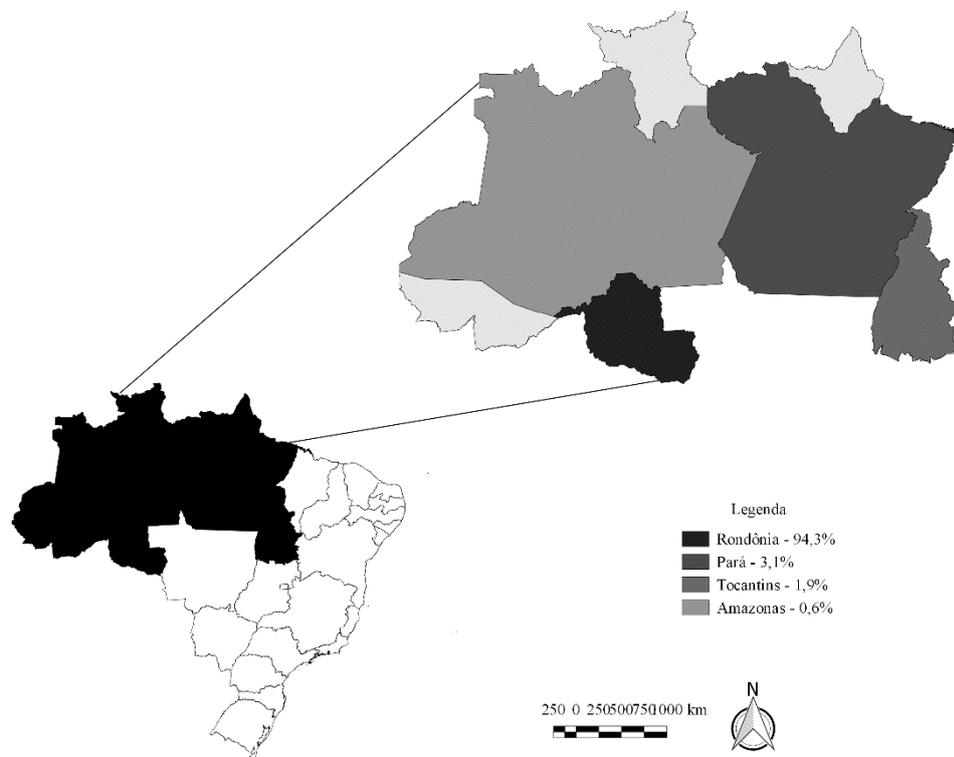


Figura 2. Frequência relativa de casos de paracoccidiodomicose por estado da Amazônia Brasileira entre 1950-2018.

Para o levantamento das características sociodemográficas dos pacientes, foram utilizados somente 20 artigos, pois, os outros sete artigos incluídos nesta revisão não continham as informações necessárias para a realização desta análise.

Os resultados obtidos por meio desta análise indicaram que a faixa etária mais frequente foi de 41-70, com 3.273 (74,5%). Em relação ao sexo, 3.929 (89,4%) e 509 (11,6%) dos casos foram observados em homens e mulheres, respectivamente. No que se refere à residência, 2.031 (46,2%) e 1.742 (39,7%) residiam em áreas urbanas e rurais, respectivamente. Quanto à atividade profissional 1.659 (37,8%) trabalhavam em alguma atividade no campo (Tabela 2)

O consumo que apresentou maior frequência foi o tabagismo com 82 (1,9%). Em relação às comorbidades infecciosas e oncológicas, 29 (0,7%) pacientes apresentavam tuberculose, 7 (0,2%) hanseníase, 5 (0,1%) infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), 3 (0,1%) por câncer, outros (0,1%) (Tabela 2).

Tabela 2. Características sociodemográficas dos pacientes diagnosticados com paracoccidiodomicose na Amazônia brasileira entre 1950-2018.

| Variável | Total | Frequência (%) | Não informados |
|--------------|-------|----------------|----------------|
| Idade | | | 122 |
| <20 | 333 | 7,6 | |
| 21-40 | 900 | 20,5 | |
| 41-70 | 3.273 | 74,5 | |
| Sexo | | | |
| Masculino | 3.929 | 89,4 | |
| Feminino | 509 | 11,6 | |
| Área | | | |
| Urbana | 2.031 | 46,2 | |
| Rural | 1.742 | 39,7 | |
| Ocupação | | | |
| Agricultor | 1.659 | 37,8 | |
| Motorista | 68 | 1,5 | |
| Construção | 13 | 0,3 | |
| Outros | 241 | 5,5 | |
| Consumo | | | |
| Etilista | 17 | 0,4 | |
| Tabagista | 82 | 1,9 | |
| Comorbidades | | | |
| Tuberculose | 29 | 0,7 | |
| HIV | 5 | 0,1 | |
| Câncer | 3 | 0,1 | |
| Hanseníase | 7 | 0,2 | |
| Leishmaniose | 1 | 0,0 | |
| Outros | 4 | 0,1 | |

Das análises mais utilizadas para relatar o diagnóstico da PCM, 1.369 (42,5%) casos foram com base na clínica e epidemiologia, 818 (26,6%) foram detectados por exame direto, 552 (18,0%) foram diagnosticados por exame histopatológico, 226 (7,3%)

imunodifusão dupla, 100 (3,3%) cultura, 10 (0,3%) Raio X (Figura 3).

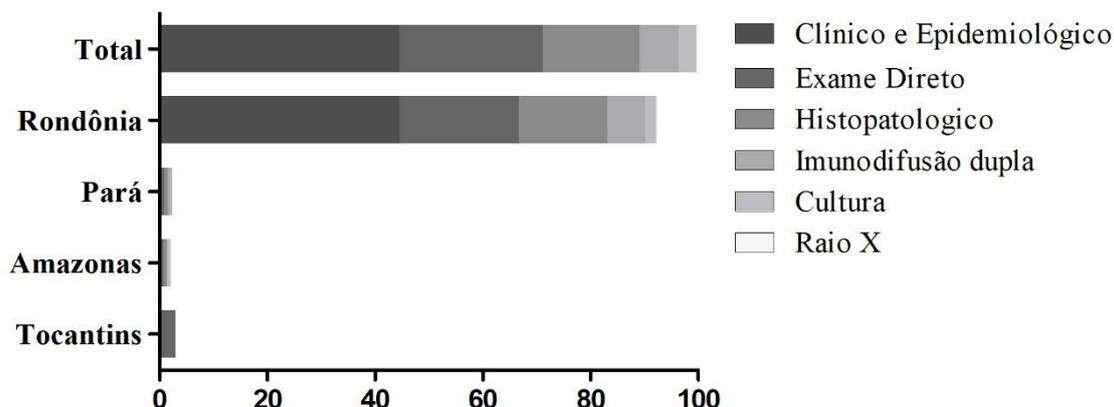


Figura 3. Frequência relativa dos métodos utilizados para o diagnóstico da paracoccidiodomicose.

Discussão

A paracoccidiodomicose é uma micose granulomatosa sistêmica, restrita a América Latina (CAMACHO; NIÑO-VEGA, 2017; MENDES et al., 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). No Brasil, as áreas de alta endemicidade compreendem as regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste (MENDES et al., 2017). Entretanto, nas últimas décadas, a região Amazônica foi considerada uma área hiperendêmica, fator este associado ao aumento da migração populacional, expansão agrícola e pecuária (COUTINHO et al., 2015; MARTINEZ, 2015; MARTINEZ, 2017).

Apesar de ser endêmica no Brasil, não é uma doença de notificação compulsória e isto proporciona o aumento do número de casos subnotificados, principalmente na região Norte do país, limitando o conhecimento sobre a real distribuição da doença em áreas de alta e baixa endemicidade (MENDES et al., 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Os casos de PCM só são registrados em estados onde a doença possui taxas epidemiológicas relevantes, justificando a alta frequência dos casos em Rondônia por ser

um dos poucos estados brasileiros em que a notificação da doença é obrigatória devido ao grande número de casos (VIEIRA et al., 2014).

O Estado de Rondônia apresentou uma frequência de 94,3%, e segundo estudos anteriores uma incidência média anual foi de 9,4 / 100.000 pessoas (MARTINEZ, 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). Este valor é relativamente alto quando comparado com a incidência anual do Brasil, que é de 1 a 3 / 100.000 pessoas (DO VALLE et al., 2017; TATAGIBA et al., 2018).

Estudos anteriores associam a frequência de PCM no Estado de Rondônia com as atividades agrícolas, incluindo áreas de criação de gado, plantio de soja, milho etc., e as características climáticas, como chuvas abundantes e áreas úmidas, que favorecem a propagação do fungo, levando ao surgimento de uma área hiperendêmica reconhecida desde a década de 1990 (FORJAZ et al., 1999; VIEIRA et al., 2014; TOYOTANI, 2018). Além disso, as atividades relacionadas ao manejo de solo são associadas ao risco de infecção pelo fungo, indicando que os trabalhadores rurais estão mais expostos ao desenvolvimento da doença (COIMBRA JR et al., 1994; VIEIRA et al., 2014; TOYOTANI, 2018).

O Pará apresentou uma frequência de 3,1%, nestes estudos foram feitos relatos sobre a presença da doença em crianças e apontaram este fato como sendo uma das possíveis formas de se identificar as áreas endêmicas do estado (VERAS, 1995; FONSECA et al., 1999). Além disso, o desmatamento foi apontado como sendo umas das possíveis causas do aumento da doença na região (FONSECA et al., 1999).

Os estados do Tocantins (1,9%) e Amazonas (0,6%) apresentaram baixa endemicidade, e o estado de Acre, Amapá e Roraima não possui nenhum relato de caso da doença. A ausência ou a baixa endemicidade da doença em algumas regiões podem ser associadas a fatores como, a migração humana devido ao longo período de latência da

doenças, e as dificuldades enfrentadas durante o diagnóstico para a obtenção de um fechamento clínico (COUTINHO et al., 2015; ARANTES et al., 2016).

Os Estados do Amapá e Acre não possui relatos da doença, entretanto, foram realizados inqueridos epidemiológicos com paracoccidioidina revelando um índice de reatividade de 31,8% e 1,9%, respectivamente (FAVA; FAVA NETO, 1998; FIGUEIREDO, 2005; FIGUEIREDO, 2011).

A frequência da paracoccidioidomicose infecção no Estado do Acre e Amapá, alerta a necessidade de novos estudos com o intuito de determinar a real distribuição da doença nestes Estados, bem como a inserção do diagnóstico diferencial nas unidades de saúde, para dar um suporte ao diagnóstico precoce e tratamento adequando da PCM.

A PCM geralmente se manifesta em pessoas com mais de 30 anos e que podem ou não ter estado em contato com o fungo nas primeiras décadas de vida (MARTINEZ, 2015; MENDES et al., 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). Estudos anteriores mostraram que a faixa etária de maior prevalência foi de 40 a 60 anos e que a doença raramente estava presente em crianças e adolescentes (PEÇANHA et al., 2017; TRINDADE et al., 2017; DE ARRUDA et al., 2018; DUTRA et al., 2018).

Neste trabalho, a faixa etária com maior prevalência foi a de 41- 70 anos de idade (74,5%), corroborando com os estudos anteriores que afirmam que a doença se manifesta anos depois do contato prévio com o fungo (MENDES et al., 2017). Este fato está associado ao uso crônico de álcool, cigarro, assim como também a depressão do sistema imunológico, contribuindo diretamente para o desenvolvimento da doença (MARTINEZ, 2015; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A predominância de pacientes do sexo masculino foi evidente, com 89,4%, resultados similares foram observados em São Paulo (SP), com 85,8% (BELLISSIMO-

RODRIGUES et al., 2011), e no Espírito Santo (ES), com 93,2% (PEÇANHA et al., 2017).

Diversos estudos atribuem este fato, em parte, devido às alterações hormonais e imunológicas que ocorrem na mulher. A produção de estrogênio que inibe a transformação dos conídios em leveduras e também modulam a resposta imune celular contra o fungo, inibindo a progressão da doença (CHADEGANIPOUR; MOHAMMADI, 2015; TATAGIBA et al., 2018). Além disso, a proporção do sexo masculino envolvidos em atividades agrícolas é maior que a do sexo feminino, justificando a predominância do sexo masculino com a PCM-doença (TRINDADE et al., 2017).

Em relação à área de residência, os casos observados em áreas urbanas (46,2%) e rurais (39,7%) foram semelhantes. É importante salientar que deve-se ter cuidado ao avaliar tais resultados, pois muitos indivíduos que residem em áreas urbanas realizam atividades laborais relacionadas ao âmbito agrícola ou mesmo de lazer que geralmente envolve contato com partículas infectantes, propiciando o desenvolvimento da doença (VIEIRA et al., 2014).

No que se refere a ocupação profissional, os indivíduos que realizavam atividades relacionadas ao manejo do solo, apresentaram maior frequência com 37,8%. Corroborando com os resultados apresentados neste estudo, a grande maioria dos pacientes com PCM relataram contato atual ou passado com o meio rural devido à sua profissão ou residência (DE ALMEIDA et al., 2018; DE ARRUDA et al., 2018; DUTRA et al., 2018).

Neste estudo, 1,9% dos indivíduos consumiam tabaco, e 0,4% o álcool. Pesquisas posteriores, afirmam que o tabagismo é um fator predisponente para o desenvolvimento da doença, devido alterações das atividades mucociliar e as mudanças do sistema imunológico (MAGALHÃES et al., 2014). Em relação à dependência do álcool, acredita-

se que este seja um cofator de risco ao tabagismo (MARTINEZ, 2017; MENDES et al., 2017).

Acredita-se que fatores predisponentes da PCM promovem a coinfeção com a tuberculose, leishmaniose, hanseníase etc. Além disso, *Paracoccidioides* spp. pode ser oportunista em pacientes com imunidade celular reduzida como resultado de doença subjacente ou tratamentos imunossupressores (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Entre os casos analisados, 49 (1,1%) pacientes apresentaram doenças concomitantes à PCM, sendo a tuberculose (TB) a mais frequente com 0,6% dos casos. A coinfeção da paracoccidioidomicose com a TB, esta associada à deficiência da produção de certas citocinas, como a interleucina-12 e 23 e interferon gama, bem como de seus receptores (FERREIRA et al., 2017).

Os métodos mais utilizados para relatar a frequência da doença foi através de exames clínicos e epidemiológicos (42,5%) e exames diretos (26,6%), resultados distintos foram apresentados em diversos estudos, onde foram utilizados os exames direto e histopatológico para relatar a ocorrência dos casos (VIEIRA et al., 2014; PEÇANHA et al., 2017; DUTRA et al., 2018).

Conclusão

A análise epidemiológica da paracoccidioidomicose na Amazônia brasileira revelou que o estado de Rondônia apresentaram uma maior endemicidade, sendo a o principal grupo de pacientes homem entre 41-70 anos, morador de zona rural, cuja a principal ocupação é a agricultura. A principal forma de diagnóstico realizada para confirmar PCM é o clínico epidemiológico.

Referências

- ALEIXO, R. Q.; RODRIGUES, M. T. V.; DO NASCIMENTO, D. O. R.; OLIVEIRA, D. T. Manifestações bucais da paracoccidiodomicose: a importância para o cirurgião-dentista—relato de caso. **Clínica e Pesquisa em Odontologia-UNITAU**, v. 8, n. 2, p. 45-50, 2016.
- ARANTES, T. D.; THEODORO, R. C.; DE MELO TEIXEIRA, M.; BOSCO, S. d. M. G.; BAGAGLI, E. Environmental mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil reveals new clues into genetic diversity, biogeography and wild host association. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. 1-18, 2016.
- AZEVEDO, P. **Algumas considerações sobre a blastomicose sul-americana e seu agente etiológico**. 1954.95 p. Tese, Universidade Federal do Pará, Belém, 1954.
- BELLISSIMO-RODRIGUES, F.; MACHADO, A. A.; MARTINEZ, R. Paracoccidiodomycosis 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**, v. 85, n. 3, p. 546-550, 2011.
- BOULOS, M.; LABONIA FILHO, W.; DRAIBE, S. Inquérito imuno-alérgico com paracoccidiodina e histoplasmina nas localidades de Itupiranga e São João do Araguaia. Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 1975.
- BRAGA, F. G.; RUAS, L. P.; PEREIRA, R. M.; LIMA, X. T.; ANTUNES, E.; MAMONI, R. L.; BLOTTA, M. H. S. L. Functional and phenotypic evaluation of eosinophils from patients with the acute form of paracoccidiodomycosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 5, p. 1-17, 2017.
- CAMACHO, E.; NIÑO-VEGA, G. A. *Paracoccidioides* spp.: virulence factors and immune-evasion strategies. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, n.1, p.1-19, 2017.
- CASTRILLÓN, A. L.; CARVALHO, R. F. d.; BORBOREMA, C. A.; PECHER, S. A. Paracoccidiodomicose na Amazônia.(Registro de um caso). **Acta Amazonica**, v. 2, n. 3, p. 55-58, 1972.
- CHADEGANIPOUR, M.; MOHAMMADI, R. Steroid-binding receptors in fungi: implication for systemic mycoses. **Current Medical Mycology**, v. 1, n. 2, p. 46, 2015.
- CHAVES, A. F.; CASTILHO, D. G.; NAVARRO, M. V.; OLIVEIRA, A. K.; SERRANO, S. M.; TASHIMA, A. K.; BATISTA, W. L. Phosphosite-specific regulation of the oxidative-stress response of *Paracoccidioides brasiliensis*: a shotgun phosphoproteomic analysis. **Microbes and Infection**, v. 19, n. 1, p. 34-46, 2017.
- COIMBRA, C. J. **From shifting cultivation to coffee farming: the impact of change on the health and ecology of the surui indians in the Brazilian Amazon**. 1990. Tese, Universidade de Indiana, U.S.A, 1990.

COIMBRA JR, C.; WANKE, B.; SANTOS, R.; VALLE, A. D.; COSTA, R.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. Paracoccidioidin and histoplasmin sensitivity in Tupí-Mondé Amerindian populations from Brazilian Amazonia. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 88, n. 2, p. 197-207, 1994.

COSTA, V. E. A. C.; DE BRITO, I. P.; MEIRA, A. A.; MILAGRES, F. A. d. P. Relato de caso: paracoccidioidomicose juvenil. **Revista de Patologia do Tocantins**, v. 3, n. 3, p. 3-9, 2016.

COUTINHO, Z. F.; WANKE, B.; TRAVASSOS, C.; OLIVEIRA, R. M.; XAVIER, D. R.; COIMBRA, C. E. Hospital morbidity due to paracoccidioidomycosis in Brazil (1998–2006). **Tropical Medicine and International Health**, v. 20, n. 5, p. 673-680, 2015.

DA SILVA, J. d. F.; DE OLIVEIRA, H. C.; MARCOS, C. M.; ASSATO, P. A.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Advances and challenges in paracoccidioidomycosis serology caused by *Paracoccidioides* species complex: an update. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 84, n. 1, p. 87-94, 2016.

DE ALMEIDA, S. M.; SALVADOR, G. L.; ROZA, T. H.; IZYCKI, L. F.; DOS SANTOS, I.; ARAGÃO, A.; KULIK, A.; MURO, M.; TORRES, L. F. B.; DE NORONHA, L. H. Geographical evaluation of neuroparacoccidioidomycosis and Paracoccidioidomycosis in southern Brazil. **Mycoses**, v. 61, n.1, p. 587-593, 2018.

DE ARAUJO EYER-SILVA, W.; SANTANA, A. C.; DA SILVA, G. A. R.; DE AZEVEDO, M. C. V. M.; BARRETO, J. L. T. M. S.; NEUMANN, M. A.; DE CASTRO, I. J.; BASÍLIO-DE-OLIVEIRA, R. P.; DE ARAUJO, L. F.; RÉ, N. Z. Laryngeal paracoccidioidomycosis presenting as solitary true vocal fold disease. **IDCases**, v. 10, n.1, p. 71-74, 2017.

DE ARRUDA, J. A. A.; SCHUCH, L. F.; ABREU, L. G.; SILVA, L. V. d. O.; MOSCONI, C.; MONTEIRO, J. L. G. C.; BATISTA, A. C.; HILDEBRAND, L. d. C.; MARTINS, M. D.; SOBRAL, A. P. V. A multicentre study of oral paracoccidioidomycosis: analysis of 320 cases and literature review. **Oral Diseases**, v. 24, n. 8, p. 1492-1502, 2018.

DE MACEDO, P. M.; ALMEIDA-PAES, R.; FREITAS, D. F. S.; VARON, A. G.; PAIXÃO, A. G.; ROMÃO, A. R.; COUTINHO, Z. F.; PIZZINI, C. V.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; DO VALLE, A. C. F. Acute juvenile Paracoccidioidomycosis: A 9-year cohort study in the endemic area of Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 3, p. 1-11, 2017.

DE MACEDO, P. M.; DE OLIVEIRA, L. C.; FREITAS, D. F. S.; DA ROCHA, J. A.; FREITAS, A. D. Á.; NUCCI, M.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; ALMEIDA-PAES, R.; DO VALLE, A. C. F. Acute Paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides brasiliensis* S1 mimicking hypereosinophilic syndrome with massive splenomegaly: diagnostic challenge. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. 1-4, 2016.

DE OLIVEIRA, H. C.; ASSATO, P. A.; MARCOS, C. M.; SCORZONI, L.; DE PAULA, E. S.; ANA, C.; DA SILVA, J. D. F.; SINGULANI, J. d. L.; ALARCON, K.

M.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. *Paracoccidioides*-host interaction: an overview on recent advances in the paracoccidioidomycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n.1, p. 1-20, 2015.

DO VALLE, A. C. F.; DE MACEDO, P. M.; ALMEIDA-PAES, R.; ROMÃO, A. R.; DOS SANTOS LAZÉRA, M.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis after highway construction, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 11, p. 1917, 2017.

DURLACHER, R. R. **Lesões orais e correlação com aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais da paracoccidioidomicose**. 2017. Doutorado (Ciências Odontológica) -Universidade Estadual Paulista - UNESP, São Paulo, 2017.

DUTRA, L. M.; SILVA, T. H.; FALQUETO, A.; PEÇANHA, P. M.; SOUZA, L. R.; GONÇALVES, S. S.; VELLOSO, T. R. Oral paracoccidioidomycosis in a single-center retrospective analysis from a Brazilian southeastern population. **Journal of Infection and Public Health**, v. 11, n. 4, p. 530-533, 2018.

FAVA, S. D. C.; FAVA NETTO, C. Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidioidin sensitivity in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40, n. 3, p. 155-164, 1998.

FERNANDES, F. F.; OLIVEIRA, A. F.; LANDGRAF, T. N.; CUNHA, C.; CARVALHO, A.; VENDRUSCOLO, P. E.; GONÇALES, R. A.; ALMEIDA, F.; DA SILVA, T. A.; RODRIGUES, F. Impact of paracoccin gene silencing on *Paracoccidioides brasiliensis* Virulence. **Mbio**, v. 8, n. 4, p. 1-12, 2017.

FERREIRA, DM.D.; LEVY, A.; BARROS, N.C.; BERTOLINI, D.L.; VASCONCELOS, D.M. Case report of myeloperoxidase deficiency associated with disseminated paracoccidioidomycosis and peritoneal tuberculosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v, 50, n. 4, p.568-570, 2017.

FIGUEIREDO, M. B. **Inquérito com paracoccidioidina e Histoplasmina em Distrito Docente-assistencial do Tucumã**. 2005. Tese (Mestrado em Medicina e Saúde) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2005.

FIGUEIREDO, M. B. **Inquérito com paracoccidioidina em cinco cidades do Estado do Acre**. 2011. Tese (Doutorado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

FONSECA, E. R.; PARDAL, P. P.; SEVERO, L. C. Paracoccidioidomycosis in children in Belém, Pará State, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 1, p. 31-33, 1999.

FORJAZ, M. H.; FISCHMAN, O.; CAMARGO, Z. P. d.; VIEIRA FILHO, J. P. B.; COLOMBO, A. L. Paracoccidioidomycosis in Amerindian populations of the Brazilian surui tribe: a clinical and laboratory study of two cases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 5, p. 571-575, 1999.

GAVIRIA, M.; RIVERA, V.; MUÑOZ-CADAVID, C.; CANO, L. E.; NARANJO, T. W. Validation and clinical application of a nested PCR for paracoccidioidomycosis diagnosis in clinical samples from Colombian patients. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 4, p. 376-383, 2015.

GUIMARÃES, F.; MACEDO, D. Contribuição ao estudo das blastomicoses na Amazônia (blastomicose sul-americana). **Hospital**, v. 38, n. p. 223-253, 1950.

LEITE, A. Alguns casos de blastomicose sul-americana em Porto Velho, Território Federal do Guaporé. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 9, n. p. 491-496, 1952.

MACEDO, P. M.; ALMEIDA-PAES, R.; DE MEDEIROS MUNIZ, M.; OLIVEIRA, M. M. E.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; COSTA, R. L. B.; DO VALLE, A. C. F. *Paracoccidioides brasiliensis* PS2: first autochthonous paracoccidioidomycosis case report in Rio de Janeiro, Brazil, and literature review. **Mycopathologia**, v. 181, n. 9-10, p. 701-708, 2016.

MAGALHAES, E.M.S.; RIBEIRO, C.F.; DAMASO, C.S; COELHO, L.F.L.; SILVA, R.R.; FERREIRA, E.B.; RODRIGUES, M.R.; CAMARGO, Z.P.; VELLOSO, T.R.G.; MALAQUIS, L.C.C. Prevalência da paracoccidioimicose por intradermorreação em áreas rurais de Alfenas, Minas Gerais, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 4, p. 281-285, 2014.

MARCOS, C. M.; DA SILVA, J. d. F.; DE OLIVEIRA, H. C.; ASSATO, P. A.; SINGULANI, J. d. L.; LOPEZ, A. M.; TAMAYO, D. P.; HERNANDEZ-RUIZ, O.; MCEWEN, J. G.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Decreased expression of 14-3-3 in *Paracoccidioides brasiliensis* confirms its involvement in fungal pathogenesis. **Virulence**, v. 7, n. 2, p. 72-84, 2016.

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

MARQUES, S.; STOLF, H.; DILLON, N. Inquérito epidemiológico com paracoccidioidina e histoplasmina em Itaporanga, SP In: colóquio internacional sobre a paracoccidioidomycose. **Recinto Quirama, Rio Negro, Antioquia, Colômbia**, v.1, n.1, p. 66, 1986.

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

MARTINEZ, R. New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 1-13, 2017.

MENDES, R. P.; DE SOUZA CAVALCANTE, R.; MARQUES, S. A.; MARQUES, M. E. A.; VENTURINI, J.; SYLVESTRE, T. F.; PANIAGO, A. M. M.; PEREIRA, A. C.; DA SILVA, J. d. F.; FABRO, A. T. Paracoccidioidomycosis: current perspectives from Brazil. **The open Microbiology Journal**, v. 11, n.1, p. 224, 2017.

MOHER, D.; SHAMSEER, L.; CLARKE, M.; GHERSI, D.; LIBERATI, A.; PETTICREW, M.; SHEKELLE, P.; STEWART, L. A. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. **Systematic Reviews**, v. 4, n. 1, p. 1, 2015.

MOK, W.; NETTO, C. F. Paracoccidioidin and histoplasmin sensitivity in Coari (State of Amazonas), Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 27, n. 4, p. 808-814, 1978.

MOK, W. Y.; AYRES, C.; MCMILLEN, S. Levantamento sorológico de quatro micoses profundas no estado do Amazonas, Brasil **Acta Amazonica**, v. 9, n. 1, p. 75-78, 1979.

MÜLLER, S. F. R.; MIRANDA, M. F. R. d. Sarcoid-like paracoccidioidomycosis presenting with perineural granuloma. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, n. 6, p. 994-995, 2013.

MUÑOZ, J. F.; FARRER, R. A.; DESJARDINS, C. A.; GALLO, J. E.; SYKES, S.; SAKTHIKUMAR, S.; MISAS, E.; WHISTON, E. A.; BAGAGLI, E.; SOARES, C. M. Genome diversity, recombination, and virulence across the major lineages of *Paracoccidioides*. **American Society for Microbiology**, v. 1, n. 5, p. 1-18, 2016.

MUÑOZ, J. F.; MCEWEN, J. G.; CLAY, O. K.; CUOMO, C. A. Genome analysis reveals evolutionary mechanisms of adaptation in systemic dimorphic fungi. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2018.

NAIFF, R. D.; BARRET, T. V.; ARIAS, J. R.; NAIFF, M. F. Encuesta epidemiológica de histoplasmosis, paracoccidioidomycosis y leishmaniasis mediante pruebas cutaneas. *Boletín de la Oficina Sanitari Panamerica*, v.104, n.1, p., 1988.

NOGUEIRA, L. M. C.; SANTOS, M.; FERREIRA, L. C. d. L.; TALHARI, C.; RODRIGUES, R. R.; TALHARI, S. AIDS-associated paracoccidioidomycosis in a patient with a CD4+ T-cell count of 4 cells/mm³. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 129-132, 2011.

PALHETA-NETO, F. X.; MOREIRA, J. S.; MARTINS, A. C. d. C.; CRUZ, F. J.; GOMES, E. R.; PEZZIN-PALHETA, A. C. Estudo de 26 casos de paracoccidioidomycose avaliados no serviço de otorrinolaringologia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 69, n. p. 622-627, 2003.

PARENTE-ROCHA, J. A.; PARENTE, A. F. A.; BAEZA, L. C.; BONFIM, S. M. R. C.; HERNANDEZ, O.; MCEWEN, J. G.; BAILÃO, A. M.; TABORDA, C. P.; BORGES, C. L.; DE ALMEIDA SOARES, C. M. Macrophage interaction with *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells modulates fungal metabolism and generates a response to oxidative stress. **PloS One**, v. 10, n. 9, p. 1-18, 2015.

PEÇANHA, P. M.; FERREIRA, M. E. B.; PEÇANHA, M. A. M.; SCHMIDT, E. B.; DE ARAÚJO, M. L.; ZANOTTI, R. L.; POTRATZ, F. F.; NUNES, N. E. D.; FERREIRA JR, C. U. G.; DELMAESTRO, D. Paracoccidioidomycosis: epidemiological and clinical aspects in 546 cases studied in the State of Espírito Santo, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 3, p. 836-844, 2017.

PEREIRA, P. M. R.; AKEL, P. B. d. M.; LIMA, L. L. d.; KIMURA, E. N.; JALKH, A. P. Multifocal paracoccidioidomycosis: a diagnostic challenge due to late cutaneous manifestation. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 1, p. 149-152, 2011.

PONTES, H. A. R.; GUIMARÃES, D. M.; PONTES, F. S. C.; PAIVA, H. B.; PINTO, L. C. D. a.; DE FREITAS SILVA, B. S.; DOS SANTOS PINTO JR, D. Kaposi sarcoma and paracoccidioidomycosis in the same fragment of oral mucosa biopsy: a rare association in human immunodeficiency virus-positive patient. A case report. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 69, n. 2, p. 196-199, 2011.

REZENDE, M.; SOUZA, O. Estudo epidemiológico com a reação intradérmica com a histoplasmina em Belém, Pará. CONGRESSO DA SOCIDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL.1975.

SAFE, I. P.; VALLE, F. F. d.; MAIA, D. C. C.; AGONIO, B.; MONTE, R. L.; ARAUJO, J. d. R.; CORDEIRO-SANTOS, M. Extra-pulmonary manifestations of paracoccidioidomycosis associated with acquired immunodeficiency syndrome: a case report. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 1, p. 150-153, 2014.

SCORZONI, L.; DE PAULA E SILVA, A. C. A.; SINGULANI, J. d. L.; LEITE, F. S.; DE OLIVEIRA, H. C.; MORAES DA SILVA, R. A.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Comparison of virulence between *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* using *Galleria mellonella* as a host model. **Virulence**, v. 6, n. 8, p. 766-776, 2015.

SHAMSEER, L.; MOHER, D.; CLARKE, M.; GHERSI, D.; LIBERATI, A.; PETTICREW, M.; SHEKELLE, P.; STEWART, L. A. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015: elaboration and explanation. **British Medical Journal**, v. 349, n. p. 1-25, 2015.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; QUEIROZ-TELLES, F. d.; KONO, A. S. G.; PANIAGO, A. M.; NATHAN, A.; VALLE, A. C. F. d.; BAGAGLI, E.; BENARD, G. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 715-740, 2017.

TABORDA, C.; URÁN, M.; NOSANCHUK, J. D.; TRAVASSOS, L. Paracoccidioidomycosis: challenges in the development of a vaccine against an endemic mycosis in the Americas. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 19, p. 21-24, 2015.

TALHARI, C.; BRAGA DE SOUZA, J. V.; PARREIRA, V. J.; REINEL, D.; TALHARI, S. Oral exfoliative cytology as a rapid diagnostic tool for paracoccidioidomycosis. **Mycoses**, v. 51, n. 2, p. 177-178, 2007.

TALHARI, S.; CUNHA, M. d. G. S.; SCHETTINI, A. P. M.; TALHARI, A. C. Deep mycoses in Amazon region. **International Journal of Dermatology**, v. 27, n. 7, p. 481-484, 1988.

TAMAYO, D.; MUÑOZ, J. F.; ALMEIDA, A. J.; PUERTA, J. D.; RESTREPO, Á.; CUOMO, C. A.; MCEWEN, J. G.; HERNÁNDEZ, O. *Paracoccidioides* spp. catalases and their role in antioxidant defense against host defense responses. **Fungal Genetics and Biology**, v. 100, n. p. 22-32, 2017.

TAMAYO, D.; MUÑOZ, J. F.; LOPEZ, Á.; URÁN, M.; HERRERA, J.; BORGES, C. L.; RESTREPO, Á.; SOARES, C. M.; TABORDA, C. P.; ALMEIDA, A. J. Identification and analysis of the role of superoxide dismutases isoforms in the pathogenesis of *Paracoccidioides* spp. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1-23, 2016.

TATAGIBA, L. S.; PIVATTO, L. B.; FACCINI-MARTÍNEZ, Á. A.; PEÇANHA, P. M.; VELLOSO, T. R. G.; GONÇALVES, S. S.; RODRIGUES, A. M.; CAMARGO, Z. P.; FALQUETO, A. A case of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii* presenting sarcoid-like form. **Medical Mycology Case Reports**, v. 19, n. p. 6-8, 2018.

TOYOTANI, B. J. S. **Incidência da paracoccidioidomicose no estado de Rondônia–2011 a 2014**. 2018. Graduação (Bacharelado em Biomedicina) - Universidade São Lucas Porto Velho, 2018.

TRINDADE, A. H.; MEIRA, H. C.; PEREIRA, I. F.; DE LACERDA, J. C. T.; DE MESQUITA, R. A.; SANTOS, V. R. Oral paracoccidioidomycosis: Retrospective analysis of 55 Brazilian patients. **Mycoses**, v. 60, n. 8, p. 521-525, 2017.

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

VALLE, A. C. F. d.; COIMBRA JUNIOR, C. E.; BORNAY LLINARES, F. I.; MONTEIRO FILHO, P. C.; GUIMARAES, M. R. C. Paracoccidioidomicose entre o grupo indígena suruí de Rondônia, Amazônia, Brasil: Registro de caso. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.1, n. p. 407-411, 1991.

VENTURINI, J.; CAVALCANTE, R. S.; SYLVESTRE, T. F.; SANTOS, R. F. d.; MORIS, D. V.; CARVALHO, L. R.; ARRUDA, M. S. P. d.; GOLIM, M. d. A.; MENDES, R. P. Increased peripheral blood TCD4+ counts and serum SP-D levels in patients with chronic paracoccidioidomycosis, during and after antifungal therapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 11, p. 748-755, 2017.

VERAS, K. **Paracoccidioidomicose. Estudo epidemiológico e clínico de pacientes internados no Hospital de Doenças Infecto-Contagiosas (HDIC) em Teresina, Piauí. Identificação de reserváreas nos Estados do Pará e Maranhão. Identificação de reservareas nos Estados do Pará e Maranhão**. 1995. Tese - Fundação Oswaldo Cruz, Universidade Federal do Piauí, Teresina, P1, 1995.

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

Capítulo II - Ocorrência de *Paracoccidioides* spp. em solos da Amazônia Sul-Occidental

Iasminy Ranielly Silva Ferreira¹; Luiza Catharina Martins²; Atilon Vasconcelos de Araújo³; Leila Priscila Peters⁴, Clarice Maia Carvalho^{1,3,4,5}.

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil.

² Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil.

³ Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal - BIONORTE, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil.

⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil.

⁵ Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil.

Resumo

Paracoccidioides brasiliensis e *P. lutzii* são os agentes etiológicos da paracoccidioidomicose (PCM), uma micose granulomatosa sistêmica, endêmica na América Latina, associada a áreas rurais e a trabalhadores agrícolas. Sabe-se que *Paracoccidioides* spp. tem o seu habitat localizado no solo, no entanto a ecologia da espécie permanece pouco conhecida. Desta forma, este estudo teve por objetivo relatar a ocorrência de *Paracoccidioides* spp. em amostras de solos da Amazônia Sul-Occidental. Foram coletadas dez amostras superficiais de solo de dez propriedades rurais localizadas no município de Rio Branco, Acre. O isolamento dos fungos foi realizado por meio do método de diluição seriada, onde foram inoculados 200 µL da diluição 10⁻³ em meio CTC (BDA - Batata, Dextrose e Ágar, suplementado com Cloranfenicol, Tiabendazol e Ciclohexamida) e incubados a 28 °C por 21 dias. Os fungos que apresentaram crescimento em meio CTC foram transferidos para tubos contendo meio BDA. As colônias crescidas foram inoculadas em meio Ágar Sabouraud-Dextrose (SDA) e em meio ágar infusão de cérebro e coração de bois (BHI) e incubadas a 28 e 37 °C, respectivamente. Para identificação dos fungos foram observadas as características macro e micromorfológicas por meio da técnica de microcultivo. Os isolados foram submetidos à caracterização molecular utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase. As sequências obtidas foram analisadas na base de dados do GenBank e uma árvore filogenética foi construída pelo método de Neighbor Joining. Foram identificados quatro (1,86%) isolados que apresentaram características morfológicas e morfoconversão características do gênero *Paracoccidioides*. A amostras de solo foi submetida a análise molecular onde revelou 99,0% de identidade com a *Gongronella cf. butlerii*; no entanto, esta espécie não apresenta semelhanças micromorfológica com o isolado em estudo. Estudos futuros serão realizados utilizando a técnica de biologia molecular com primers mais específicos, a fim de determinar a espécie deste isolado.

Palavras-chave: Acre, Amazônia, Paracoccidioidomicose.

Abstract

Paracoccidioides brasiliensis and *P. lutzii* are the etiological agents of paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic granulomatous mycosis, endemic in Latin America, associated with rural areas and agricultural workers. It is known that *Paracoccidioides* spp. has its habitat located in the soil, however the ecology of the species remains little known. Thus, this study aimed to report the occurrence of *Paracoccidioides* spp. in soil samples from the South-Western Amazon. Ten soil surface samples were collected from ten rural properties located in the municipality of Rio Branco, Acre. Isolation of the fungi was done by the serial dilution method, where 200 µL of the 10⁻³ dilution in CTC medium (BDA - Potato, Dextrose and Agar, supplemented with Chloramphenicol, Thiabendazole and Cyclohexamide) were inoculated and incubated at 28 ° C 21 days. Fungi showing growth on CTC medium were transferred to tubes containing BDA medium. The cultured colonies were inoculated in Sabouraud-Dextrose Agar (SDA) medium and broth and bull heart (BHI) agar medium and incubated at 28 and 37 ° C, respectively. To identify the fungi, the macro and micromorphological characteristics were observed through the microculture technique. The isolates were submitted to molecular characterization using the polymerase chain reaction technique. The sequences obtained were analyzed in the GenBank database and a phylogenetic tree was constructed by the Neighbor Joining method. Four isolates (1.86%) were identified that presented morphological characteristics and morphoconversion characteristics of the genus *Paracoccidioides*. The soil samples were submitted to molecular analysis where it revealed 99.0% identity with *Gongronella cf. butleri*, however, this species does not present micromorphological similarities with the isolate under study. Future studies will be carried out using the molecular biology technique with more specific primers in order to determine the species of this isolate.

Key words: Acre, Amazon, Paracoccidioidomycosis.

Introdução

Os estudos sobre os aspectos biológicos e ecológicos do gênero *Paracoccidioides* vem sendo desenvolvido por vários grupos de pesquisas nos últimos anos, com o intuito de isolar este microrganismo em amostras clínicas e ambientais, a fim de obter dados mais concretos sobre os fatores ecológicos que determinam sua distribuição geográfica (FRANCO et al., 2000; THEODORO et al., 2005; ARANTES et al., 2013; ARANTES et al., 2016).

O gênero *Paracoccidioides* foi descrito pela primeira vez, em 1908, por Adolf Lutzii, e atualmente é constituído pelo complexo *P. brasilienses* e a espécie *P. lutzii*. Trata-se de um fungo termodimórfico que apresentam a forma micelial (saprofítica) a temperatura de 28 °C e leveduriforme (parasitaria) à 37 °C (RESTREPO et al., 2015; DA

COSTA et al., 2016; GARCIA-RODAS; NOSANCHUK, 2016). Ambas as espécies pertencem ao Filo Ascomycota e a Família Ajellomycetaceae, sendo caracterizados como os agentes etiológicos da paracoccidiodomicose (PCM), uma micose granulomatosa sistêmica (TABORDA et al., 2015; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A paracoccidiodomicose é adquirida por aerossolização do solo e inalação dos conídios infectantes pelo hospedeiro, que ao atingir o epitélio dos alvéolos pulmonares convertem-se em leveduras, e conseqüentemente, leva a progressão da doença (MENDES et al., 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017; MUÑOZ et al., 2018). A população mais acometida são trabalhadores rurais, que realizam atividades de manejo de solo, predominantemente do sexo masculino e na faixa etária de 30 a 60 anos, sua fase mais produtiva, causando um alto impacto socioeconômico (TABORDA et al., 2015; MARTINEZ, 2017; MENDES et al., 2017).

A PCM é endêmica em países da América Latina, sendo cerca de 80% das casuísticas relatadas no Brasil, com o maior número de casos assinalado nos estados de São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Goiás (MARTINEZ, 2015; MARTINEZ, 2017). O Brasil apresenta uma incidência anual de 0,71 a 3,7 a cada 100.000 habitantes, e uma taxa de mortalidade de 1,45 por 1.000.000 habitantes (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017; BERNARDES FILHO et al., 2018).

Embora o nicho ecológico de *Paracoccidioides* spp. não esteja ainda exatamente determinado (ARANTES et al., 2016; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017), estudos prévios comprovaram que este microrganismo possui um sistema enzimático capaz de degradar o material vegetal do solo, indicando ser o seu possível habitat (PIGOSSO et al., 2013; ARANTES et al., 2016).

No entanto, as dificuldades enfrentadas pelos estudos ambientais limitam o entendimento sobre a ecologia e a real distribuição desse gênero em áreas endêmicas e

não endêmicas da PCM (THEODORO et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2014; ARANTES et al., 2016). A identificação de áreas de risco associadas às diferentes espécies contribuiu para um melhor entendimento da biogeografia de *Paracoccidioides* spp. (ARANTES et al., 2016). Desta forma, este estudo teve por objetivo relatar a ocorrência de *Paracoccidioides* spp. em amostras de solos da Amazônia Sul-Occidental.

Material e Métodos

Isolamento

Foram coletadas nos meses de Janeiro de 2017, dez amostras de solo em dez fazendas com criações de bovinos leiteiros no Município de Rio Branco, Acre (10°59'07" S;67°07'46" W). Em cada ponto foram coletados aproximadamente, 30 g de solo que foram armazenadas em sacos plásticos devidamente identificados, conservadas em temperatura ambiente e encaminhadas em isopor para o Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Acre – UFAC.

As amostras foram processadas no prazo de até 24 horas após a coleta. O isolamento dos fungos foi realizado por meio do método de diluição seriada, onde, 2 g de solo de cada amostra foram transferidas para 18 mL de solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9% previamente esterilizada e homogeneizada a 120 rpm a 28 °C durante 1h. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas em uma concentração de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} (SHARMA et al., 2017).

Foram inoculados 200 µL da diluição 10^{-3} em meio CTC (BDA - Batata, Dextrose e Ágar 42 g, suplementado com Cloranfenicol 0,5 g, Tiabendazol 0,001g e Ciclohexamida 0,25g). Em seguida incubados a 28 °C e observados diariamente durante 21 dias (FERNANDES et al., 2010). Os fungos que apresentaram crescimento micelial no meio CTC foram transferidos para tubos contendo meio BDA e incubados a temperatura

ambiente, após sete dias de incubação os isolados foram avaliados de acordo com as suas características macroscópicas e os semelhantes foram agrupados em morfoespécies.

Caracterização morfológica

As colônias mantidas em meio BDA foram inoculadas em meio Ágar Sabouraud-Dextrose (SDA) e incubado a 28 °C (SILVA-VERGARA et al., 1998). E para demonstrar a conversão para a forma leveduriforme, as colônias filamentosas provenientes do meio SDA foram inoculadas em meio de Ágar infusão de cérebro e coração (BHI) e incubadas a 37 °C (MONTENEGRO et al., 1996).

Para identificação dos fungos foram observadas as características macro e micromorfológicas por meio da técnica de microcultivo. As estruturas foram coradas com azul de lactofenol e observadas ao microscópio óptico, e classificada de acordo com a sua morfologia e comparados com a literatura específica (CHITHRA et al., 2014; BONFIM et al., 2016; PAN et al., 2016). Os resultados do isolamento foram expressos em frequência absoluta.

Caracterização molecular

Os isolados que apresentaram morfoconversão e estruturas micromorfológicas característica do gênero *Paracoccidioides* spp. foram submetidas a extração de ácido desoxirribonucleicos (DNA) genômico da fase micelial, utilizando o kit comercial Fungal/Bacterial Miniprep – Zymo Research (SOUZA et al., 2017). Os produtos obtidos na extração foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, para obter a confirmação da extração do DNA (THEODORO et al., 2005; ARANTES et al., 2016).

Para amplificação foi utilizada a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) com os primers ITS-1 e 4 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG') e (5'

TCCTCCGCTTATTGATATGC') respectivamente, específicos para a região fúngica universal rRNA ITS1-5.8S-ITS2 (ARANTES et al., 2016; SOUZA et al., 2017). O mix para cada PCR foi preparando utilizando 17,75 µL de água livre de endonucleases (DEPC), 2,5 µL de tampão (Mg²⁺ plus), 0,5 µL de 0,2 mM dNTP, 1 µL de cada primer a 0,4 mM, e 0,25 µL de 1 unidades / µL de DNA taq polimerase, para cada reação com um mix de 23 µL de PCR para 2 µL das amostras de DNA (SOUZA et al., 2017).

As condições de termociclagem foram: uma desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos e 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, seguidos por um passo de anelamento a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C durante 1 minuto, e uma extensão final a 72 °C durante 7 minutos (SOUZA et al., 2017).

A purificação do produto da PCR foi feita de acordo com o protocolo do kit comercial DNA Clean & concentrator - Zymo Research.

Os produtos da PCR foram enviados ao Laboratório Central de Tecnologias de alto Desenvolvimento (UNICAMP, São Paulo/SP) para sequenciamento capilar automático no equipamento 3730XL (Applied Biosystems). O sequenciamento foi realizado com o primer ITS 1, e as reações foram realizadas de acordo com o protocolo para o 3730XL.

As sequências obtidas foram analisadas e editadas no Bioedit 7.0.9.1 (HALL, 1999), alinhadas com as sequências da região (ITS1-5.8S-ITS2) utilizando o programa ClustalW, posteriormente depositadas nas bases de dados do GenBank, e com o auxílio do BLAST calculando o índice de similaridade das espécies. Após a identificação das espécies de interesse, uma árvore filogenética foi construída pelo método de Neighbor Joining (JUKES; CANTOR, 1969), com auxílio do software MEGA 7.0 (ARANTES et al., 2016).

Resultados

Caracterização morfológica

Entre os 232 isolados quatro (1,72%) apresentaram morfoconversão e estruturas característica do gênero *Paracoccidioides*, proveniente de três (30%) propriedades rurais do município de Rio Branco, Acre (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência relativa e absoluta de fungos isolados de solos de propriedades rurais do município de Rio Branco, Acre.

| Fungos | Propriedades Rurais | Total | FR (%) |
|------------------------------|----------------------------|--------------|---------------|
| Sapofíticos | 228 | 228 | 98,28 |
| <i>Paracoccidioides</i> spp. | 4 | 4 | 1,72 |
| Total | 232 | 232 | |

FR (%) = Frequência relativa

Os quatro isolados fúngicos incubados em meio SDA a 28 °C apresentaram colônias brancas, aveludadas, com curtas hifas hialinas aéreas, em análise microscópica os isolados formaram hifas septadas, com conídios e clamidoconídios (Figura 1). Quando os isolados foram inoculados no meio BHI a 37 °C foi observado o crescimento de colônias de cor creme, e ao analisar microscopicamente constatou-se a presença de células arredondas com brotamento simples e múltiplos adquirindo a forma clássica descrita como roda de leme (Figura 1D).

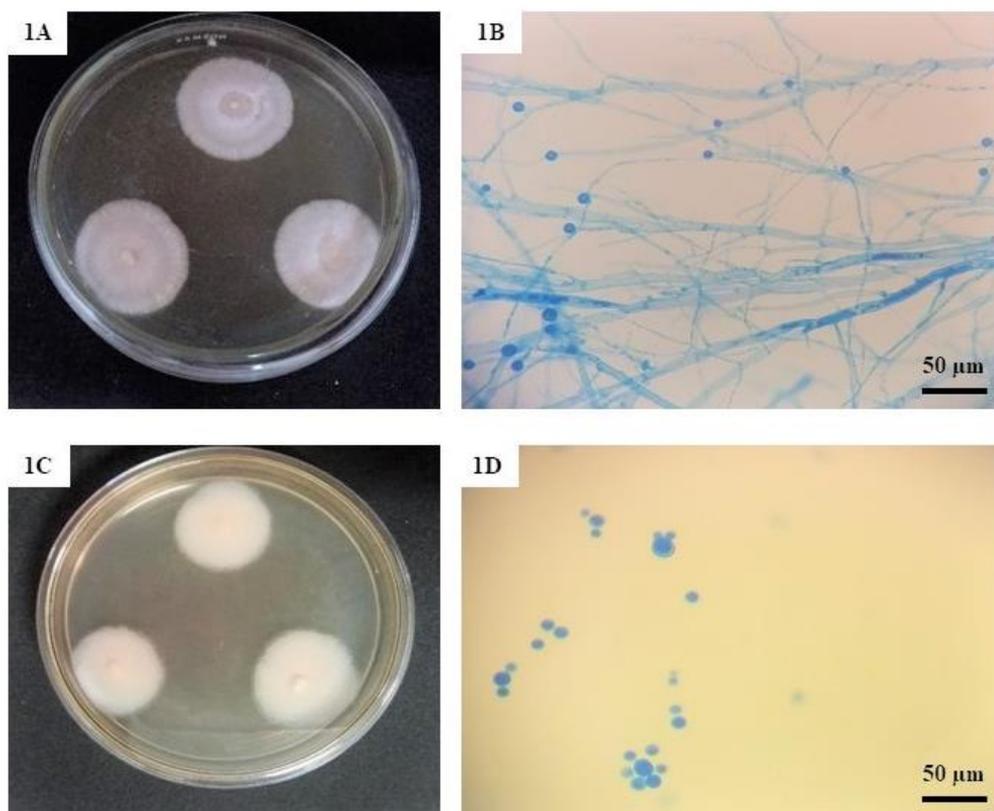


Figura 1. Caracterização macro e micromorfológica do gênero *Paracoccidioides*. 1A) Aspectos da colônia crescida em SDA a 28 °C. 1B) Hifas septadas com clamidoconídios; 1C) Aspectos da colônia crescidas a 37 °C em Ágar BHI; 1D) Células arredondas com brotamento simples e múltiplos adquirindo a forma clássica descrita como roda de leme. Aumento de 40X.

Caracterização molecular

As seqüências foram depositas no banco de dados GenBank e os múltiplos alinhamentos obtidos indicaram que os isolados apresentaram 99,0% de identidade com a *Gongronella cf. butlerii* (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de similaridade dos isolados no GenBank utilizando o programa algoritmo BLAST.

| Isolado | Tamanho da seqüência (pb) | Alinhamento significativo | Identidade |
|---------|---------------------------|--------------------------------|------------|
| 4.611 | 600 pb | <i>Gongronella cf. butleri</i> | 99,0% |

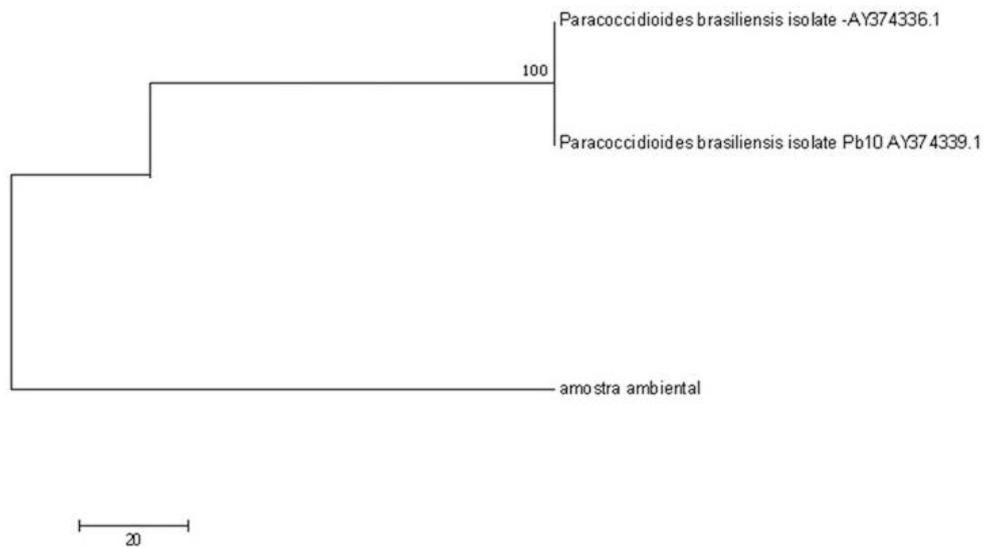


Figura 2. Análise filogenética da sequência de rRNA ITS1-5.8S-ITS2 de isolados ambientais do município de Rio Branco, Acre.

Discussão

Foram isolados quatro (1,72%) fungos com características semelhantes ao gênero *Paracoccidioides*. Resultados similares foram encontrados em Botucatu (SP), onde (0,56%) dos isolados do solo eram fungos termodimórficos (SILVA-VERGARA et al., 1998).

O isolamento destes microrganismos em amostras de solo é um grande desafio devido as dificuldades de se recuperar em condições laboratórias (TERÇARIOLI et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2014). A identificação destes fungos podem ser influenciados diretamente pela presença de outros microrganismos competidores em solo não estéril e inibir o crescimento do fungo em meios artificiais, limitando o entendimento da biogeografia de *Paracoccidioides* spp. em áreas de baixa e alta endemicidade (TEIXEIRA et al., 2014; BRAGA et al., 2016).

Estes fungos foram isolados de três (30%) fazendas com criações de bovinos leiteiros, resultados semelhantes foram observados em Botucatu(SP), e Ibiá (MG), onde

todos os isolados eram proveniente de áreas agrícolas (MONTENEGRO et al., 1996; SILVA-VERGARA et al., 1998). Estudos anteriores, classificam as atividades agropecuárias como um fator predisponente para a paracoccidiodomicose, afirmando que o desmatamento de áreas preservadas expõe o solo e altera naturalmente sua conformação química, contribuindo para a disseminação da infecção no homem (MONTENEGRO et al., 1996; MARTINEZ, 2015; ARANTES et al., 2016; VIEIRA; WEBER, 2017).

No entanto, é importante ressaltar que a maioria dos estudos não caracterizam a composição do solo analisado, sendo particularmente significativa, pois a composição do solo é extremamente complexa, com componentes diversificados que podem influenciar diretamente na adaptação do fungo à natureza (FERREIRA et al., 1990; MONTENEGRO et al., 1996; SILVA-VERGARA et al., 1998).

De acordo com os resultado do isolamento, foi possível observar que as condições climáticas atuam como elementos determinantes para o desenvolvimento do fungo em sua fase saprofítica (TERÇARIOLI et al., 2007; ALBANO et al., 2015; ARANTES et al., 2015; MARTINEZ, 2017; HRYCYK et al., 2018). Outras pesquisas também detectaram o fungo em áreas quentes e úmidas (FERREIRA et al., 1990; SILVA-VERGARA et al., 1998), entretanto, novas variações da distribuição de *Paracoccidioides* spp. foram reveladas, incluindo uma notável resistência a condições ambientais adversas, de modo que a distribuição espacial das espécies pode ser maior do que a previamente definida (ARANTES et al., 2016; HRYCYK, 2018).

De maneira geral, o crescimento e a dispersão deste microrganismo associa-se a fatores abiótico (MARTINEZ, 2015; ARANTES et al., 2016; DO VALLE et al., 2017; MARTINEZ, 2017). Desta forma, enquanto altos níveis de umidade aumentam o crescimento do fungo e a manutenção no solo, um breve período de seca a camada

superficial do solo, favorece a dispersão dos conídios por aerossóis (MARTINEZ, 2015; ARANTES et al., 2016; DO VALLE et al., 2017; MARTINEZ, 2017).

Os isolados apresentaram morfoconversão e características morfológicas semelhantes aos descritos na literatura como sendo *Paracoccidioides* spp. Estudos previos constataram que os conídios de *P. lutzii* são alongados em forma de bastonete, e em contraste, *P. brasiliensis* apresenta conídios globulares e mais curtos (THEODORO et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2014). Ao avaliar os conídios dos isolados deste estudo, constatou-se que a presença de conídios curtos e globulares (Figura 1B), sugerindo que os isolados pertencem ao gênero *Paracoccidioides*.

A análise molecular do isolado revelou que o mesmo possui 99,0% de identidade com a *Gongronella cf. butleri*, um zigomiceto, descrito pela primeira vez em Taiwan, e é comumente isolado de solos florestais e agrícolas, no entanto, também foi encontrado colonizando o tecido vascular de raízes de coqueiros na Índia (BABU et al., 2015).

Este microorganismo incide amostras de solo de Taiwan, Índia, Austrália, Reino Unido, Estados Unidos, Itália (Biota Taiwanica) e recentemente uma nova ocorrência foi registrada na Coreia (Babu et al., 2015). A *Gongronella cf. butleri* possui colônias algodonosas, brancas acizentada e reverso acastanhado, enquanto que na microscopia revela hifas hialinas, septadas com clamidósporo intercalar e terminais, não apresentando semelhança macro e micromorfológica com o isolado deste estudo, visto que o mesmo realiza morfoconversão (BABU et al., 2015).

Portanto, novas análises utilizando a técnica da biologia molecular serão realizadas utilizando primers mais específicos para o gênero *Paracoccidioides*, com o intuito de identificar a espécie do isolado.

Conclusões

Foram identificados a presença de fungos que realizam morfoconversão e característica micromorfológicas similares ao gênero *Paracoccidioides* spp. em amostras ambientais do município de Rio Branco-Acre. Estas amostras foram submetidas a análise molecular onde revelou 99,0% de identidade com a *Gongronella cf. butleri*, no entanto, não há semelhança nas características macro micromorfológica da *Gongronella cf. butleri* com isolado em estudo. Desta forma, estudos futuros serão realizados utilizando a técnica de biologia molecular com primers mais específicos, a fim de determinar a espécie deste isolado.

Referências

- ALBANO, A. P. N.; KLAFKE, G. B.; BRANDOLT, T. M.; HORA, D.; POUSADA, V.; NOGUEIRA, C. E. W.; XAVIER, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Seroepidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in horses from Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 513-517, 2015.
- ARANTES, T. D.; BAGAGLI, E.; NINO-VEGA, G.; SAN-BLAS, G.; THEODORO, R. C. *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*, a secret love affair. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 19, p. 25-30, 2015.
- ARANTES, T. D.; THEODORO, R. C.; DA GRAÇA MACORIS, S. A.; BAGAGLI, E. Detection of *Paracoccidioides* spp. in environmental aerosol samples. **Medical Mycology**, v. 51, n. 1, p. 83-92, 2013.
- ARANTES, T. D.; THEODORO, R. C.; DE MELO TEIXEIRA, M.; BOSCO, S. d. M. G.; BAGAGLI, E. Environmental mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil reveals new clues into genetic diversity, biogeography and wild host association. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. 1-18, 2016.
- BABU, A.G.; KIM, S.W.; ADHIKARI, M.; DIJ, R.Y,H.U.; CHANGMU, K.; HYANG, B. L.; YOUN, S. L. A new record of *Gongronella butleri* isolated in korea. **Mycobiology**, v.2, n.43, p. 166-169, 2015.
- BERNARDES FILHO, F.; SGARBI, I.; SANTOS, F. d. S. D.; SAMPAIO, R. C. R.; QUEIROZ, R. M.; FONSECA, S. N. S.; HAY, R. J.; TOWERSEY, L. Acute paracoccidioidomycosis with duodenal and cutaneous involvement and obstructive jaundice. **Medical Mycology Case Reports**, v. 20, n.1, p. 21-25, 2018.

BONFIM, J. A.; VASCONCELLOS, R. L. F.; BALDESIN, L. F.; SIEBER, T. N.; CARDOSO, E. J. B. N. Dark septate endophytic fungi of native plants along an altitudinal gradient in the Brazilian Atlantic forest. **Fungal Ecology**, v. 20, n.1, p. 202-210, 2016.

BRAGA, R. M.; DOURADO, M. N.; ARAÚJO, W. L. Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 86-98, 2016.

CHITHRA, S.; JASIM, B.; SACHIDANANDAN, P.; JYOTHIS, M.; RADHAKRISHNAN, E. Piperine production by endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Piper nigrum*. **Phytomedicine**, v. 21, n. 4, p. 534-540, 2014.

DA COSTA, T. A.; DI GANGI, R.; THOMÉ, R.; FELISBINO, M. B.; BONFANTI, A. P.; ISHIKAWA, L. L. W.; SARTORI, A.; BURGER, E.; VERINAUD, L. Severe changes in thymic microenvironment in a chronic experimental model of paracoccidioidomycosis. **PloS One**, v. 11, n. 10, p. 1-15, 2016.

DO VALLE, A. C. F.; DE MACEDO, P. M.; ALMEIDA-PAES, R.; ROMÃO, A. R.; DOS SANTOS LAZÉRA, M.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis after highway construction, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 11, p. 1917, 2017.

FERNANDES, É. K.; KEYSER, C. A.; RANGEL, D. E.; FOSTER, R. N.; ROBERTS, D. W. CTC medium: A novel dodecane-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. **Biological Control**, v. 54, n. 3, p. 197-205, 2010.

FERREIRA, M.; FREITAS, L.; LACAZ, C. d. S.; DEL NEGRO, G.; DE MELO, N.; GARCIA, N.; DE ASSIS, C.; SALEBIAN, A.; HEINS-VACCARI, E. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dogfood probably contaminated with soil in Uberlândia, Brazil. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 28, n. 3, p. 253-256, 1990.

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

GARCIA-RODAS, R.; NOSANCHUK, J. D. Effects of silencing 14-3-3 protein in *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Virulence**, v. 7, n. 2, p. 68, 2016.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, n. 41, p. 95-98, 1999.

HRYCYK, M. F. **Ecologia de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii* e sua associação com o tatu *Dasypus novemcinctus* nos estados de São Paulo e Mato Grosso, Brasil**. 2018. Tese (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) -Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2018.

HRYCYK, M. F.; GARCIA GARCES, H.; BOSCO, S. d. M. G.; DE OLIVEIRA, S. L.; MARQUES, S. A.; BAGAGLI, E. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*, *P. lutzii*

and related species: infection in armadillos, soil occurrence and mycological aspects. **Medical Mycology**, v.1, n. 1, p. 1-13, 2018.

JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. Evolution of protein molecules (In Munro HN). **Mammalian Protein Metabolism**. New York, v. 33, p. 21-132. 1969.

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

MARTINEZ, R. New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 1-13, 2017.

MENDES, R. P.; DE SOUZA CAVALCANTE, R.; MARQUES, S. A.; MARQUES, M. E. A.; VENTURINI, J.; SYLVESTRE, T. F.; PANIAGO, A. M. M.; PEREIRA, A. C.; DA SILVA, J. d. F.; FABRO, A. T. Paracoccidioidomycosis: current perspectives from Brazil. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, n.1, p. 224, 2017.

MONTENEGRO, M.; MIYAJI, M.; FRANCO, M.; NISHIMURA, K.; COELHO, K.; HORIE, Y.; MENDES, R.; SANO, A.; FUKUSHIMA, K.; FECCHIO, D. Isolation of fungi from nature in the region of Botucatu, state of Sao Paulo, Brazil, an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 665-670, 1996.

MUÑOZ, J. F.; MCEWEN, J. G.; CLAY, O. K.; CUOMO, C. A. Genome analysis reveals evolutionary mechanisms of adaptation in systemic dimorphic fungi. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2018.

PAN, F.; LIU, Z.-Q.; CHEN, Q.; XU, Y.-W.; HOU, K.; WU, W. Endophytic fungus strain 28 isolated from *Houttuynia cordata* possesses wide-spectrum antifungal activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 480-488, 2016.

PIGOSSO, L. L.; PARENTE, A. F. A.; COELHO, A. S. G.; SILVA, L. P.; BORGES, C. L.; BAILÃO, A. M.; DE ALMEIDA SOARES, C. M. Comparative proteomics in the genus *Paracoccidioides*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, n. 1, p. 87-100, 2013.

RESTREPO, A.; CANO, L. E.; GONZALEZ, A. The power of the small: the example of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 1, p. 5-10, 2015.

SHARMA, S.; KUMAR, V.; TRIPATHI, R. B. Isolation of phosphate solubilizing microorganism (PSMs) from soil. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 1, n. 2, p. 90-95, 2017.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; QUEIROZ-TELLES, F. d.; KONO, A. S. G.; PANIAGO, A. M.; NATHAN, A.; VALLE, A. C. F. d.; BAGAGLI, E.; BENARD, G. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 715-740, 2017.

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

SOUZA, A. R. C. d.; BALDONI, D. B.; LIMA, J.; PORTO, V.; MARCUZ, C.; MACHADO, C.; FERRAZ, R. C.; KUHN, R. C.; JACQUES, R. J.; GUEDES, J. V. Selection, isolation, and identification of fungi for bioherbicide production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 101-108, 2017.

TABORDA, C.; URÁN, M.; NOSANCHUK, J. D.; TRAVASSOS, L. Paracoccidioidomycosis: challenges in the development of a vaccine against an endemic mycosis in the Americas. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 19, p. 21-24, 2015.

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

TEIXEIRA, M. M.; THEODORO, R. C.; NINO-VEGA, G.; BAGAGLI, E.; FELIPE, M. S. *Paracoccidioides* species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, p. 1-4, 2014.

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

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

THEODORO, R. C.; DE MELO TEIXEIRA, M.; FELIPE, M. S. S.; DOS SANTOS PADUAN, K.; RIBOLLA, P. M.; SAN-BLAS, G.; BAGAGLI, E. Genus *Paracoccidioides*: species recognition and biogeographic aspects. **PloS One**, v. 7, n. 5, p. 1-15, 2012.

VIEIRA, C.; WEBER, O. Base Saturation on Growth and on Nutrition of Yellow Ipê Seedlings. **Floresta e Ambiente**, v. 24, n. p. 1-10, 2017.

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

Capítulo III - Ocorrência de *Paracoccidioides* spp. em amostras de escarro de pacientes sintomáticos respiratórios suspeitos de Tuberculose pulmonar no município de Rio Branco - Acre

Iasmyny Ranielly Silva Ferreira¹; Leila Priscila Peters²; Rita do Socorro Uchôa da Silva^{1,3}
Clarice Maia Carvalho^{1,2,4}.

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil.

³ Centro de Ciências da Saúde e do Desporto, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil.

⁴ Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil.

Resumo

A paracoccidioidomicose (PCM) é infecção fúngica que tem como agente etiológico os fungos termodimórficos pertencentes ao complexo *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii*. A PCM é endêmica na América Latina, e um grave problema de saúde pública no Brasil. No entanto, os trabalhos acerca da doença na Amazônia são escassos, além disso, a infecção não é de notificação compulsória, desta forma, pouco se conhece em relação a frequência da doença no Acre. O objetivo desse trabalho foi verificar a ocorrência de *Paracoccidioides* spp. em amostras de escarro de pacientes sintomáticos respiratórios suspeitos de Tuberculose pulmonar no município de Rio Branco-Acre. Entre Novembro de 2018 a Janeiro de 2019 foram coletados amostras de escarro de pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar atendidos em Unidades de Referência de Atenção Primária vinculadas ao Sistema Municipal de Saúde. Foi realizada pesquisa direta e cultivo de fungos das amostras de escarro. As amostras que apresentaram características do gênero *Paracoccidioides* no exame direto e cultivo, foram submetidas à caracterização molecular. Das 17 amostras de pacientes suspeitos de Tuberculose Pulmonar, 16 (94,1%) foram negativas para o exame direto e 1 (5,9%) apresentou elementos leveduriformes multibrotantes compatíveis com o gênero *Paracoccidioides*. Na cultura, 15 (88,2%) amostra foram negativas, 1 (5,9%) apresentou crescimento fúngico característico de *Paracoccidioides* spp., e 1 (5,9%) apresentou contaminação. Durante os três meses de estudo a PCM apresentou uma frequência de 5,9%. A análise molecular do isolado revelou que o mesmo possui 93,0% de identidade com *Paracoccidioides brasiliensis*. Um paciente suspeito de tuberculose foi diagnosticado com paracoccidioidomicose no município de Rio Branco, Acre. Novas análises utilizando a técnica da biologia molecular serão realizadas utilizando primers mais específicos para a espécie *P. lutzii* e o complexo *P. brasiliensis* com o intuito de determinar a identidade do isolado clínico.

Palavra-chave: Acre; Micose sistêmica; Paracoccidioidomicose.

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a fungal infection whose etiologic agent is the thermodynamically fungi belonging to the *Paracoccidioides brasiliensis* and *P. lutzii* complex. PCM is endemic in Latin America, and a serious public health problem in Brazil. However, the work on the disease in the Amazon is scarce, in addition, the infection is not of compulsory notification, in this way, little is known in relation to the frequency of the disease in Acre. The objective of this work was to verify the occurrence of *Paracoccidioides* spp. in sputum samples from respiratory symptomatic patients suspected of pulmonary tuberculosis in the city of Rio Branco-Acre. Between November 2018 and January 2019, sputum samples were collected from patients suspected of pulmonary tuberculosis treated at Primary Care Reference Units linked to the Municipal Health System. Direct examination and fungal culture of the sputum samples were performed. The samples that presented characteristics of the genus *Paracoccidioides* in the direct examination and culture, were submitted to the molecular characterization. Of the 17 samples from patients suspected of pulmonary tuberculosis, 16 (94.1%) were negative for the direct examination and 1 (5.9%) had multibreed yeast-resistant elements compatible with the genus *Paracoccidioides*. In the culture, 15 (88.2%) samples were negative, 1 (5.9%) presented fungal growth characteristic of *Paracoccidioides* spp., and 1 (5.9%) presented contamination. During the three months of study PCM presented a frequency of 5.9%. Molecular analysis of the isolate revealed that it had 93.0% identity to *Paracoccidioides brasiliensis*. A patient suspected of tuberculosis was diagnosed with paracoccidioidomycosis in the municipality of Rio Branco, Acre. New analyzes using the molecular biology technique will be performed using more specific primers for the species *P. lutzii* and the complex *P. brasiliensis* with the purpose of determining the identity of the clinical isolate.

Keyword: Acre; Systemic mycosis; Paracoccidioidomycosis.

Introdução

A paracoccidioidomicose é uma doença infecciosa, crônica, sistêmica e progressiva, que tem como agente etiológico, o fungo termodimórfico pertencente ao complexo *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii* (MENDES et al., 2017; COMPARATO FILHO et al., 2018; SANABRIA PEÑA et al., 2018).

A infecção ocorre através da inalação de propágulos infecciosos, que ao atingir os alvéolos pulmonares se diferenciam em levedura, e conseqüentemente, leva a progressão da doença (MENDES et al., 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017; MUÑOZ et al., 2018). A população mais acometida são trabalhadores rurais, que realizam atividades de

manejo de solo, predominantemente do sexo masculino e na faixa etária de 30 a 60 anos, sua fase mais produtiva, causando um alto impacto socioeconômico (TABORDA et al., 2015; MARTINEZ, 2017; MENDES et al., 2017).

A PCM está geograficamente limitada à América Latina, cerca de 80% dos casos ocorrem no Brasil, seguidos pela Colômbia e Venezuela (PEÇANHA-PIETROBOMON; COLOMBO, 2019). No Brasil, estima-se que a incidência da doença em áreas endêmicas varia de três a quatro novos casos por milhão de habitantes e de um a três novos casos por 100.000 habitantes anualmente (MUÑOZ et al., 2016; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017; DUTRA et al., 2018; MUÑOZ et al., 2018).

A maior ocorrência de casos de PCM no Brasil são reportados nas regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste (MARTINEZ, 2015). Entretanto, um aumento progressivo no número de casos vem sendo registrado em áreas de colonização submetidas ao desmatamento nos últimos anos, como partes do Tocantins, Pará, Mato Grosso, Rondônia, Acre, na qual a PCM pode ser considerada uma micose sistêmica emergente (MARTINEZ, 2015; MARTINEZ, 2017).

Estudos anteriores afirmam que a região Amazônica reúne condições fisiografias, e desenvolvem atividades agrícolas que favorecem a ocorrência do *Paracoccidioides* spp. (FONSECA et al., 1999; COUTINHO et al., 2015; MARTINEZ, 2017). Recentemente, Rondônia registrou uma incidência anual de 9,4 casos por 100.000 habitantes, classificando a região Amazônica como uma potencial zona endêmica (VIEIRA et al., 2014; MARTINEZ, 2015).

No estado do Acre, apenas dois estudos foram realizados para determinar a ocorrência da infecção através de testes intradérmicos, apresentando um índice de reatividade para paracoccidioidomicose de 34,1% e 41,2%, respectivamente (FIGUEIREDO, 2005; FIGUEIREDO, 2011). É importante salientar que o estado do

Acre apresenta condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento da PCM, alertando a necessidade de novos estudos a fim de obter uma melhor distribuição da doença.

Os casos de paracoccidiodomicose crônica podem passar despercebidos, pois, as manifestações pulmonares assemelham-se clínica e radiologicamente à tuberculose. Assim, a presente proposta tem por objetivo verificar a ocorrência da doença em amostras de escarro de pacientes sintomáticos respiratórios suspeitos de Tuberculose pulmonar no município de Rio Branco, Acre.

Material e Métodos

Coleta de Dados

Foram coletadas 17 amostras de escarro de pacientes suspeitos de Tuberculose pulmonar atendidos nas Unidades Referência de Atenção Primária (URAP) Ary Rodrigues, Augusto Hidalgo Lima e na Policlínica Barral y Barral do município de Rio Branco-Acre entre o período de novembro de 2018 a Janeiro de 2019.

O processamento das amostras foi realizadas no laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Acre, e após a análise, as amostras de escarro foram armazenadas em um biorrepositório no Laboratório Central do Estado do Acre (LACEN). Ao termino da pesquisa, as amostras foram autoclavadas no LACEN, no setor de esterilização para a eliminação de qualquer risco biológico, armazenados em sacos brancos contendo o símbolo de risco biológico e por fim encaminhados ao descarte de resíduos do município segundo a RDC/ANVISA nº 306 de 07/12/2004 (BRASIL, 2004).

Caracterização morfológica

Foram adicionados em tubo cônico 5 mL da porção purulenta da amostra de escarro, 1 mL de de fluimicyl (N-acetil-L-cistéina) e 4 mL de citrato de sódio 10%, em seguida, a amostra foi homogeneizada e centrifugada por 10 minutos a 5.000 rpm

(BRASIL, 2004). Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e apenas o sedimento foi utilizado para a preparação das lâminas e inoculação em meio de cultura.

Com o auxílio de um swab, as amostras de escarro foram adicionadas em três lâminas distintas, e posteriormente, incorporadas hidróxido de potássio (KOH) a 10%, azul de lactofenol e tinta nanquim, respectivamente. O escarro, então, foi examinado entre lâmina e lamínula em microscópio óptico no aumento de 40x. As amostras foram consideradas positivas para *Paracoccidioides* spp., quando identificado células fúngicas com múltiplos brotamentos e parede celular birrefringente (LACAZ et al., 1991; MATUTE et al., 2006).

As amostras de escarro foram inoculadas em duplicata em meio de Ágar Sabouraud, Ágar Mycosel, Ágar infusão de cérebro e coração (BHI) e Ágar de sementes do niger (NSA), e incubadas as temperaturas de 30 °C e 37 °C durante 4 semanas, e inspecionadas uma vez por semana (LACAZ et al., 2002).

Caracterização Molecular

As amostras que apresentaram positividade no exame direto e cultura foram submetidas à extração de ácido desoxirribonucleicos (DNA) total da fase micelial, utilizando o kit comercial Fungal/Bacterial Miniprep – Zymo Research (SOUZA et al., 2017). Os produtos obtidos na extração foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (THEODORO et al., 2005; ARANTES et al., 2016).

A amplificação foi realizada empregando a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) sendo utilizada os primers ITS-1 e 4, denominados (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG') e (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC') respectivamente, específicos para a região fúngica universal rRNA ITS1-5.8S-ITS2 (ARANTES et al., 2016; SOUZA et al., 2017). O mix para cada PCR foi preparando utilizando 17,75 µL de água livre de endonucleases (DEPC), 2,5 µL de tampão (Mg²⁺ plus), 0,5 µL de 0,2 mM dNTP, 1 µL de cada primer a 0,4 mM, e 0,25 µL de 5

unidades/ μL de DNA taq polimerase, para cada reação com um mix de 23 μL de PCR para 2 μL das amostras de DNA (SOUZA et al., 2017).

As condições de termociclagem foram: uma desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos e 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, seguidos por um passo de anelamento a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C durante 1 minuto, e uma extensão final a 72 °C durante 7 minutos (SOUZA et al., 2017).

A purificação foi feita de acordo com o protocolo do kit comercial DNA Clean & concentrator - Zymo Research.

Os produtos da PCR foram enviados ao Laboratório Central de Tecnologias de alto Desenvolvimento (UNICAMP, São Paulo/SP) para sequenciamento capilar automático no equipamento 3730XL (Applied Biosystems). O sequenciamento foi realizado com o primer ITS 1, e as reações foram realizadas de acordo com o protocolo para o 3730XL.

As sequências obtidas foram analisadas e editadas no Bioedit 7.0.9.1 (HALL, 1999), alinhadas com as sequências da região (ITS1-5.8S-ITS2) utilizando o programa ClustalW, posteriormente depositadas nas bases de dados do GenBank, e com o auxílio do BLAST calculando o índice de similaridade das espécies. Após a identificação das espécies de interesse, uma árvore filogenética foi construída pelo método de Neighbor Joining (JUKES; CANTOR, 1969), com auxílio do software MEGA 7.0 (ARANTES et al., 2016).

Aspectos éticos

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCA/FUNDHACRE, parecer N° 2.987.220 2081 CEP / HCA/FUNDHACRE, CAAE – 95076618.6.0000.500 (em anexo).

Resultados

Caracterização morfológica

Foram realizados os exames direto e cultivo em 17 amostras de escarro coletadas de pacientes suspeitos de Tuberculose Pulmonar. Por meio do exame direto, foi identificado um fungo do gênero *Paracoccidioides*, com estruturas leveduriformes multibrotantes clássicas, em uma (5,9%) amostra (Figura 1). A ausência de estruturas fúngicas foi registrada em 16 (94,1%) das amostras (Tabela 1).

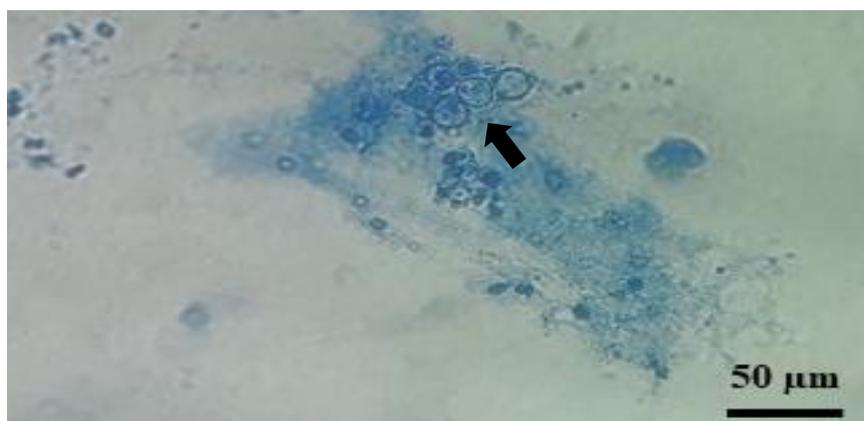


Figura 1. Caracterização micromorfológica do gênero *Paracoccidioides* em amostra de escarro de pacientes suspeitos de tuberculose por meio do exame direto. Aumento de 40X.

Com relação ao cultivo, foi observado crescimento fúngico característico do gênero *Paracoccidioides* em uma amostra (5,9%). Além disso, foi registrado ausência de desenvolvimento micelial em 15 (88,2%) amostras e contaminação por fungos saprófitas em uma (5,9%) (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência absoluta e relativa da análise do exame direto e cultura de pacientes suspeitos de Tuberculose Pulmonar.

| | Exame direto | Cultivo |
|---------------------|---------------------|----------------|
| Positivo | 1 (5,9 %) | 1 (5,9%) |
| Negativo | 16 (94,1%) | 15 (88,2%) |
| Contaminação | - | 1 (5,9%) |
| Total | 17 | 17 |

Foi realizada a análise macro e micromorfológica do isolado fúngico após 21 dias de incubação em diferentes condições de cultivo. Foi observado colônia branca, aveludada, hifas septadas, com conídios e clamidoconídios em meio SDA a 30 °C (Figura 2A e 2B) e colônia de cor creme, ceribriforme, células arredondas com brotamento simples e múltiplos em meio BHI a 37 °C, indicando o dimorfismo característico do gênero *Paracoccidioides* (Figura 2C e 2D).

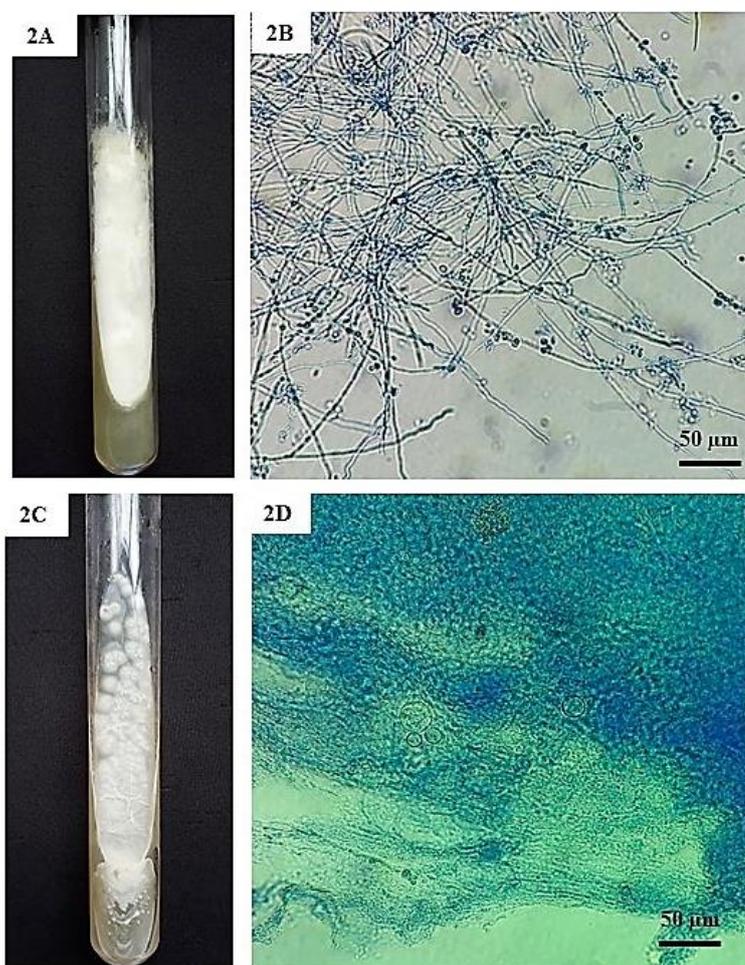


Figura 2. Caracterização macro e micromorfológica do gênero *Paracoccidioides* proveniente de amostras de escarro de pacientes suspeitos de Tuberculose Pulmonar. A. Aspectos da colônia crescida em SDA a 30°C. B. Hifas septadas com conídios intercalares e terminais. C. Aspectos da colônia crescidas a 37°C em Ágar BHI. D. Células arredondas com brotamento simples e múltiplos. Aumento de 40X.

Caracterização molecular

As sequências foram depositadas no banco de dados GenBank e os múltiplos alinhamentos obtidos indicaram que os isolados apresentaram 93,0% de identidade com *Paracoccidioides brasiliensis* (tabela 2).

Tabela 2. Análise de similaridade dos isolados no GenBank utilizando o programa algoritmo BLAST.

| Isolado | Tamanho da sequência (pb) | Alinhamento significativo | Identidade |
|---------|---------------------------|--------------------------------------|------------|
| 4.611 | 600 pb | <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | 93,0% |

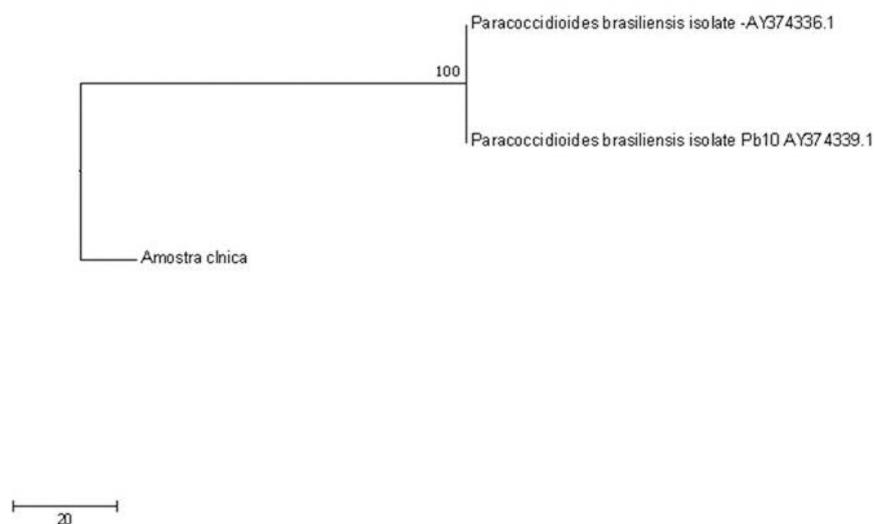


Figura 3. Análise filogenética da sequência de rRNA ITS1-5.8S-ITS2 de isolados clínicos do município de Rio Branco, Acre.

Discussão

Mundialmente, as infecções fúngicas causam cerca de 1,6 milhões de óbitos por ano (COLE et al., 2017; DE ARRUDA et al., 2018), sendo estimados em 10 milhões o número de latino americanos infectados com *Paracoccidioides* (QUEIROZ-TELLES et al., 2017). No Brasil, a paracoccidioidomicose é classificada como a oitava causa de mortalidade entre as infecções crônicas ou recorrentes, com incidência de 1 a 3,7 casos

por 100.000 habitantes, anualmente (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017; DE ARRUDA et al., 2018; DUTRA et al., 2018).

As regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste possuem maior casuística. Estudos retrospectivos, realizados no estado do Espírito Santo relatam 441 e 161 casos de paracoccidiodomicose confirmados nos anos de 2017 e 2018, respectivamente (PEÇANHA et al., 2017; DUTRA et al., 2018). Além disso, dois relatos de casos foram realizados no estado de Minas Gerais (BERNARDES FILHO et al., 2018) e 102 casos diagnosticados no estado do Paraná (LOTH et al., 2011)..

A ocupação e colonização de terras na Amazônia, promoveu um movimento de migração interna e expansão agrícola no extremo oeste da Amazônia brasileira, levando ao surgimento de uma área hiperendêmica de paracoccidiodomicose centrada no estado de Rondônia e reconhecida desde a década de 1990 (VIEIRA et al., 2014; MARTINEZ, 2017). Além disso, entre os anos de 1997 a 2012, foram relatados 2.163 casos confirmados em Rondônia (VIEIRA et al., 2014).

No entanto, a paracoccidiodomicose ainda é considerada uma doença subnotificada e pouco se sabe sobre a sua ocorrência (QUEIROZ-TELLES et al., 2017). No Estado do Acre, dois estudos retrospectivos utilizando o teste intradérmico com paracoccidiodina foram realizados durante os anos de 2005 e 2011, demonstrando uma incidência de (41,2%) e (34,1%), respectivamente (FIGUEIREDO, 2011).

Portanto, a identificação de um paciente com infecção fúngica causada pelo *Paracoccidioides* spp. na região de estudo indica a ocorrência e possível subnotificação de casos, salientando a importância da realização de estudos prospectivos com o intuito de identificar a frequência da doença no município de Rio Branco-Acre.

A coinfeção da tuberculose (TB) com paracoccidiodomicose tem sido relada em aproximadamente 20% dos casos (MENDES et al., 2017; SHIKANAI-YASUDA et al.,

2017). Em regiões com alta prevalência de tuberculose, como o estado do Acre, a identificação de infecções fúngicas pulmonares é um grande desafio, pois as manifestações clínicas e radiológicas assemelham-se à tuberculose pulmonar crônica (SEYEDMOUSAVI et al., 2015; BHUTIA; ADHIKARI, 2017; SALZER et al., 2018).

O relato de um paciente com sintomatologia respiratória suspeita de tuberculose pulmonar infectado por *Paracoccidioides* no município de Rio Branco, Acre, indica a importância da realização de exames para o diagnóstico diferencial.

O paciente positivo para paracoccidioidomicose era do sexo masculino, 43 anos de idade, fazia uso constante do tabaco e era proveniente da zona rural do município de Xapuri-Ac. Corroborando com os resultados apresentados neste estudo, a maioria dos pacientes com PCM apresentam maior prevalência em indivíduos do sexo masculino entre 30 a 60 anos de idade (MARTINES et al., 2015; MARTINEZ et al., 2017).

Esta frequência estar associada a ausência do hormônio beta- estradiol, que inibe a conversão da forma micelial em leveduriforme e conseqüentemente a progressão da doença, assim como também a maior exposição ao fungo durante as atividades agrícolas (MARTINEZ et al., 2015).

Além disso, diversos estudos relatam que 90% dos pacientes na forma crônica da doença são fumantes, e que a probabilidade dos mesmos de desenvolver a doença é de 14 vezes maior quando comparado a um não fumante, pois o uso constante do tabaco provoca alterações na atividades mucociliar e as mudanças do sistema imunológico favorecendo o desenvolvimento da doença (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017; MARTINEZ et al., 2017; DE ARRUDA et al., 2018; DUTRA et al., 2018).

O exame utilizado pode influenciar diretamente no diagnóstico da paracoccidioidomicose. No Mato Grosso do Sul (MS) (66,2%) pacientes foram confirmado com PCM, por meio da imunodifusão dupla (GEGEMBAUER et al., 2014).

As técnicas sorológicas são geralmente mais simples que a cultura e muito úteis no diagnóstico e acompanhamento de pacientes com PCM (ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2014).

No entanto, uma variedade de preparações antigênicas, tem sido aplicada nos testes sorológicos, o que resultou em alta reatividade cruzada, um dos mais persistentes problemas encontrados na literatura. sorodiagnóstico. Além disso, essas preparações antigênicas apresentam variabilidade antigênica, dificultando a padronização da técnica de diagnóstico (ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2014; MENDES et al., 2017) .

Um paciente do sexo masculino, residente no município de Teixerópolis em Rondônia foi diagnosticado com a doença por meio de exames histopatológicos (DE SOUZA GOMIDE et al., 2019). Os exames histopatológicos apresentam alta sensibilidade e custo efetivo (GUARNER; BRANDT, 2011). O histopatológico fornece um diagnóstico fidedigno através da identificação de células leveduriformes, assim como também a avaliação da interação parasita-hospedeiro que reflete o grau de gravidade da infecção (MORETO et al., 2011).

Atualmente, vários métodos moleculares para identificar e distinguir espécies fúngicas estão sendo aplicadas como diagnóstico. No entanto, essas técnicas não são padronizadas para uso rotineiro nos laboratórios de saúde pública. Além disso, a sensibilidade e especificidade desses métodos moleculares não são mais altas do que as da histopatologia (MORETO et al., 2011).

A forma clássica para o diagnóstico da PCM é o exame direto e cultivo, utilizado neste trabalho para identificar o isolado fúngico Esta técnica é de baixo custo e fácil execução (ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2014). Entretanto, requer profissionais qualificados para a realização das análises, assim como também a baixa carga parasitaria pode influenciar na identificação do microrganismo e o crescimento lento na cultura,

expõe os profissionais ao risco de contaminação biológica (ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2014; MENDES et al., 2017).

Além disso, esse método não possibilita a diferenciação entre as espécies crípticas do complexo *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, já que a única diferença morfológica entre eles é a morfologia dos conídios (TEIXEIRA et al., 2013).

Utilizando as técnicas de biologia molecular foi possível identificar que o isolado possui 93,0% de identidade com o *Paracoccidioides brasiliensis*. Estudos futuros utilizando primers mais específicos serão realizados a fim de elucidar a identidade do isolado.

Conclusão

Um paciente suspeito de tuberculose pulmonar do sexo masculino, proveniente de áreas rurais do Estado Acre foi diagnosticado com paracoccidioidomicose no município de Rio Branco, Acre. Novas análises utilizando a técnica da biologia molecular serão realizadas utilizando primers mais específicos para a espécie *P. lutzii* e o complexo *P. brasiliensis* com o intuito de determinar a identidade do isolado clínico.

Referências

ARANTES, T. D.; THEODORO, R. C.; DE MELO TEIXEIRA, M.; BOSCO, S. d. M. G.; BAGAGLI, E. Environmental mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil reveals new clues into genetic diversity, biogeography and wild host association. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. 1-18, 2016.

BERNARDES FILHO, F.; SGARBI, I.; DA SILVA DOMINGOS, S. F.; SAMPAIO, R. C. R.; QUEIROZ, R. M.; FONSECA, S. N. S.; HAY, R. J.; TOWERSEY, L. Acute paracoccidioidomycosis with duodenal and cutaneous involvement and obstructive jaundice. **Medical Mycology Case Reports**, v. 20, n.1, p. 21-25, 2018.

BHUTIA, T. O.; ADHIKARI, L. Pulmonary mycoses among the clinically suspected cases of pulmonary tuberculosis. **International Journal of Research in Medical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 260-268, 2017.

BRASIL. Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde. ANVISA, Brasília, 2004.

BRASIL. RDC Nº 306/2004: Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. ANVISA, Brasília, 2004.

COLE, D. C.; GOVENDER, N. P.; CHAKRABARTI, A.; SACARLAL, J.; DENNING, D. W. Improvement of fungal disease identification and management: combined health systems and public health approaches. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p. 1-8, 2017.

COMPARATO FILHO, O. O.; MORAIS, F. V.; BHATTACHARJEE, T.; CASTILHO, M. L.; RANIERO, L. Rapid identification of *Paracoccidioides lutzii* and *P. brasiliensis* using Fourier Transform Infrared spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**, v. 1177, n.1, p. 1-9, 2018.

COUTINHO, Z. F.; WANKE, B.; TRAVASSOS, C.; OLIVEIRA, R. M.; XAVIER, D. R.; COIMBRA, C. E. Hospital morbidity due to paracoccidioidomycosis in Brazil (1998–2006). **Tropical Medicine and International Health**, v. 20, n. 5, p. 673-680, 2015.

DE ARRUDA, J. A. A.; SCHUCH, L. F.; ABREU, L. G.; SILVA, L. V. d. O.; MOSCONI, C.; MONTEIRO, J. L. G. C.; BATISTA, A. C.; HILDEBRAND, L. d. C.; MARTINS, M. D.; SOBRAL, A. P. V. A multicentre study of oral paracoccidioidomycosis: Analysis of 320 cases and literature review. **Oral diseases**, v. 24, n. 8, p. 1492-1502, 2018.

DE SOUZA GOMIDE, M. R. F.; CINTRA, L. T. A.; DURLACHER, R. R.; BENETTI, F.; GUIMARÃES, G. Oral Biopsy for Early Diagnosis of Paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v.1, n. p. 1-2, 2019.

DUTRA, L. M.; SILVA, T. H.; FALQUETO, A.; PEÇANHA, P. M.; SOUZA, L. R.; GONÇALVES, S. S.; VELLOSO, T. R. Oral paracoccidioidomycosis in a single-center retrospective analysis from a Brazilian southeastern population. **Journal of Infection and Public health**, v. 11, n.1, 4, p. 530-533, 2018.

FIGUEIREDO, M. B. **Inquérito com paracoccidioidina e Histoplasmina em Distrito Docente-assistencial do Tucumã**. 2005. Dissertação (Mestrado em Medicina e Saúde) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2005.

FIGUEIREDO, M. B. **Inquérito com paracoccidioidina em cinco cidades do Estado do Acre**. 2011. Tese (Doutorado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

FONSECA, E. R.; PARDAL, P. P.; SEVERO, L. C. Paracoccidioidomycosis in children in Belém, Pará State, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 1, p. 31-33, 1999.

GEGEMBAUER, G.; ARAUJO, L. M.; PEREIRA, E. F.; RODRIGUES, A. M.; PANIAGO, A. M. M.; HAHN, R. C.; DE CAMARGO, Z. P. Serology of

paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*. **PLoS neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. 1-12, 2014.

GUARNER, J.; BRANDT, M. E. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 2, p. 247-280, 2011.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, n. 41, p. 95-98, 1999.

JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. Evolution of protein molecules (In Munro HN). **Mammalian Protein Metabolism**. New York, v. 33, p. 21-132. 1969.

LACAZ, C. d. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; TAKAHASHI DE MELO, N. **Tratado de micologia médica**. 6 ed. São Paulo, Sarvier, 2002.

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

MARTINEZ, R. New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 1-13, 2017.

MENDES, R. P.; DE SOUZA CAVALCANTE, R.; MARQUES, S. A.; MARQUES, M. E. A.; VENTURINI, J.; SYLVESTRE, T. F.; PANIAGO, A. M. M.; PEREIRA, A. C.; DA SILVA, J. d. F.; FABRO, A. T. Paracoccidioidomycosis: current perspectives from Brazil. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, n. p. 224, 2017.

MORETO, T.; MARQUES, M. E. A.; DE OLIVEIRA, M.; MORIS, D.; DE CARVALHO, L.; MENDES, R. P. Accuracy of routine diagnostic tests used in paracoccidioidomycosis patients at a university hospital. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 8, p. 473-478, 2011.

MUÑOZ, J. F.; FARRER, R. A.; DESJARDINS, C. A.; GALLO, J. E.; SYKES, S.; SAKTHIKUMAR, S.; MISAS, E.; WHISTON, E. A.; BAGAGLI, E.; SOARES, C. M. Genome diversity, recombination, and virulence across the major lineages of *Paracoccidioides*. **American Society for Microbiology**, v. 1, n. 5, p. 1-18, 2016.

MUÑOZ, J. F.; MCEWEN, J. G.; CLAY, O. K.; CUOMO, C. A. Genome analysis reveals evolutionary mechanisms of adaptation in systemic dimorphic fungi. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2018.

PEÇANHA-PIETROBOMON, P.; COLOMBO, A. Paracoccidioidomycosis in immunocompromised patients: a literature review. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 1, p. 2, 2019.

PEÇANHA, P. M.; FERREIRA, M. E. B.; PEÇANHA, M. A. M.; SCHMIDT, E. B.; DE ARAÚJO, M. L.; ZANOTTI, R. L.; POTRATZ, F. F.; NUNES, N. E. D.; FERREIRA JR, C. U. G.; DELMAESTRO, D. Paracoccidioidomycosis: epidemiological

and clinical aspects in 546 cases studied in the State of Espírito Santo, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 3, p. 836-844, 2017.

QUEIROZ-TELLES, F.; FAHAL, A. H.; FALCI, D. R.; CACERES, D. H.; CHILLER, T.; PASQUALOTTO, A. C. Neglected endemic mycoses. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. 367-377, 2017.

SALZER, H. J.; BURCHARD, G.; CORNELLY, O. A.; LANGE, C.; ROLLING, T.; SCHMIEDEL, S.; LIBMAN, M.; CAPONE, D.; LE, T.; DALCOLMO, M. P. Diagnosis and management of systemic endemic mycoses causing pulmonary disease. **Respiration**, v. 96, n. 3, p. 283-301, 2018.

SANABRIA PEÑA, C. L.; ALARCÓN TARAZONA, M. L.; ALARCÓN, I. E.; JAIMES DAZA, M. F. Paracoccidioidomycosis. Una enfermedad multisistémica. **Acta Medica Colombiana**, v. 43, n. 2, p. 111-114, 2018.

SEYEDMOUSAVI, S.; GUILLOT, J.; TOLOOE, A.; VERWEIJ, P. E.; DE HOOG, G. S. Neglected fungal zoonoses: hidden threats to man and animals. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 5, p. 416-425, 2015.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; QUEIROZ-TELLES, F. d.; KONO, A. S. G.; PANIAGO, A. M.; NATHAN, A.; VALLE, A. C. F. d.; BAGAGLI, E.; BENARD, G. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 715-740, 2017.

SOUZA, A. R. C. d.; BALDONI, D. B.; LIMA, J.; PORTO, V.; MARCUZ, C.; MACHADO, C.; FERRAZ, R. C.; KUHN, R. C.; JACQUES, R. J.; GUEDES, J. V. Selection, isolation, and identification of fungi for bioherbicide production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 101-108, 2017.

TABORDA, C.; URÁN, M.; NOSANCHUK, J. D.; TRAVASSOS, L. Paracoccidioidomycosis: challenges in the development of a vaccine against an endemic mycosis in the Americas. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 19, p. 21-24, 2015.

TEIXEIRA, M. d. M.; THEODORO, R. C.; OLIVEIRA, F. F. M. d.; MACHADO, G. C.; HAHN, R. C.; BAGAGLI, E.; SAN-BLAS, G.; SOARES FELIPE, M. S. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. **Medical Mycology**, v. 52, n. 1, p. 19-28, 2013.

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

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

ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; PIZZINI, C. V.; DE MEDEIROS MUNIZ, M.; DO VALLE, A. C. F.; ALMEIDA-PAES, R. Diagnostic aspects of paracoccidioidomycosis. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 1, n. 2, p. 111-118, 2014.

CONCLUSÕES GERAIS

- A análise epidemiológica da paracoccidioidomicose na Amazônia Brasileira revelou que o estado de Rondônia apresenta uma alta frequência da doença.
- Foram identificados a presença de fungos com característica do gênero *Paracoccidioides* spp. em solos da Amazônia Sul Ocidental.
- Um caso confirmado de paracoccidioidomicose foi relatado no estado do Acre.

ANEXO

Parecer Nº 2.987.220 2081 CEP / HCA/FUNDHACRE

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DO
ACRE - HCA/FUNDHACRE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo clínico, epidemiológico, sorológico e molecular da Paracoccidioidomicose Pulmonar em Rio Branco, Acre, Brasil

Pesquisador: RITA DO SOCORRO UCHOA DA SILVA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 95076618.6.0000.5009

Instituição Proponente: Fundação Hospital Estadual do Acre - FUNDHACRE

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.987.220

Apresentação do Projeto:

APRESENTAÇÃO DO PROJETO

A Paracoccidioidomicose é causada por fungos do gênero Paracoccidioides, ocorrendo exclusivamente na América Latina, principalmente na América do Sul, onde o Brasil é o país com maior número de casos. As regiões Sul, Sudeste, Centro Oeste e a Amazônia são áreas consideradas endêmicas. Na maioria dos trabalhos publicados a espécie envolvida é Paracoccidioides brasiliensis, porém em Rondônia, estado que compõe a Amazônia Ocidental, houve identificação de uma nova espécie, P. lutzii. Os trabalhos acerca da paracoccidioidomicose na Amazônia são escassos e como tal infecção não é de notificação compulsória, pouco se conhece em relação aos aspectos epidemiológicos, clínicos e micológicos da paracoccidioidomicose que afeta a população acreana. O objetivo desse projeto é descrever o perfil clínico-epidemiológico-sorológico-molecular de pacientes acometidos por paracoccidioidomicose na cidade de Rio Branco-Acre. Serão coletadas 500 amostras de escarro e sangue de pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar atendidos nas Unidades de Referência de Atenção Primária (URAP) Augusto Hidalgo de Lima, Roney Meireles e a Polílica Barral y Barral vinculadas ao Sistema Municipal de Saúde (SEMSA) e serão encaminhados ao Laboratório Central de Saúde Pública do Acre (LACEN), vinculado Secretaria Estadual de Saúde do Acre. As amostras de

Endereço: BR 364 - Km 02

Bairro: Distrito Industrial

CEP: 69.914-217

UF: AC

Município: RIO BRANCO

Telefone: (68)3226-4809

Fax: (68)3226-4809

E-mail: cep.hc@ac.gov.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DO
ACRE - HCA/FUNDHACRE



Continuação do Parecer: 2.987.220

escarro passarão por pesquisa direta com KOH, cultivo em Mycosel e pesquisa por reação em cadeia da polimerase (PCR) de *Paracoccidioides* spp. As linhagens isoladas de *Paracoccidioides* spp. obtidos serão submetidos a sequenciamento para determinação da espécie isolada. As amostras de sangue serão centrifugadas e no soro será realizada a pesquisa de anticorpos Ac-P. *brasiliensis* e Ac-P. *lutzii* utilizando a técnica de imunodifusão direta. Para a avaliação do perfil epidemiológico, os pacientes preencherão um questionário epidemiológico. Uma vez confirmado o diagnóstico laboratorial da micose por exame micológico direto, cultura, PCR ou sorologia, os pacientes serão contactados através dos dados pessoais fornecidos no momento da abordagem inicial, encaminhado ao Serviço de Assistência Especializada (SAE) e atendidos por médicos infectologistas, e serão avaliados em relação ao tratamento, se ambulatorial ou internação hospitalar com os medicamentos adequados (itraconazol, sulfametoaxol + trimetoprim ou anfotericina B). Todos os pacientes que assinarem o termo de consentimento para participar do projeto serão acompanhados em todas as etapas do projeto e no SAE pelo tempo necessário para finalização do tratamento e cura.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO PRIMÁRIO: Estudar os aspectos clínico, epidemiológico, sorológico e molecular da Paracoccidioidomicose Pulmonar em Rio Branco, Acre, Brasil.

OBJETIVO SECUNDÁRIO:

Subprojeto 1: Investigar a presença de *Paracoccidioides* spp. em amostras de escarro de pacientes com suspeita de Tuberculose pulmonar;

Subprojeto 2: Comparar a sensibilidade e especificidade da PCR com a pesquisa direta *Paracoccidioides* spp. em amostras de escarro de pacientes com suspeita de Tuberculose pulmonar;

Subprojeto 3: Realizar a pesquisa de anticorpos para *Paracoccidioides* spp. em amostras de soro de pacientes com suspeita de Tuberculose pulmonar;

Subprojeto 4: Descrever os aspectos epidemiológicos dos pacientes confirmados com presença de *Paracoccidioides* spp. em amostras de escarro;

Subprojeto 5: Observar os aspectos clínicos dos pacientes confirmados com presença de *Paracoccidioides* spp. em amostras de escarro.

Endereço: BR 364 - Km 02

Bairro: Distrito Industrial

CEP: 69.914-217

UF: AC

Município: RIO BRANCO

Telefone: (68)3226-4809

Fax: (68)3226-4809

E-mail: cep.hc@ac.gov.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DO
ACRE - HCA/FUNDHACRE



Continuação do Parecer: 2.987.220

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

BENEFÍCIOS: A detecção dos casos de Paracoccidiodomicose pulmonar por métodos micológicos, sorológicos ou molecular é um benefício direto para o participante que terá um diagnóstico sobre o processo infeccioso que está desenvolvendo e a assim possibilitar acompanhamento médico e tratamento.

A obtenção do perfil epidemiológico dos pacientes irá contribuir com estudos prospectivos que permitirão um mapeamento da doença no município de Rio Branco.

RISCOS: Para análise dos dados micológicos, sorológicos, molecular e clínico será utilizada estatística descritiva.

Será utilizado o programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences) para a construção de um banco de dados com as características epidemiológicas dos pacientes, a partir do questionário misto respondido pelos participantes da pesquisa. A medida de associação utilizada será o Odds Ratio (OR) e sua variabilidade será avaliada por meio do intervalo de confiança de 95 %. Os testes estatísticos utilizados para as amostras pareadas serão o teste t de Student para comparação de médias e o não paramétrico Qui-quadrado para comparação de proporções. O nível de significância estatística considerado será de 5 % (P 0,05). A análise descritiva será realizada com cálculo de média e desvio-padrão para variáveis quantitativas e proporção de casos para variáveis qualitativas.

3. Aspectos Éticos

3.1 Riscos, providências e cautelas

A pesquisa apresenta risco de constrangimento para os participantes, pois como critério de inclusão, este deve ser sintomático respiratório com suspeita de tuberculose pulmonar, doença há séculos com estigma social e cultural. Para minimizar este risco, o paciente será abordado de forma particular, e posteriormente levado a uma sala privada para ser explicado o objetivo e metodologia do trabalho.

Para coleta de escarro, todos os coletores serão identificados com número de registro antes de ser entregue ao paciente para evitar possíveis trocas de amostras e o desconforto de uma nova coleta. Durante a espera para a entrega das amostras de escarro em um ambiente fechado e sem ventilação os pacientes suspeitos de tuberculose pulmonar podem transmitir e se expor a outros tipos de doença. Desta forma, os mesmos serão acomodados em ambientes arejados, e o atendimento será ágil de forma que estes não permaneçam aglomerados por muito tempo.

Endereço: BR 364 - Km 02
Bairro: Distrito Industrial **CEP:** 69.914-217
UF: AC **Município:** RIO BRANCO
Telefone: (68)3226-4809 **Fax:** (68)3226-4809 **E-mail:** cep.hc@ac.gov.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DO
ACRE - HCA/FUNDHACRE



Continuação do Parecer: 2.987.220

Para a coleta de sangue, todos os materiais utilizados durante a punção venosa serão descartáveis, evitando assim o risco de contaminação dos pacientes pelo uso de seringas e agulhas. A identificação, coleta, manuseio e armazenamento do material biológico será realizado de forma cautelosa para evitar a perda de amostras, e conseqüentemente preservar o paciente para que este não passe pelo desconforto de uma nova coleta, assim como evitar o diagnóstico tardio.

A execução inadequada da coleta e pressão local da punção são fatores que contribuem para a formação de hematomas no tecido dos pacientes. Para evitar a formação de hematomas o flebotomista será realizada a coleta com cautela, alertado o paciente para que não dobre o braço após o término da coleta, a agulha irá penetrar apenas a parede superior da veia, o torniquete será de apenas um minuto e caso seja observado a formação de hematomas a coleta será interrompida, retirando o torniquete, a agulha e posteriormente o local pressionado com algodão.

A pesquisa epidemiológica e clínica apresenta risco de constrangimento para os participantes pela declaração das suas informações pessoais e de caráter epidemiológico, assim como a associação de resultados positivos com os respectivos pacientes, para minimizar esse risco as amostras e questionários serão identificados por número para resguardar a identidade do paciente.

Os pesquisadores responsáveis assinaram um termo de privacidade e confiabilidade dos dados que será entregue ao participante, como também durante a aplicação do questionário partiram do princípio da impessoalidade, comportando-se de forma imparcial quanto às respostas dos participantes, respeitando em toda a etapa da pesquisa a dignidade, a liberdade e a autonomia do ser humano, garantindo manter o mais amplo, absoluto e restrito sigilo profissional durante e após o término da pesquisa. Os resultados obtidos na pesquisa serão utilizados para fins científicos, e assim a identidade dos pacientes participantes será resguardada

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

COMENTÁRIOS E CONSIDERAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Trata-se de um estudo observacional descritivo, de corte transversal, com recrutamento prospectivo de pacientes ao longo de um ano.

Por não ser uma doença de notificação compulsória, poucos são os dados a respeito da incidência de Paracoccidiodomicose na região Amazônica, inclusive no estado do Acre, onde existe uma lacuna a respeito destas informações. Esta proposta, preconiza, investigar a incidência desta micose na cidade.

O trabalho é o primeiro com este enfoque específico e de tão complexa busca em Rio Branco, visto pelo período de um ano ser analisadas amostras de escarro e soro de pacientes suspeitos de

Endereço: BR 364 - Km 02
Bairro: Distrito Industrial **CEP:** 69.914-217
UF: AC **Município:** RIO BRANCO
Telefone: (68)3226-4809 **Fax:** (68)3226-4809 **E-mail:** cep.hc@ac.gov.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DO
ACRE - HCA/FUNDHACRE



Continuação do Parecer: 2.987.220

tuberculose pulmonar, com a qual muitas vezes a paracoccidioidomicose é confundida ou ainda o paciente pode estar co-infectado. A implementação de métodos diagnósticos possibilitará o tratamento de pacientes que evoluíram com sequelas graves e distúrbios funcionais que podem resultar no óbito do paciente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

CONFORMIDADE COM RESOLUÇÃO Nº 466, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2012

Recomendações:

PROJETO EM CONFORMIDADE COM RESOLUÇÃO Nº 466, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2012

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

PROJETO EM CONFORMIDADE COM RESOLUÇÃO Nº 466, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2012

Considerações Finais a critério do CEP:

PROJETO E ANEXOS EM CONFORMIDADE COM RESOLUÇÃO Nº 466, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2012

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------|------------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1143678.pdf | 02/10/2018 17:58:01 | | Aceito |
| Outros | financiamento.pdf | 02/10/2018 17:57:05 | IASMINY RANIELLY SILVA FERREIRA | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | pesquisa.pdf | 01/08/2018 12:56:52 | IASMINY RANIELLY SILVA FERREIRA | Aceito |
| Outros | carta.pdf | 01/08/2018 12:55:55 | IASMINY RANIELLY SILVA FERREIRA | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | compromisso.pdf | 01/08/2018 12:55:39 | IASMINY RANIELLY SILVA FERREIRA | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | tcle.pdf | 01/08/2018 12:52:46 | IASMINY RANIELLY SILVA FERREIRA | Aceito |
| Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco | Biorrepositorio.pdf | 23/07/2018 19:32:03 | IASMINY RANIELLY SILVA FERREIRA | Aceito |
| Projeto Detalhado | projeto.docx | 23/07/2018 | IASMINY RANIELLY | Aceito |

Endereço: BR 364 - Km 02

Bairro: Distrito Industrial

CEP: 69.914-217

UF: AC

Município: RIO BRANCO

Telefone: (68)3226-4809

Fax: (68)3226-4809

E-mail: cep.hc@ac.gov.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DO
ACRE - HCA/FUNDHACRE



Continuação do Parecer: 2.987.220

| | | | | |
|--------------------------------------------|-------------------|------------------------|------------------------------------|--------|
| / Brochura Investigador | projeto.docx | 18:20:10 | SILVA FERREIRA | Aceito |
| Folha de Rosto | rosto.pdf | 23/07/2018 17:42:24 | IASMINY RANIELLY SILVA FERREIRA | Aceito |
| Outros | questionario.docx | 23/07/2018 17:01:13 | IASMINY RANIELLY SILVA FERREIRA | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | lacen.pdf | 18/07/2018 16:50:06 | IASMINY RANIELLY SILVA FERREIRA | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | fundhacre.pdf | 14/07/2018 23:27:50 | IASMINY RANIELLY SILVA FERREIRA | Aceito |
| Outros | dados.docx | 14/07/2018 23:25:35 | IASMINY RANIELLY SILVA FERREIRA | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | seme.pdf | 07/07/2018 17:13:58 | IASMINY RANIELLY SILVA FERREIRA | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO BRANCO, 29 de Outubro de 2018

Assinado por:
Maria José Lucas Mortari
(Coordenador(a))

Endereço: BR 364 - Km 02
Bairro: Distrito Industrial **CEP:** 69.914-217
UF: AC **Município:** RIO BRANCO
Telefone: (68)3226-4809 **Fax:** (68)3226-4809 **E-mail:** cep.hc@ac.gov.br

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

1. Estou sendo convidado (a) a participar de um projeto, que está sendo desenvolvida pela Universidade Federal do Acre sobre “Aspectos epidemiológicos e diagnósticos de uma doença infecciosa causada por um fungo conhecida como *Paracoccidioides*”.
2. Para que eu decida em participar ou não da pesquisa me foram prestadas as seguintes informações:
3. O título do projeto é “Estudo clínico, epidemiológico, sorológico e molecular da Paracoccidioidomicose Pulmonar em Rio Branco, Acre, Brasil”;
4. As pesquisadoras responsáveis são a Dra. Rita do Socorro Uchôa da Silva, médica infectologista e a Dra. Clarice Maia Carvalho, Farmacêutica, ambas professoras da Universidade Federal do Acre;
5. O objetivo geral da pesquisa é descrever os aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais (micológicos, sorológicos e molecular) da Paracoccidioidomicose na cidade de Rio Branco-Acre;
6. Foi esclarecido que nessa pesquisa responderei a algumas perguntas contidas em um questionário, além de entregar uma amostra do meu escarro e permitir a coleta de uma amostra de 5 mL de sangue, que será coletado pela minha veia. A amostra de escarro será utilizada para pesquisa do fungo causador da Paracoccidioidomicose e a amostra de sangue servirá para fazer um exame para verificar se eu tive contato com o fungo causador dessa doença;
7. Fui orientado que receberei dois frascos coletores descartáveis identificados com o número do meu registro e as iniciais do meu nome, eu mesmo (a) coletarei o meu escarro nesses recipientes seguindo as orientações fornecidas por um membro da equipe da pesquisa. Os dois frascos contendo escarro serão entregues a um membro da equipe de pesquisa em uma das unidades básicas de saúde participantes do projeto (Policlínica Barral y Barral, URAP Claudia Vitorino e URAP Augusto Hidalgo Lima), posteriormente estes serão encaminhados ao Laboratório Central de Saúde Pública do Acre (LACEN) para análise micológica e molecular;
8. A coleta de 5 mL de sangue da minha veia será realizada por um dos membros da equipe de pesquisa em uma das unidades básicas de saúde (Policlínica Barral

- y Barral, URAP Claudia Vitorino e URAP Augusto Hidalgo Lima), após a adequada limpeza do local da punção e usando exclusivamente seringas e agulhas descartáveis. Essa amostra de sangue será encaminhada ao Laboratório Central de Saúde Pública do Acre (LACEN) para análise;
9. Fiquei ciente de que todo material usado na coleta de escarro (frascos coletores) e na coleta de sangue (agulhas e seringas) serão estéreis e descartáveis, não oferecendo risco pra mim quanto à aquisição de doenças;
 10. O recipiente contendo meu sangue será identificado com o número de meu registro no momento da coleta e será armazenado em um freezer a uma temperatura de -80°C para posterior realização do exame;
 11. Um dos frascos contendo amostra de escarro será identificado com o número de meu registro e será armazenado em um freezer a uma temperatura de -80°C para posterior realização do exame;
 12. O prazo de armazenamento do seu material biológico será o mesmo definido no cronograma do projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas do Acre (COEP-FUNDACRE);
 13. Todos os materiais armazenados serão destruídos ao final do projeto de pesquisa;
 14. Estou ciente que não sou obrigado a participar dessa pesquisa, assim como poderei deixar de participar desse projeto a qualquer momento que quiser, pois não haverá nenhum prejuízo pessoal por isso.
 15. Tenho conhecimento que não haverá nenhum tipo de despesas para minha participação nessa pesquisa, assim como sei que não haverá receberei nenhum tipo de pagamento para participar da mesma.
 16. Entendo que o benefício para todos os que participarem ou não dessa pesquisa, é possibilitar a melhoria do conhecimento sobre a Paracoccidiodomicose na cidade de Rio Branco – Acre.
 17. A minha participação nessa pesquisa é sigilosa, isto significa que, somente os pesquisadores ficarão sabendo de minha participação. Os dados utilizados na pesquisa terão uso exclusivo neste trabalho, sem a identificação individual do participante.

Assinatura do pesquisador responsável

CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido (a) acerca do conteúdo da mesma, assim como seus riscos e benefícios. Declaro ainda que por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa cooperando com a coleta de escarro e sangue. Assim como, aceito conceder o material biológico para armazenamento no biorrepositório do Laboratório Central de Saúde Pública do Acre (LACEN).

Rio Branco, ____/____/____.

Assinatura do participante

Testemunha 1

Testemunha 2

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE

Centro de Ciências da Saúde e do Desporto

FONE: (68)99971-8028

EMAIL: rita.uchoa.acre@gmail.com