

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Isadora Cecília Linhares da Silva

Situação taxonômica de *Paracoccidioides* spp.: implicações ecológicas, clínico-epidemiológicas e laboratoriais decorrentes da descrição de novas espécies

Florianópolis

2022

Isadora Cecília Linhares da Silva

Situação taxonômica de *Paracoccidioides* spp.: implicações ecológicas, clínico-epidemiológicas e laboratoriais decorrentes da descrição de novas espécies

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia
Orientador: Prof. Dr. Jairo Ivo dos Santos

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Isadora Cecília Linhares da
Situação taxonômica de Paracoccidioides spp.: :
implicações ecológicas, clínico-epidemiológicas e
laboratoriais decorrentes da descrição de novas espécies /
Isadora Cecília Linhares da Silva ; orientador, Prof. Dr
Jairo Ivo dos Santos , 2022.
45 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Paracoccidioides spp. . 3. Especiação .
4. Reclassificação taxonômica. I. Santos , Prof. Dr Jairo
Ivo dos. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Graduação em Farmácia. III. Título.

Isadora Cecília Linhares da Silva

Situação taxonômica de *Paracoccidioides* spp.: implicações ecológicas, clínico-epidemiológicas e laboratoriais decorrentes da descrição de novas espécies

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Farmácia

Florianópolis, 14 de março de 2022.

Prof^ª. Dr^ª Liliete Canes Souza Cordeiro
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Jairo Ivo dos Santos
Orientador(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^ª. Dr^ª. Iara Fabrícia Kretzer
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^ª. Dr^ª. Fabiana Botelho de Miranda Onofre
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e meus irmãos por todo o suporte emocional e por acreditarem e confiarem em mim mais do que eu mesma. Aos meus avós, por proporcionarem todo o estudo que me permitiu chegar até aqui. Ao Professor Jairo, pela orientação, auxílio, e por rapidamente se prontificar a sanar todas as minhas dúvidas. Às Professoras Iara, Fabiana e Ziliani, que gentilmente aceitaram integrar minha banca avaliadora. Por fim, agradeço a todos os meus colegas de curso que se tornaram amigos pessoais, com quem compartilhei momentos maravilhosos ao longo dos últimos anos e os quais pretendo ter ao meu lado pelo resto da vida.

RESUMO

Os fungos são seres eucariontes, heterotróficos e aeróbicos pertencentes ao reino Fungi. Podem ser leveduriformes ou filamentosos, quanto à morfologia, e hialinos ou demácios, quanto à presença de pigmento em suas células. Os fungos são responsáveis pelas infecções conhecidas como micoses, que podem ser superficiais, cutâneas ou profundas. O gênero *Paracoccidioides* abriga fungos que apresentam dimorfismo térmico e são responsáveis pela paracoccidioidomicose, doença sistêmica endêmica na América do Sul e, em especial, no Brasil. A doença é adquirida através da inalação de conídios suspensos no ar e está principalmente associada a atividades de manejo de solo contaminado. A paracoccidioidomicose pode se desenvolver de forma aguda ou crônica. Uma recente reclassificação taxonômica resultou na descrição de três novas espécies dentro do gênero *Paracoccidioides*, totalizando cinco: *P. brasiliensis*, *P. americana*, *P. restrepiensis*, *P. venezuelensis* e *P. lutzii*. Foi realizada revisão bibliográfica integrativa nas bases de dados PubMed e Scielo BR com o objetivo de identificar quais critérios embasaram a determinação de novas espécies. Os resultados evidenciaram a diferenciação através de marcadores moleculares (gp43, ARF, tub1, RFLP e AFLP) como critério predominante. Marcadores imunoquímicos também permitiram a distinção entre os agentes etiológicos, através da produção de exoantígenos espécie-específicos, os quais, entretanto, estão sujeitos a reação cruzada dentro do complexo *brasiliensis*. A área de leveduras e número de brotamentos foram parâmetros morfológicos que permitiram diferir entre as novas espécies propostas. A combinação dos marcadores à evidência de isolamento reprodutivo e de que todas as espécies descritas são monofiléticas suporta a reclassificação taxonômica do gênero.

Palavras-chave: Reclassificação taxonômica; Especiação; *Paracoccidioides brasiliensis*; *Paracoccidioides americana*; *Paracoccidioides restrepiensis*; *Paracoccidioides venezuelensis*.

ABSTRACT

Fungi are eukaryotic, heterotrophic and aerobic beings belonging to the kingdom Fungi. They can be yeast-like or filamentous, in terms of morphology, and hyaline or demacia, in terms of the presence of pigment in their cells. Fungi are responsible for infections known as mycoses, which can be superficial, cutaneous or deep. The genus *Paracoccidioides* harbors fungi that are thermally dimorphic and are responsible for paracoccidioidomycosis, a systemic disease endemic in South America and, in particular, in Brazil. The disease is acquired through inhalation of airborne conidia and is mainly associated with contaminated soil management activities. Paracoccidioidomycosis can develop acutely or chronically. A recent taxonomic reclassification resulted in the description of three new species within the genus *Paracoccidioides*, totaling five: *P. brasiliensis*, *P. americana*, *P. restrepiensis*, *P. venezuelensis* and *P. lutzii*. An integrative literature review was carried out in the PubMed and Scielo BR databases in order to identify which criteria supported the determination of new species. The results showed the differentiation through molecular markers (gp43, ARF, tub1, RFLP and AFLP) as the predominant criteria. Immunological markers would also allow a distinction between etiological agents, through the production of species-specific exoantigens, which, however, are subject to cross-reaction within the *brasiliensis* complex. Yeast area and number of buds per yeast cell were morphological parameters that allowed differences between the proposed new species. The combination of markers and evidence of reproductive isolation and that all described species are monophyletic supports the taxonomic reclassification of the genus.

Keywords: Taxonomic reclassification; Speciation; *Paracoccidioides brasiliensis*; *Paracoccidioides americana*; *Paracoccidioides restrepiensis*; *Paracoccidioides venezuelensis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Micromorfologia de colônia de fungo hialino.	12
Figura 2 – Micromorfologia de colônia de fungo demácio.	6
Figura 3 – Aspectos ecológicos e de transmissão de <i>Paracoccidioides</i> spp.	8
Figura 4 – Levedura multigemulante de <i>Paracoccidioides</i> spp. em lesão, corada pelo método de Grocott.	10
Figura 5 – Colônia de <i>Paracoccidioides</i> spp., fase filamentosa.	11
Figura 6 – Colônia de <i>Paracoccidioides</i> spp., fase leveduriforme.	12
Figura 7 – Fluxograma de busca e seleção de dados.	18

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Relação de descritores utilizados segundo o DeCS e MeSH para a busca nas bases de dados.	22
Quadro 2 – Relação de publicações inclusas na revisão	25
Quadro 3 – Relação dos principais resultados moleculares	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ágar BHI – Brain Heart Infusion Agar
ARF – ADP-ribosylation Factor
AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism
A. fumigatus – *Aspergillus fumigatus*
C. albicans – *Candida albicans*
C. immitis – *Coccidioides immitis*
DeCS – Descritores em Ciências da Saúde
g – grama
H. capsulatum – *Histoplasma capsulatum*
ITS – Internal Transcribed Spacer
kb – kilobyte
kDa – kilodalton
kg – quilograma
KOH – hidróxido de potássio
MeSH – Medical Subject Headings
mg – miligrama
P. americana – *Paracoccidioides americana*
P. brasiliensis – *Paracoccidioides brasiliensis*
pb – pares de bases
PCM – paracoccidioidomicose
PCR – Polymerase Chain Reaction
P. lutzii – *Paracoccidioides lutzii*
P. restrepiensis – *Paracoccidioides restrepiensis*
P. venezuelensis – *Paracoccidioides venezuelensis*
rDNA – DNA ribossômico
RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism
SNPs – Single Nucleotide Polymorphisms
SUS – Sistema Único de Saúde
S. schenckii – *Sporothrix schenckii*

SUMÁRIO

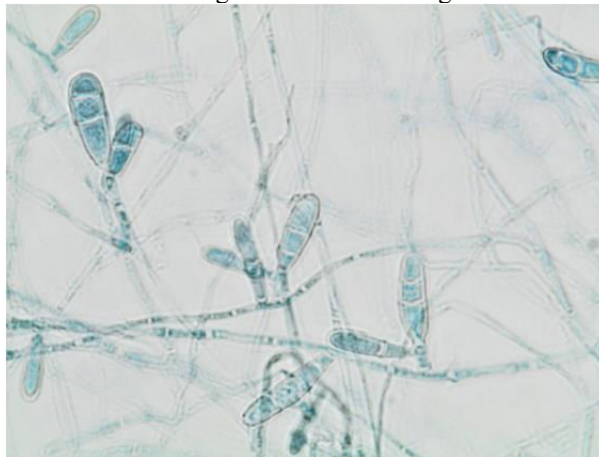
1.	INTRODUÇÃO	12
1.1	JUSTIFICATIVA	20
2.	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVO GERAL	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3.	METODOLOGIA.....	23
4.	RESULTADOS	24
4.1	MARCADORES MOLECULARES	27
4.2	MARCADORES IMUNOQUÍMICOS	35
4.3	MARCADORES MORFOLÓGICOS	36
5.	DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
	REFERÊNCIAS	40

1. INTRODUÇÃO

Fungos são seres eucariontes, aeróbicos e heterotróficos que constituem o Reino Fungi. Os fungos possuem necessidades nutricionais relativamente simples: a maioria das espécies é capaz de sobreviver em condições aeróbicas quando são fornecidos glicose, sais de amônio, íons inorgânicos e alguns fatores de crescimento (KAVANAGH, 2018).

Quanto à sua morfologia, os fungos podem ser leveduriformes, quando sua estrutura básica é formada por uma única célula independente, ou filamentosos, quando esta é composta por cadeias de células tubulares, conhecidas como filamentos micelianos ou hifas, cujo conjunto é chamado de micélio (BRASIL, 2013). Quando apresentam hifas transparentes, estes são chamados de fungos hialinos (Fig. 1), já quando apresentam hifas pigmentadas (acastanhadas), são chamados de fungos demácios (Fig. 2) (BRASIL, 2013; OLIVEIRA, J. F., 2014).

Figura 1 – Micromorfologia de colônia de fungo hialino.



Fonte: Oliveira (2014)

Figura 2 – Micromorfologia de colônia de fungo demácio.



Fonte: Oliveira (2014)

Algumas espécies de fungos apresentam dimorfismo térmico, isto é, transitam entre as formas filamentosas e leveduriformes, quando submetidas a diferentes temperaturas e ofertas de nutrientes. É o caso de fungos pertencentes às espécies dos gêneros *Sporothrix*, *Histoplasma* e *Paracoccidioides* (KAUFFMAN *et al.*, 2011; BRASIL, 2013; OLIVEIRA, J.F., 2014).

Os fungos podem causar infecções em seres humanos e animais, as chamadas micoses, que geralmente são classificadas de acordo com a localização anatômica das lesões, condições imunológicas do hospedeiro e a espécie de fungo envolvida. Têm-se, assim, as micoses superficiais, que são responsáveis por sintomas leves ou inexistentes, e incluem a pitíriase versicolor, pedras e tinha negra (OLIVEIRA, J.F., 2014; ZAITZ *et al.*, 2017). Existem também as micoses cutâneas, causadas por dermatófitos e espécies do gênero *Candida*, além de alguns fungos filamentosos hialinos ou demácios, cujas lesões podem apresentar graus variáveis de inflamação no tecido cutâneo (OLIVEIRA, J.F., 2014; ZAITZ *et al.*, 2017). Há, por fim, as micoses profundas, que acometem os tecidos subcutâneos ou se disseminam para vários órgãos, causadas por fungos patogênicos dimórficos como *Paracoccidioides*, *Sporothrix* e *Histoplasma*, ou por fungos oportunistas como *Candida*, *Cryptococcus*, zigomicetos da ordem *Mucorales* e hifomicetos anemófilos, hialinos ou demácios (OLIVEIRA, J.F., 2014; ZAITZ *et al.*, 2017).

Taxonomicamente, o gênero *Paracoccidioides* pertence à família *Onygenaceae*, Ordem *Onygenales*, Classe *Plectomycetes* e Filo *Ascomycota* (MOREIRA, 2008). Até o presente momento, o gênero abriga duas espécies: *P. brasiliensis*, considerada um complexo de quatro linhagens filogenéticas distintas (S1, PS2, PS3 e PS4) e *P. lutzii*, anteriormente descrita como a linhagem filogenética Pb01 (GONZALEZ & HERNANDEZ, 2016; OLIVEIRA, H.C. apud TEIXEIRA *et al.*, 2009). Estudos recentes, entretanto, propõem a promoção das linhagens filogenéticas do complexo *P. brasiliensis* a espécies taxonômicas formalmente descritas, as quais diferem geneticamente e morfologicamente entre si e das duas espécies já consolidadas. São elas: *P. brasiliensis* ou *P. brasiliensis sensu stricto* (linhagem S1), *P. americana* (linhagem PS2), *P. restrepiensis* (linhagem PS3) e *P. venezuelensis* (linhagem PS4).

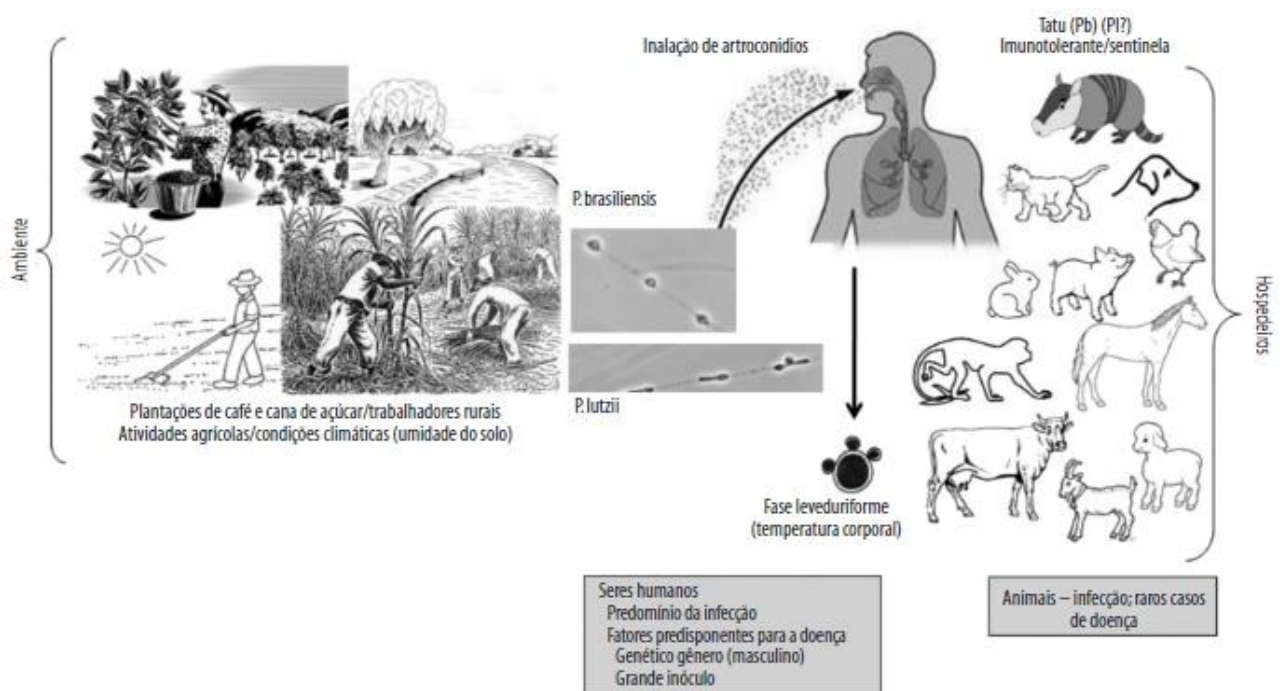
Paracoccidioides spp. pode infectar humanos, animais domésticos e selvagens, embora existam poucos registros de doença ativa em animais, como cães. O tatu é um reservatório conhecido de *P. brasiliensis*. As condições de vida saprofítica do fungo ainda não foram completamente estabelecidas. Em função das regiões endêmicas, acredita-se que *Paracoccidioides* spp. habite preferencialmente ambientes úmidos, com temperaturas médias

entre 18 e 24 °C e índices pluviométricos elevados (MARTINEZ, 2015; MOREIRA, 2008; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017).

O fungo tem sido identificado no solo e em aerossóis, por técnicas de triagem molecular, em amostras colhidas de tocas de animais ou locais com alta umidade protegidos por cobertura vegetal (MARTINEZ, 2015; MOREIRA, 2008; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017).

A infecção por *Paracoccidioides* ocorre através da inalação de conídios fúngicos suspensos no ar, e não há evidência de transmissão humana. O principal fator de risco à infecção pelo fungo são atividades relacionadas ao manejo de solo contaminado. Na maior parte dos casos de paracoccidioidomicose, os pacientes foram expostos a atividades agrícolas em suas primeiras décadas de vida (Fig. 3) (MARTINEZ, 2015; MOREIRA, 2008; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017).

Figura 3 – Aspectos ecológicos e de transmissão de *Paracoccidioides* spp.



Fonte: Shikanai-Yasuda *e cols.* (2018)

Casos autóctones de infecção por *Paracoccidioides* spp. são limitados ao continente americano, e cerca de 80% deles ocorrem no Brasil. As linhagens filogenéticas de *P. brasiliensis* S1a e S1b são predominantes na América do Sul, especialmente em países como Brasil, Argentina e Paraguai. A linhagem PS2 possui distribuição mais esporádica, com apenas dois casos de infecção relatados em humanos, na Venezuela e no Sudeste brasileiro. As

linhagens filogenéticas PS3 e PS4 são exclusivamente endêmicas na Colômbia e Venezuela, respectivamente. A espécie *P. lutzii*, por sua vez, é predominante nas regiões Centro-Oeste e Amazônica do Brasil e no Equador (MARTINEZ, 2015; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017).

Existe, no Brasil, uma grande área endêmica à infecção por *Paracoccidioides* spp., abrangendo as regiões Sudeste, Centro-Oeste e Sul. Uma segunda área endêmica está localizada na fronteira oriental da região Amazônica, incluindo os estados do Maranhão, Pará e Tocantins. Tem-se, por fim, uma terceira área endêmica que compreende a região da Amazônia Ocidental e o estado de Rondônia (MARTINEZ, 2015; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017).

Paracoccidioides spp. adentra o hospedeiro por via inalatória. A partir deste ponto, existem dois possíveis eventos pós-infecção: desenvolvimento de doença ativa ou formação, nos pulmões, de focos latentes, os quais podem se disseminar para outros órgãos e tecidos através da circulação linfática. Assim, em um intervalo de tempo variável, de até 60 anos, o quadro clínico de uma pessoa infectada pode progredir de focos quiescentes para doença ativa (MARQUES, 2012).

A infecção causada por *Paracoccidioides* spp. é denominada paracoccidioidomicose, e sua progressão é determinada pela resposta imune do hospedeiro. Quando a resposta imune é satisfatória, o corpo bloqueia a infecção logo em seu estágio inicial, além das eventuais metástases. Nesses casos, a reação inflamatória retrocede e formam-se cicatrizes estéreis, caracterizando a forma regressiva da doença, ou contendo fungos viáveis, porém latentes (MARQUES, 2012). Se a infecção progride rapidamente para uma doença sistêmica, tem-se a forma aguda ou subaguda da paracoccidioidomicose. Esta forma, também conhecida como forma juvenil, afeta principalmente crianças, adolescentes, jovens adultos (com menos de 30 anos) e indivíduos imunossuprimidos de ambos os sexos. Há tropismo do fungo para o sistema reticuloendotelial (MARTINEZ, 2015; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017).

A maioria das manifestações clínicas da forma aguda da micose envolve o sistema fagocíticomononuclear, como linfadenomegalia e hepatoesplenomegalia. Os sintomas também podem incluir manifestações cutâneas/mucosas e envolvimento osteoarticular. Febre, perda de peso e anorexia frequentemente acompanham a apresentação clínica. O envolvimento pulmonar é raro. Eosinofilia periférica é um achado laboratorial comum na forma aguda/subaguda da paracoccidioidomicose (RESTREPO, *et al.*, 2011; MENDES *et al.*, 2017; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017).

A forma crônica da doença é desenvolvida após um longo período de latência do fungo. Ela representa a maioria dos casos (entre 75 e 95%) e se manifesta predominantemente

em adultos maiores de 30 anos, sendo muito mais comum entre homens (mais de 95% dos indivíduos afetados são do sexo masculino). Os sintomas da paracoccidiodomicose crônica são de longa duração, ou seja, persistem por mais de seis meses (RESTREPO *et al.*, 2011; MENDES *et al.*, 2017; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017).

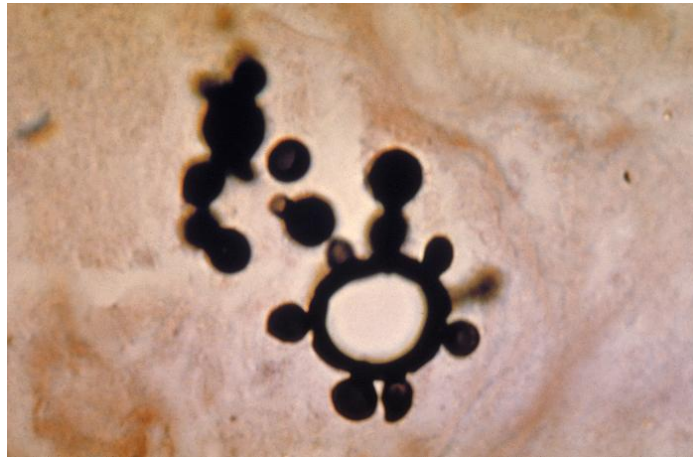
A doença pode se desenvolver sem qualquer indicação física. Quando sintomática, há, na maior parte dos casos, comprometimento do pulmão e das membranas mucosas. Lesões cutâneas também são comuns. Em cerca de 15% dos casos há comprometimento do sistema nervoso central. Quanto à severidade, a paracoccidiodomicose crônica é classificada em branda, moderada ou grave. Os casos graves são caracterizados por perda de peso significativa, comprometimento de outros órgãos ou sistemas, presença de linfonodos afetados de forma pseudotumoral ou supurativa e títulos de anticorpos elevados (RESTREPO *et al.*, 2011; MENDES *et al.*, 2017; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017).

O diagnóstico da paracoccidiodomicose pode ser feito através de microscopia direta de elementos fúngicos, exames histopatológicos de biópsias, cultura, e pesquisa de anticorpos anti-*Paracoccidioides* no soro (BRASIL, 2013; ZANCOPÉ-OLIVEIRA *et al.*, 2014; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017).

O exame direto com hidróxido de potássio (KOH) é positivo em 90% dos casos com lesão supurativa de pele, amostras de escarro ou biópsia de locais afetados, e revela leveduras esféricas, com parede celular refratária espessa, vacúolos intracitoplasmáticos e tamanho variável, projetadas em torno de uma célula central (formato de “roda de leme”) (BRASIL, 2013; ZANCOPÉ-OLIVEIRA *et al.*, 2014; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017).

O exame histopatológico requer coloração, como, por exemplo, com ácido periódico-Schiff ou com metenamina de prata de Grocott-Gomori (Fig. 4). Os achados revelam células epitelioides gigantes junto a infiltrados de leucócitos polimorfonucleares, monócitos e macrófagos cercando as leveduras. Nas lesões da pele e membrana mucosa são observados hiperplasia pseudoepiteliomatosa e abscessos intradérmicos. Pode haver necrose caseosa de gânglios linfáticos. Uma reação difusa do tecido é característica da forma aguda/subaguda da doença (BRASIL, 2013; ZANCOPÉ-OLIVEIRA *et al.*, 2014; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017).

Figura 4 – Levedura multigemulante de *Paracoccidioides* spp. em lesão, corada pelo método de Grocott.



Fonte: Georg (1963)

O padrão ouro para isolamento de *Paracoccidioides* spp. é o meio ágar Mycosel (ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e cicloheximida) incubado entre 19 e 24 °C, porém, para amostras estéreis, também é possível a utilização de meios sem adição de antibióticos, incubados a 36-37 °C (BRASIL, 2013; ZANCOPÉ-OLIVEIRA *et al.*, 2014; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017).

Embora *Paracoccidioides* possam crescer na temperatura corporal, a temperatura ideal de crescimento é entre 25 e 30 °C. As colônias filamentosas começam a crescer após duas a três semanas. Elas apresentam micélio branco que se torna marrom após algum tempo, com hifas septadas e ramificadas (Fig. 5). Raramente, alguns microconídios podem ser observados ao longo das hifas. Para a identificação final recomenda-se realizar a conversão para a fase leveduriforme a 37 °C com ágar BHI-sangue ou ágar Fava-Netto. Nestes meios o fungo cresce na forma de leveduras multigemulantes, semelhantes às observadas na lesão (Fig. 6). Se não houver crescimento após seis semanas as colônias são consideradas negativas (ZANCOPÉ-OLIVEIRA *et al.*, 2014; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017).

Figura 5 – Colônia de *Paracoccidioides* spp., fase filamentosa.



Fonte: Santos (2005)

Figura 6 – Colônia de *Paracoccidioides* spp., fase leveduriforme.



Fonte: Santos (2005)

A imunodifusão quantitativa, para mensuração dos níveis de anticorpos, é um ensaio de alta sensibilidade e especificidade (84,3 e 98,9%, respectivamente) amplamente disponível em regiões endêmicas. Pode, no entanto, apresentar resultados falso negativos em infecções por *P. lutzii*. A contra-immunoelectroforese também é uma alternativa, com 77 a 100% de sensibilidade e especificidade superior a 95%. Testes como o ELISA não são preconizados devido à possibilidade de reação cruzada com *Histoplasma capsulatum* e *Aspergillus* (ZANCOPÉ-OLIVEIRA *et al.*, 2014; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017; CORDOVA & TORRES, 2020).

Em geral, pacientes acometidos por formas severas da doença apresentam níveis de anticorpos significativamente mais altos em comparação à doença branda. A detecção de antígenos é preferível para diagnóstico precoce em pacientes imunocomprometidos ou quando a detecção de anticorpos é inconclusiva, além de ser um método eficaz para monitoramento do curso da doença. Os testes de pele apresentam baixa sensibilidade e não são utilizados como método diagnóstico de doença ativa, porém podem indicar infecção por *Paracoccidioides* spp. em indivíduo saudável habitante de região endêmica (CORDOVA & TORRES, 2020; RESTREPO *et al.*, 2011).

A primeira alternativa ao tratamento da paracoccidioidomicose foi a sulfapiridina, um derivado da sulfonamida (SILVA, 2020). *P. brasiliensis* e *P. lutzii* são suscetíveis à maioria dos antifúngicos de ação sistêmica, como os derivados azólicos, derivados da sulfonamida, formulações em desoxicolato, lipídio e complexo lipossomal da anfotericina B e terbinafina (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017). As opções terapêuticas estão limitadas àqueles que atuam em dois alvos principais: sobre a síntese de membrana plasmática ou de ácido fólico (SILVA, 2020).

Apesar do vasto arsenal de alternativas ao tratamento da paracoccidioidomicose, o itraconazol, a associação entre sulfametoxazol e trimetoprim e a anfotericina B são os antimicrobianos mais utilizados na prática clínica (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017). Para as formas suave e moderada da doença, o medicamento de escolha é o itraconazol em dose única diária de 200 mg, com a duração do tratamento variando entre 9 a 18 meses. O tratamento desses casos consiste em uma fase de indução, para controle de sintomas clínicos até que os parâmetros laboratoriais voltem aos valores normais, seguido por uma fase de manutenção, que dura até a interrupção da terapia. (SHIKANAI-YASUDA, 2015).

Em geral, observa-se cura das lesões tegumentares em 30 dias após o início do tratamento com itraconazol. As linfadenopatias regridem em cerca de 45 a 90 dias. Após seis

meses, há estabilização das imagens radiológicas. A associação entre sulfametoxazol 800 mg e trimetoprim 160 mg via oral a cada doze horas é a segunda escolha para o tratamento de formas suave e moderada da doença. É uma alternativa vantajosa, especialmente no Brasil, devido à ampla disponibilidade no SUS e às diferentes apresentações, como na forma de suspensão oral e solução intravenosa (SHINAKAY-YASUDA *et al.*, 2017).

Nas formas severas da doença, a anfotericina B intravenosa é o tratamento indicado, na dosagem de 1mg/kg/dia. A dose máxima diária de anfotericina B não deve exceder 3 g e o tratamento dura, em média, entre duas e quatro semanas. Existem, ainda, alguns estudos clínicos que indicam a eficácia do fluconazol (entre 600 a 800 mg diários) como opção terapêutica (BRASIL, 2005; SHIKANAI-YASUDA, 2015; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017).

Para acompanhamento da evolução pós-terapia medicamentosa, alguns parâmetros devem ser observados: involução das lesões ativas e resolução dos sinais e sintomas entre uma e oito semanas após início do tratamento; redução nas taxas de sedimentação de eritrócitos e normalização das proteínas de fase aguda entre quatro e doze semanas; redução das anormalidades alveolares em radiografias torácicas e do edema em ressonâncias magnéticas após 3 a 12 meses de terapia. Fibrose e granuloma podem persistir por anos (SHIKANAI-YASUDA, 2015; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017).

1.1 JUSTIFICATIVA

A especiação gênica do gênero *Paracoccidioides* é um assunto pouco explorado. Diferentes espécies podem, por exemplo, apresentar diferentes fatores de virulência. Assim, um estudo aprofundado sobre a diversidade genômica do patógeno pode contribuir para o entendimento sobre como a reclassificação taxonômica afeta os sintomas clínicos da infecção. São hipotetizados, ainda, potenciais impactos da extensa divergência genômica identificada entre as espécies, sobre sua distribuição geográfica, possíveis hospedeiros animais e diagnóstico da micose, especialmente em métodos baseados na busca de antígenos e anticorpos.

A descrição de diferentes populações filogenéticas do complexo *P. brasiliensis* e a definição de novas espécies, através de ferramentas de biologia molecular, podem implicar em variações na apresentação clínica dos pacientes, nos reservatórios animais, nas áreas geográficas de transmissão e na terapêutica da doença. É necessária, portanto, a reavaliação de tais aspectos, estudando, de forma mais profunda, as relações eco-epidemiológicas entre os diferentes agentes e seu hospedeiro frente à reclassificação taxonômica de *Paracoccidioides* spp. Esse conhecimento vai permitir que o profissional envolvido no diagnóstico da

paracoccidioidomicose possa definir melhor as ferramentas laboratoriais adequadas ao diagnóstico, assim como as medidas terapêuticas, profiláticas e preventivas para esta micose.

Ressalta-se, por fim, a importância do estudo no levantamento de dados acerca da paracoccidioidomicose, doença a qual, embora considerada a mais prevalente infecção sistêmica fúngica no Brasil, segue negligenciada em consequência da escassez de dados disponíveis.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar uma revisão bibliográfica integrativa da reclassificação de espécies de *Paracoccidioides* spp. no Brasil e em outros países da América Latina.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar pesquisa bibliográfica em aspectos clínico-laboratoriais e epidemiológicos das espécies crípticas do complexo *Paracoccidioides brasiliensis*;
- Confirmar se *Paracoccidioides americana*, *Paracoccidioides restrepiensis* e *Paracoccidioides venezuelensis* já são consideradas espécies válidas;
- Identificar quais critérios levaram à determinação de novas espécies a partir de *Paracoccidioides brasiliensis*.

3. METODOLOGIA

Revisão da literatura é o processo de busca, análise e descrição de um corpo do conhecimento em busca de resposta a uma pergunta específica (SAMPAIO, 2014).

O presente estudo foi desenvolvido através de revisão integrativa, metodologia que proporciona síntese do conhecimento e incorporação da aplicabilidade de resultados de estudos significativos na prática. Consiste na mais ampla das revisões de literatura, permitindo a inclusão de estudos experimentais e não experimentais, além da combinação de dados teóricos e empíricos (SOUZA, SILVA & CARVALHO, 2010).

A revisão integrativa é subdividida em seis etapas: elaboração da pergunta norteadora, busca ou amostragem na literatura, coleta de dados, análise crítica dos estudos incluídos, discussão dos resultados e apresentação da revisão integrativa (SOUZA, SILVA & CARVALHO, 2010).

A seleção das publicações a serem incluídas na revisão foi embasada pela seguinte questão norteadora: "quais critérios levaram à reclassificação taxonômica das linhagens filogenéticas PS2, PS3 e PS4 de *Paracoccidioides brasiliensis* às espécies taxonomicamente independentes *P. americana*, *P. restrepiensis* e *P. venezuelensis*?"

As buscas por publicações que abordassem o problema de pesquisa foram realizadas nas bases de dados PubMed e Scielo Brasil, através da definição dos descritores, conforme Medical Subject Headings (MeSH) e Descritores em Ciências da Saúde (DeCS), apresentados no quadro abaixo. Foram adotados, como critérios de inclusão, os idiomas português, inglês e espanhol, publicações cujo conteúdo estivesse disponibilizado em sua íntegra e um período de tempo de dez anos, compreendendo os anos de 2011 a 2021.

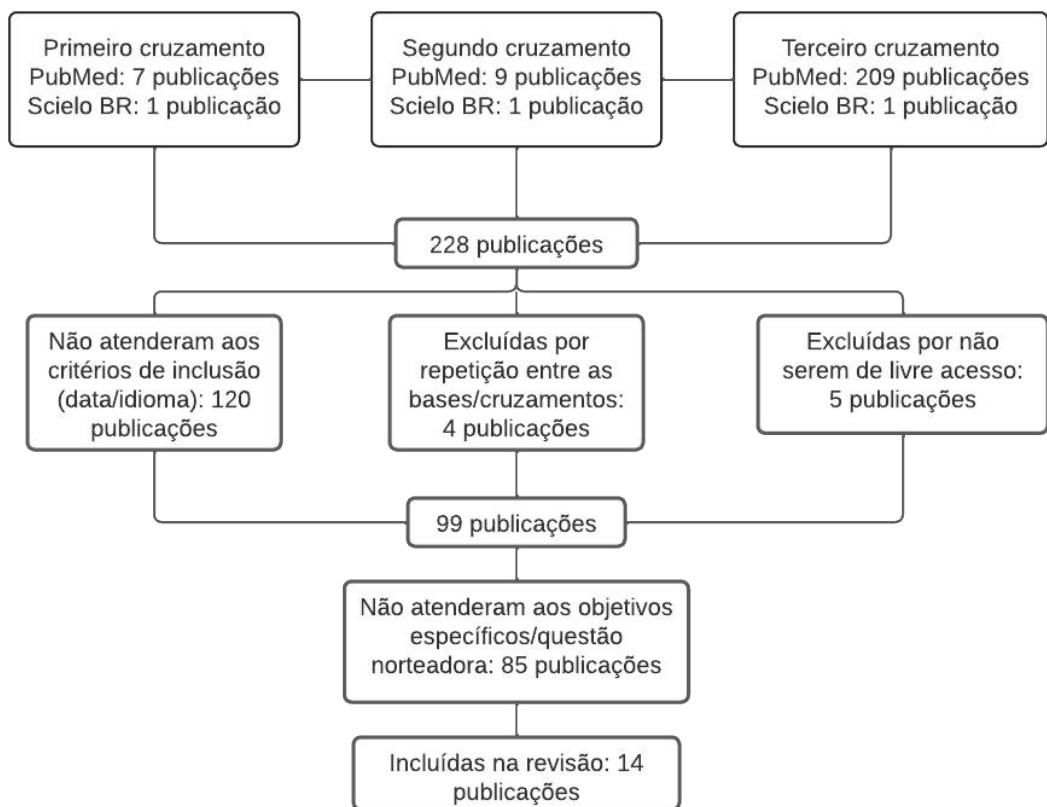
Quadro 1 – Relação de descritores utilizados segundo o DeCS e MeSH para a busca nas bases de dados.

Descritores utilizados (DeCS/MeSH)		
Português	Inglês	Espanhol
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	-	-
<i>Paracoccidioides americana</i>	-	-
<i>Paracoccidioides restrepiensis</i>	-	-

<i>Paracoccidioides venezuelensis</i>	-	-
Especiação genética	Genetic speciation	Especiación genética
Filogenia	Phylogeny	Filogenia
Espécies crípticas	Cryptic species	Espécies crípticas
Taxonomia	Taxonomy	Taxonomia

4. RESULTADOS

Figura 7 – Fluxograma de busca e seleção de dados.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

Foram realizados três cruzamentos entre os descritores: "*Paracoccidioides brasiliensis* AND *Paracoccidioides venezuelensis* AND *Paracoccidioides restrepiensis* AND *Paracoccidioides americana*"; "*Paracoccidioides brasiliensis* AND genetic speciation" e "phylogeny OR cryptic species OR taxonomy AND *Paracoccidioides brasiliensis*", totalizando

228 publicações. 120 artigos foram excluídos por não atenderem aos critérios de inclusão, quatro devido a repetições entre as bases de dados ou entre os cruzamentos e cinco por não serem de livre acesso, resultando em um total de 99. Foi realizada, em seguida, leitura criteriosa de cada um dos resumos, visando a exclusão de publicações que não atendessem aos objetivos específicos ou não contribuíssem à resposta da questão norteadora da revisão. Dessa forma, 14 artigos foram, por fim, incluídos no estudo.

O levantamento dos resultados permitiu o agrupamento dos dados em três grupos, conforme o tipo de evidência utilizado para distinguir entre as espécies: marcadores moleculares, marcadores imunológicos e marcadores morfológicos.

Quadro 2 – Relação de publicações inclusas na revisão

Autor	Título	Ano	Revista
ALVES, Fernanda L. <i>et al.</i>	Transposable elements and two other molecular markers as typing tools for the genus <i>Paracoccidioides</i> .	2014	Medical Mycology
ROBERTO, Thiago N. <i>et al.</i>	Identifying <i>Paracoccidioides</i> phylogenetic species by PCR-RFLP of the alpha-tubulin gene.	2015	Medical Mycology
TURISSINI, David A. <i>et al.</i>	Species boundaries in the human pathogen <i>Paracoccidioides</i> .	2017	Fungal Genetics And Biology
MARQUES, Sílvio A	Paracoccidioidomycosis.	2018	Clinics In Dermatology
HRYCYK, Marluce Francisca <i>et al.</i>	Ecology of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , <i>P. lutzii</i> and related species: infection in armadillos, soil occurrence and mycological aspects.	2018	Medical Mycology
MACEDO, Priscila Marques de <i>et al.</i>	Clinical features and genetic background of the sympatric species <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> and <i>Paracoccidioides americana</i> .	2019	Plos Neglected Tropical Diseases
BAGAGLI, Eduardo <i>et al.</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Isolated from Nine-Banded Armadillos (<i>Dasypus novemcinctus</i>)	2020	Journal Of Fungi

	Reveal Population Structure and Admixture in the Amazon Basin.		
COCIO, Tiago A. <i>et al.</i>	Phylogenetic Species of <i>Paracoccidioides</i> spp. isolated from Clinical and Environmental Samples in a Hyperendemic Area of Paracoccidioidomycosis in Southeastern Brazil.	2020	Journal Of Fungi
MAVENGERE, Heidi <i>et al.</i>	<i>Paracoccidioides</i> Genomes Reflect High Levels of Species Divergence and Little Interspecific Gene Flow.	2020	Mbio
MOREIRA, Adriana P. V.	Paracoccidioidomycose: histórico, etiologia, epidemiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos.	2020	Boletim Epidemiológico Paulista
TEIXEIRA, Marcus M. <i>et al.</i>	Genomic diversity of the human pathogen <i>Paracoccidioides</i> across the South American continent.	2020	Fungal Genetics And Biology
ANDRADE-SILVA, Juliana <i>et al.</i>	Molecular epidemiology of <i>Paracoccidioides</i> spp. recovered from patients with paracoccidioidomycosis in a teaching hospital from Minas Gerais State of Brazil.	2021	Plos Neglected Tropical Diseases
MATTOS, Karine <i>et al.</i>	An update on the occurrence of <i>Paracoccidioides</i> species in the Midwest region, Brazil: molecular epidemiology, clinical aspects and serological profile of patients from mato grosso do sul state.	2021	Plos Neglected Tropical Diseases
ROBERTO, T.N. <i>et al.</i>	Exploring genetic diversity, population structure, and	2021	Studies In Mycology

	phylogeography in <i>Paracoccidioides</i> species using AFLP markers.		
--	---	--	--

4.1 MARCADORES MOLECULARES

Quadro 3 – Relação dos principais resultados moleculares

Principais marcadores	Principais metodologias
gp43	Sequenciamento parcial
ARF	
ITS r-DNA	PCR
TUB-1	
Transposons	Sequenciamento completo de genoma
RFLP	
AFLP	

Quatro estudos sugeriram o sequenciamento do gene codificador da glicoproteína gp43 como um eficiente marcador molecular para a diferenciação entre as espécies de *Paracoccidioides* spp. A gp43 é o antígeno imunodominante em *P. brasiliensis* e é uma molécula de grande importância na virulência do patógeno. *P. brasiliensis* e *P. lutzii* possuem polimorfismos de base única (SNPs) próprios e característicos no gene codificador da glicoproteína, que evidenciam variação interespecífica e justificam seu emprego no reconhecimento das espécies (MACHADO, 2015). Macedo *et al.* (2019) através de sequenciamento parcial dos genes gp43 e do fator de ribosilação do ADP (ARF), pertencente a uma família altamente conservada de proteínas, puderam distinguir o agente etiológico de 54 isolados clínicos obtidos no estado do Rio de Janeiro: 48 eram indicativos de *P. brasiliensis*, os outros 6, *P. americana*. Ainda, cepas pertencentes a *P. americana* de mesma origem geográfica, isto é, mesmo local provável de infecção, foram agrupadas em diferentes clados, sugerindo a existência de genótipos crípticos na espécie. A detecção de ambas as espécies *P. brasiliensis* e *P. americana* na região corroboraram aos dados já presentes na literatura de que elas constituem

espécies simpátricas. O estudo detectou, por fim, uma alta taxa de comprometimento adrenal nos casos de PCM causados por *P. americana*, sugerindo um possível tropismo adrenal da espécie, além de a espécie ter sido associada a casos de disfonia. Os achados equivalem a resultados de outros estudos realizados na mesma região (área de ocorrência da espécie), propondo uma possível correlação entre o agente etiológico e a apresentação clínica da micose. Teixeira *et al.* (2020) realizaram sequenciamento *de novo* de 31 isolados obtidos de diferentes países da América do Sul. A análise de componentes principais sugere, além da presença de cinco linhagens distintas dentro do gênero, a existência de indivíduos mestiços, devido a quatro isolados dispersos na análise. A menor medida de diferenciação foi observada entre *P. brasiliensis* S1a e S1b, enquanto a maior se deu entre *P. lutzii* e todas as demais espécies pertencentes ao complexo *P. brasiliensis*. Todas as espécies apareceram como um grupo monofilético, isto é, aquele que inclui o ancestral comum mais recente do grupo e todos os seus descendentes. A identificação de isolados da Argentina e do Peru como *P. restrepiensis* mostrou que a espécie não é restrita à Colômbia, como anteriormente pensado. Os resultados identificaram extensa sobreposição geográfica entre as espécies: *P. americana* e *P. venezuelensis* coexistem na Venezuela. Tais resultados também são demonstrativos da coexistência em simpatria das diferentes espécies, e, devido à baixa evidência de fluxo gênico, os autores hipotetizam um acúmulo de barreiras gênicas.

Mavengere *et al.* (2020), através de sequenciamento de genoma completo, análise filogenética e ferramentas de genética de populações, testaram três hipóteses propostas pela recente descrição de novas espécies no gênero: todas as espécies devem ser reciprocamente monofiléticas, os pares de espécies devem ser altamente diferenciados ao longo de todo o genoma e deve haver baixa troca interespecífica de genes. A identificação dos limites entre as espécies e da introgressão, isto é, do fluxo de genes de uma espécie para o acervo genético de outra, tem implicações na saúde humana, visto que a introgressão pode ser um veículo para transferir fatores de virulência e resistência a antifúngicos. O estudo concluiu que *Paracoccidioides* spp. são haploides, com pouca evidência de aneuploidia. A construção de uma árvore de máxima verossimilhança concluiu que todas as espécies propostas são monofiléticas. Sugerem, também, que *P. restrepiensis* e *P. venezuelensis* são as espécies mais próximas do grupo. *P. brasiliensis sensu stricto* seria irmã desta díade e *P. americana* representa um grupo externo às outras três espécies do complexo *brasiliensis*. Em seguida, durante a análise de concordância genética, os fatores de concordância apresentaram resultados superiores a 90% para todas as cinco espécies propostas, com exceção apenas para os subgrupos

S1a e S1b. Não se sabe quão altos os valores de concordância devem ser para elevar um grupo a uma espécie, entretanto, como os valores foram muito inferiores aos demais, *P. brasiliensis sensu stricto* foi tratada como uma única espécie com forte estrutura populacional. Ao medir a distância genética média entre indivíduos, o estudo concluiu que as distâncias interespecíficas são, pelo menos, duas vezes maiores que as intraespecíficas para todos os pares de espécies. Quanto à magnitude de troca gênica, nenhuma evidência de introgressão foi identificada entre *P. lutzii* e as espécies pertencentes ao complexo *brasiliensis*. Introgressões muito pequenas, provavelmente antigas e fortemente selecionadas foram encontradas entre *P. americana* e as demais espécies do complexo. Uma evidência um pouco mais forte de fluxo gênico foi identificada entre os pares *P. brasiliensis/P. venezuelensis* e *P. brasiliensis/P. restrepiensis*. Embora mais comuns para a primeira dupla citada, em todos os casos, as introgressões ocorreram com baixa frequência, isto é, estavam presentes em um único isolado por espécie. A considerável divergência e monofilia recíproca encontradas pelo estudo sugerem um estágio avançado de especiação. A não evidenciada introgressão entre *P. lutzii* e as demais espécies é consistente com seu alto grau de divergência. As introgressões entre as demais espécies são raras e muito pequenas, as tornando potencialmente indistinguíveis. Devido à proximidade entre *P. restrepiensis* e *P. venezuelensis*, era esperado maior nível de troca gênica entre as espécies, mas os resultados não sustentaram a hipótese. Isso se deve, muito provavelmente, a questões geográficas: não há relato de sobreposição entre as duas espécies. O estudo evidencia que os limites entre as espécies são semipermeáveis e que, embora contribua, a sobreposição geográfica não é sinônimo de hibridização: no caso de espécies muito diferenciadas, híbridos não ocorrem mesmo quando compartilham região próxima.

Visando contribuir ao estudo da ecologia das diferentes espécies de *Paracoccidioides* spp, Hrycyk *et al.* (2018) realizaram sequenciamento da região ITS r-DNA e do exon 2 da gp43 de amostras do solo e de tatus representativas das regiões sudeste e centro-oeste. A comparação entre sequências de rDNA é uma abordagem amplamente utilizada para o estudo das relações entre espécies e populações, e tem fornecido vasta riqueza de informações sobre relações filogenéticas. As regiões espaçadoras internas (ITS) do DNA ribossômico evoluem rapidamente e apresentam alta taxa de polimorfismo, variando entre as espécies pertencentes a um gênero ou entre populações, e permitindo, assim, sua diferenciação (HILLIS & DIXON, 1991; WHITE *et al.*, 1990). Adicionalmente, foi feito PCR-RFLP (Polimorfismos de Comprimento de Fragmento de Restrição utilizando Reação em Cadeia da Polimerase) do gene codificador da alfa-tubulina (TUB1) e avaliados aspectos como transição levedura-micélio,

crescimento e produção de conídios. A alfa-tubulina, proteína que compõe os microtúbulos, é empregada em estudos filogenéticos das principais linhagens de fungos, como no processo de diferenciação de *Histoplasma capsulatum*, fungo dimórfico pertencente ao mesmo filo que *Paracoccidioides*. (KEELING, 2003; HARRIS, KEATH & MEDOFF, 1989). Os RFPL são marcadores moleculares cuja técnica baseia-se na digestão do DNA através do uso de enzimas de restrição. Estes polimorfismos podem ocorrer devido a substituição de nucleotídeos no sítio de reconhecimento da enzima rearranjo no DNA, inserção ou deleção (OLIVEIRA, A. J. *et al.*, 2021). A análise dos marcadores moleculares permitiu identificar três ocorrências de *P. brasiliensis* S1a, 12 ocorrências de *P. brasiliensis* S1b e apenas uma ocorrência de *P. americana*. Foi possível, também, concluir que os tatus são altamente infectados por *P. brasiliensis*, incluindo infecções múltiplas: foram detectados dois casos de infecção simultânea, um entre os genótipos S1a e S1b de *P. brasiliensis* e outro entre S1a e *P. americana*. O mesmo, entretanto, não parece ocorrer para *P. lutzii*. Como anteriormente citado, a ocorrência dos três diferentes genótipos na mesma região é indicativa de que as espécies *P. brasiliensis* e *P. americana* sejam simpátricas, e pode ser explicada pelas condições ambientais como a ocorrência de vegetação diversificada. Bagagli *et al.* (2021), através de identificação de SNPs, compararam os genótipos de sete cepas de *Paracoccidioides* spp. obtidas de tatus das regiões sudeste e centro-oeste a 63 genomas previamente descritos de isolados do animal. Sua pesquisa concluiu que tatus são comumente infectados por *P. brasiliensis*, *P. americana* e *P. restrepiensis*, mas o mesmo não acontece para *P. lutzii*. Ainda, a coinfeção de um dos tatus por *P. americana* e *P. restrepiensis* evidenciou a ocupação de um mesmo nicho ecológico por ambas as espécies que, apesar da oportunidade de cruzamento, não apresentam nenhuma evidência de troca gênica. Ainda sobre a possibilidade de intercambialidade gênica, foi identificado fluxo de genes entre quatro isolados; entretanto, os híbridos eram pertencentes a diferentes populações de uma mesma espécie, *Paracoccidioides brasiliensis sensu stricto*.

Através de técnica de PCR convencional, Andrade-Silva *et al.* (2021) realizaram sequenciamento do exon 2 gp43 e do gene ARF de 23 isolados clínicos obtidos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, comparando-os a 151 genomas previamente sequenciados. O gene codificador da gp43 apresentou a maior variabilidade e foi considerado a principal razão para a diferenciação entre as espécies. Trinta e três entre os 35 tipos de alelos deste locus era espécie-específico. O locus ARF também exibiu alelos exclusivos das espécies *P. lutzii* e *P. americana*. Dentre os 23 isolados clínicos, 22 foram identificados como *P. brasiliensis*, e um pertencente à espécie *P. americana*. A espécie *P. brasiliensis* foi a mais polimórfica, constituindo 19

diferentes haplótipos. *P. venezuelensis*, por sua vez, constituiu apenas dois haplótipos distintos. Foram, ainda, encontrados haplótipos exclusivos de acordo com a origem clínica e área geográfica. Os resultados permitem inferir grande variabilidade intraespecífica para *P. brasiliensis* e confirmam a predominância da espécie na região. Propõem, ainda, uma correlação entre o perfil molecular e a forma clínica e origem geográfica dos casos de PCM.

Um caso raro de PCM relatado por Marques *et al.* (2018) reforça o papel das técnicas de biologia molecular no diagnóstico e na determinação do real impacto das novas espécies: o paciente não apresentou qualquer outro sinal e/ou sintoma (febre, perda de peso, comprometimento pulmonar, etc.) característico da micose, além de não alegar nenhuma comorbidade. A histopatologia revelou um infiltrado denso e granulomatoso de histiócitos e células fúngicas raras, gigantes e multinucleadas melhor visualizadas quando coradas com metenamina de prata, constituindo um desafio diagnóstico considerando a possibilidade de má interpretação do caso como hanseníase ou outras doenças infecciosas. A sorologia foi negativa para *Paracoccidioides* spp. Através de sequenciamento da região ITS rDNA e do loci exon2 gp43, seguido de PCR-RFLP do gene TUB1, entretanto, foi possível solucionar o caso: tratava-se de PCM causada por *Paracoccidioides brasiliensis sensu stricto* (S1a).

Mattos *et al.* (2021) descreveram a genotipagem por PCR-RFLP do gene TUB1 de 16 isolados obtidos a partir de 13 casos ocorridos no estado do Mato Grosso do Sul entre os anos de 2016 e 2019, comparando-as a cepas de referência cujo genoma foi previamente descrito. Dos 16 isolados, a genotipagem revelou que 11 pertenciam à espécie *P. brasiliensis sensu stricto*, quatro à *P. restrepiensis* e um à *P. lutzii*. A análise filogenética revelou um ancestral em comum entre as espécies *P. brasiliensis sensu stricto* e *P. restrepiensis*, sugerindo que *P. brasiliensis sensu stricto* possa ter sofrido especiação a partir de uma barreira geográfica, gerando *P. restrepiensis*. Em estudo semelhante, Roberto *et al.* (2015), realizaram análise *in silico* de 90 sequências do gene TUB1 de *Paracoccidioides* spp., identificando duas enzimas de restrição com potencial para diferenciação entre as linhagens filogenéticas (à época, ainda não eram descritas como espécies): Bcl 1 e Msp 1. A digestão *in silico* de sequências TUB1 pertencentes ao grupo S1 revelou apenas um sítio de restrição, reconhecido por Bcl1, que gerou dois fragmentos (155 pb e 108 pb). As sequências de PS2 incluíram dois locais de clivagem distintos, reconhecidos por ambas as endonucleases, gerando três bandas (62 pb, 93 pb e 108 pb). As sequências pertencentes a PS3 não tiveram nenhum sítio de restrição reconhecido; o gene permaneceu íntegro (263 pb). Para confirmação dos resultados, o mesmo método foi

aplicado *in vitro* em 40 amostras de isolados clínicos e ambientais. Os resultados confirmaram a reprodutibilidade dos padrões obtidos no ensaio *in silico*.

Visando contribuir à eco-epidemiologia da PCM, Cocio *et al.* (2020), aplicaram PCR-RFLP do gene TUB1 e sequenciamento do exon 2 gp43 a 50 isolados obtidos de amostras clínicas de pacientes tratados em Ribeirão Preto e Foz do Iguaçu e amostras ambientais obtidas do solo e de tatus infectados. A técnica de PCR-RFLP do gene TUB1 resultou em 47 isolados que tiveram o local de restrição reconhecido pela enzima Bcl1, gerando 2 fragmentos (155 e 108bp) e sendo identificados, assim, como *P. brasiliensis sensu stricto*. Os resultados foram concordantes ao sequenciamento do exon 2 gp43: 47 isolados foram identificados como *P. brasiliensis sensu stricto* (S1), cinco deles com 100% de identificação com a população S1a, os demais, S1b. Um dos isolados utilizados no estudo teve seu local de clivagem reconhecido por ambas as endonucleases (Bcl1 e Msp1), gerando três fragmentos (62, 93 e 108 bp) e sendo classificado como *P. americana*. O resultado foi confirmado pelo sequenciamento, apresentando 100% de similaridade à cepa de referência para a espécie. A mesma similaridade foi obtida para a cepa de referência para *P. restrepiensis* em relação ao isolado não reconhecido por nenhuma das enzimas, cujo gene permaneceu íntegro (263 bp). A determinação da espécie foi inconclusiva através da amplificação do gene TUB1 para um dos isolados incluídos no estudo, o qual, posteriormente, foi identificado como pertencente à espécie *P. lutzii* através de sequenciamento do exon 2 gp43 e da região ITS rDNA. A maior prevalência de *P. brasiliensis sensu stricto* confirmou dados anteriores que alegam alta incidência dessa espécie filogenética nas regiões sudeste e sul do Brasil. O estudo também concluiu que *P. americana* é endêmica na região sudeste brasileira. O paciente diagnosticado com PCM causada por *P. restrepiensis* não apresentou histórico de migração, evidenciando, novamente, que a ocorrência da espécie não é restrita à Colômbia.

Roberto *et al.* (2021) propuseram o uso de bioinformática para a distinção entre as espécies de *Paracoccidioides*. Através de análise de polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP), foram inspecionados, *in silico*, nove genomas completos de *Paracoccidioides* em busca de pontos de restrição para as enzimas EcoRI e MseI. AFLP são marcadores moleculares baseados na junção de polimorfismos gerados por enzimas de restrição posteriormente amplificados por PCR (OLIVEIRA *et al.*, 2021). Foi produzida uma matriz de 144 perfis *in silico* AFLP. Duas combinações foram escolhidas para análise *in vitro*: EcoRI-AC/MseI-CT e EcoRI-AT/MseI-CT, que revelaram o maior número de marcadores polimórficos para diferir as espécies. Foram gerados, no total, 154 fragmentos amplificados (67

para a primeira combinação e 87 loci para a segunda). O dendograma gerado gerou cinco clados bem suportados. A análise dos marcadores AFLP revelou que 128/165 isolados pertenciam ao complexo *P. brasiliensis*: 79 identificados como *P. brasiliensis sensu stricto*, 22, como *P. americana*, 14, *P. restrepiensis* e 13, *P. venezuelensis*. 37 foram classificados como *P. lutzii*. A classificação foi confirmada por genotipagem TUB1-RFPL. TUB1-RFPL não foi capaz de detectar as cepas pertencentes à *P. venezuelensis*, diferentemente da técnica proposta (confirmado por análises anteriores das cepas utilizadas como referência). Os marcadores detectaram baixo polimorfismo em *P. americana*, *P. restrepiensis* e *P. venezuelensis* e polimorfismo médio em *P. brasiliensis sensu stricto* e *P. lutzii*. Ao avaliar a heterozigosidade esperada, os maiores valores obtidos também foram para essas duas espécies, suportando alta diversidade genética nesses grupos. As demais espécies apresentaram variação discreta, o que está de acordo com uma população predominantemente clonal. A análise de estrutura indicou forte evidência de estrutura populacional, resultando em dois agrupamentos genéticos como o número mais provável de populações distintas: o complexo *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii*. Através de análise de variância molecular, o estudo determinou, para o primeiro marcador, que 66% da variância genética no gênero foi desencadeada pela variabilidade entre populações, enquanto 34% pela variabilidade dentro das populações. Os resultados foram muito próximos para o segundo marcador, que determinou que 65% e 35% da variabilidade foi desencadeada pela variação inter e intrapopulacional, respectivamente.

Ainda antes da promoção das linhagens filogenéticas de *P. brasiliensis* às espécies propriamente ditas, Alves *et al.* (2014) exploraram o uso potencial de transposons como marcadores moleculares para sua diferenciação. Transposons consistem em “genes saltadores” que podem se realocar e introduzir aleatoriamente em diferentes locais do genoma. Foi realizado PCR de 48 isolados e seu resultado comparado aos de outros dois marcadores já utilizados para a mesma finalidade: hsp70 indel e microssatélites. Os transposons Trem A, B, D, F e G foram amplificados apenas em isolados de *P. brasiliensis*. Trem E, por sua vez, estava presente em todos os isolados de *P. lutzii*, sugerindo que a família do marcador surgiu após a separação das outras linhagens. Trem C e H estavam presentes em ambas as espécies, levantando a hipótese de que as famílias já estavam presentes no ancestral em comum a todo o gênero. Foi possível, também, distinguir entre as linhagens filogenéticas: Trem A, B e F foram encontrados em S1 e PS2, enquanto Trem D apenas em S1. Trem C apresentou uma banda adicional de 1.6 kb e TremH uma de 1.5kb nos dois isolados PS3.

Turissini *et al.* (2017) foram os primeiros a propor o reconhecimento taxonômico das três novas espécies dentro do gênero *Paracoccidioides*. Além de abordagem morfológica, utilizaram técnica de PCR convencional para amplificar loci mitocondriais, nucleares codificantes e nucleares não codificantes (microsatélites), cujos resultados foram submetidos a análise de discordância filogenética. Enquanto a análise dos loci nucleares determinou que as espécies do complexo são reciprocamente monofiléticas, S1 (*P. brasiliensis*) e S3 (*P. restrepiensis*) não foram monofiléticas de acordo com o padrão genealógico de DNA mitocondrial. Ainda segundo a filogenia mitocondrial, as espécies PS2 (*P. americana*) e PS4 (*P. venezuelensis*) seriam irmãs, resultado inconsistente com a filogenia nuclear que determinou *P. restrepiensis* e *P. venezuelensis* como espécies irmãs, *P. brasiliensis* como irmã da díade e *P. americana* como o grupo mais recente a divergir entre as espécies do complexo. O estudo levantou, assim, a hipótese de que o agrupamento mitocondrial seja ditado pela geografia, visto que *P. americana* e *P. venezuelensis* se sobrepõem na Venezuela, sugerindo troca gênica entre as duas espécies. Os marcadores mitocondriais sugerem, ainda, que *P. brasiliensis* seja um grupo parafilético às demais espécies. Foi avaliada, então, através de genética populacional, a possibilidade de introgressão mitocondrial. Na ausência de fluxo mitocondrial, devido às maiores taxas de mutação, o DNA mitocondrial deveria ser mais divergente que o nuclear. Além disso, se não houve introgressão, a razão entre a divergência mitocondrial e nuclear deve ser equivalente em todos os pares avaliados, o que não aconteceu: a proporção de divergência mitocondrial/nuclear entre PS3 e PS4 foi cerca de quatro vezes maior que as proporções entre PS2 e S1 e PS2 e PS4. Ainda, considerando que *P. restrepiensis* e *P. venezuelensis* são espécies irmãs, seria esperado que *P. americana* fosse igualmente diferenciada das duas espécies. Entretanto, a nível mitocondrial, a divergência molecular de *P. americana* e *P. restrepiensis* é aproximadamente o dobro da observada entre *P. americana* e *P. venezuelensis*. Os resultados sugerem forte troca gênica de mitocôndrias entre *P. americana* e *P. venezuelensis*. A análise de estrutura permitiu inferir duas populações bem definidas dentro de S1 e agrupou a maioria dos isolados na espécie correta. As exceções foram explicadas por fluxo gênico, polimorfismo ancestral ou convergência de marcadores. Os resultados que sugeriram a introgressão mitocondrial, junto à falta de clareza no agrupamento de alguns isolados levaram ao estudo da possibilidade de fluxo gênico nos loci nucleares. Foram detectadas duas migrações, não recentes, de PS2 para S1. Em síntese, o estudo concluiu que o gênero *Paracoccidioides* é composto por espécies que diferem morfológica e geneticamente e que, embora muitas vezes compartilhem região geográfica e até hospedeiro, tendo, assim, oportunidade de cruzar, o fluxo

gênico é baixo e principalmente restrito às mitocôndrias. Os marcadores nucleares, tanto codificadores quanto microssatélites, são consistentes com um cenário de especiação em que PS3 e PS4 são espécies irmãs intimamente relacionadas à PS1. O evento de troca gênica mais pronunciado ocorreu entre *P. americana* e *P. venezuelensis*, clados irmãos quando do ponto de vista mitocondrial e, possivelmente, resultado de contato e hibridização, considerando que as espécies coexistem na Venezuela. Outros dois eventos de hibridização foram identificados: entre o ancestral PS2/PS4 e isolados S1 e entre S1 e PS3. Sabe-se que o DNA mitocondrial evolui mais rápido que o nuclear, mas as genealogias em *Paracoccidioides* não refletem essa maior divergência esperada. As espécies parecem ter trocado genes em um passado recente, resultando em genótipos mitocondriais homogeneizados. Dada a extensa simpatria entre as espécies de *Paracoccidioides*, a diferenciação genética observada defende a existência de barreiras ao fluxo gênico.

4.2 MARCADORES IMUNOQUÍMICOS

A segunda abordagem mais utilizada para a diferenciação de *Paracoccidioides* spp. foram os métodos sorológicos. Mattos *et al.* (2021), após genotipagem prévia dos isolados, buscaram determinar se a espécie tem influência sobre o perfil de reatividade sorológica através de dupla imunodifusão em gel de ágar. Foram produzidos exoantígenos a partir de cepas de referências das três espécies circulantes no estado do Mato Grosso do Sul: *P. brasiliensis sensu stricto* S1b, denominado Pb_Ag, *P. restrepiensis*, designado Pr_Ag e *P. lutzii*, definido como Pl_Ag. Dos 13 casos de PCM, a genotipagem havia anteriormente identificado nove como causados por *P. brasiliensis sensu stricto*, três como *P. restrepiensis* e um como *P. lutzii*. A imunodifusão foi positiva para 11 dos 13 casos confirmados de PCM: nove positivos quando utilizado Pb_Ag, nove positivos para Pr_Ag e três positivos quando realizada com Pl_Ag. Os antígenos heterólogos de *P. brasiliensis sensu stricto* e *P. restrepiensis* apresentaram alta positividade para ambas as espécies. Resultados semelhantes não foram, entretanto, observados para *P. lutzii*. A reação cruzada sugere que as espécies pertencentes ao complexo *P. brasiliensis* apresentam perfis proteicos similares.

Moreira *et al.* (2020), através de estudo imunoproteômico mais aprofundado, investigaram os antígenos secretados pelas espécies de *Paracoccidioides* spp., a fim de ampliar as alternativas de diagnóstico. Os exoantígenos obtidos dos isolados foram purificados através de digestão trípica e imunoprecipitação e identificados por espectrofotometria de massa. A maior parte das proteínas extracelulares secretadas por *P. americana*, *P. restrepiensis* e *P. lutzii*

foi encontrada na faixa de 45kDa, demonstrando um perfil proteico semelhante. Apesar disso, foi possível verificar que os extratos proteicos produzidos a partir de *Paracoccidioides* spp. apresentam antígenos que induzem a formação de diferentes anticorpos: O perfil antigênico de *P. lutzii* apresentou ampla gama de proteínas entre 105 e 19 kDa. *P. americana*, por sua vez, apresentou antígenos entre 99 e 14 kDa. Antígenos na faixa de 99 a 37 kDa foram obtidos para os isolados de *P. brasiliensis*. Por fim, o perfil antigênico de *P. restrepiensis* variou entre 105 a 21 kDa. Dos 79 exoantígenos encontrados, quatro, quatro, sete e 17 eram exclusivos da espécie *P. lutzii*, *P. americana*, *P. brasiliensis* e *P. restrepiensis*, respectivamente. Ainda, foram identificados, em todas as espécies de *Paracoccidioides* incluídas no estudo, exoantígenos com baixa homologia às espécies *H. capsulatum*, *C. immitis*, *A. fumigatus*, *S. schenckii* e *C. albicans*, cuja possibilidade de reação cruzada é amplamente conhecida. Constituem, portanto, bons candidatos a biomarcadores utilizados para o diagnóstico de PCM.

4.3 MARCADORES MORFOLÓGICOS

Tussini *et al.* (2017) avaliaram três parâmetros morfológicos em isolados do gênero. Foi realizado o cálculo da área de conídios de *P. brasiliensis*, *P. americana* e *P. lutzii*, e da área de leveduras de todas as espécies, através da medida do diâmetro das células. Além disso, foi medido o número de brotamentos formados a partir de uma célula-mãe. A heterogeneidade das três características foi testada para determinar se a comparação entre pares era significativa. Os resultados mostraram que a área média dos conídios pode ser utilizada para diferir entre *P. lutzii* e as outras duas espécies, no entanto, não permite a distinção entre as espécies pertencentes ao complexo *brasiliensis*. A área das leveduras, por sua vez, é uma característica diagnóstica eficaz para a maioria, mas não todas as espécies: Através desse parâmetro, foi possível distinguir entre *P. lutzii* e *P. americana*. Dentro do complexo, a área de levedura difere *P. americana* e *P. brasiliensis sensu stricto* de todas as outras espécies. *P. restrepiensis* difere de *P. americana* e *P. brasiliensis* em tamanho de célula, mas não de *P. restrepiensis*, resultado previsível, visto que se tratam de espécies irmãs. Não foi encontrada variação intraespecífica para o parâmetro. Quanto à avaliação da diferença no número de brotamentos produzidos, *P. venezuelensis* demonstrou um número significativamente menor de células filhas quando comparada a qualquer outra espécie. Diferentemente do tamanho celular, o número de brotamentos permitiu distinguir entre *P. restrepiensis* e *P. venezuelensis*. Os resultados são sugestivos de diferenciação fenotípica. Embora a magnitude dessa diferenciação seja sutil, conclui-se que a combinação de dois parâmetros (área de leveduras e número de brotamentos) possui valor

preditivo na atribuição de espécies: todos os isolados estudados foram atribuídos à espécie correta com um valor de confiança superior a 90% (100%, no que diz respeito à *P. lutzii*), indicando que a combinação das duas características é eficaz para a discriminação das espécies.

5. DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A distinção entre as espécies de *Paracoccidioides* sp. se dá, sobretudo, a nível genômico: é possível identificar, dentro do gênero, cinco espécies bem definidas através de uma série de marcadores moleculares: *Paracoccidioides brasiliensis*, *Paracoccidioides americana*, *Paracoccidioides restrepiensis*, *Paracoccidioides venezuelensis* e *Paracoccidioides lutzii*. Os genes codificadores da gp43, ARF, TUB1 e da região ITS rDNA apresentam altos níveis de confiança para a determinação não apenas de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, como anteriormente defendido, mas também das três espécies pertencentes ao complexo *brasiliensis* recentemente descritas.

Um dos marcos da especiação é o isolamento reprodutivo, ou seja, a existência de barreiras geográficas que impedem o cruzamento entre indivíduos pertencentes a grupos diferentes (TURISSINI *et al*, 2017). Os estudos aqui revisados evidenciaram que espécies de *Paracoccidioides* compartilham regiões geográficas, vivendo em simpatria. Isto é, possuem oportunidade de cruzar, mas não o fazem, corroborando à teoria de especiação. As evidências de introgressão entre as espécies são inexistentes ou ocorrem em uma frequência muito baixa, indicando acúmulo destas barreiras. Há certa evidência de hibridização, entretanto, ela não é sinônimo de sobreposição geográfica: a ocorrência de híbridos é rara em espécies muito diferenciadas. Por fim, todos os estudos inclusos na revisão concluíram que as cinco espécies de *Paracoccidioides* propostas são reciprocamente monofiléticas, ou seja, abrigam o ancestral comum mais recente do grupo e todos os seus descendentes.

Apesar do disposto, tratando-se de uma doença bastante negligenciada e subnotificada, os dados referentes à paracoccidioidomicose e, conseqüentemente, seu agente etiológico, ainda são bastante limitados. Torna-se, portanto, difícil afirmar se os novos achados são unanimemente aceitos entre os pesquisadores da área. Ainda, embora todos os fatores sugiram estágio avançado de especiação para os cinco grupos aqui descritos, é evidente um maior grau de divergência entre as espécies do complexo *brasiliensis* e *P. lutzii*. Apenas um estudo, por exemplo, encontrou diferenças morfológicas que permitissem a distinção entre todas as cinco espécies, fator levado em consideração na definição biológica do termo *espécie*. Apesar da detecção de exoantígenos exclusivos para cada uma das cinco espécies, em suma, os estudos demonstraram que, quanto aos marcadores imunoquímicos, a distinção entre elas ainda é controversa: as espécies pertencentes ao complexo *brasiliensis* possuem perfil proteico bastante similar, estando sujeitas a reações cruzadas. Assim, questiona-se o papel da sorologia, diante da reclassificação taxonômica, no diagnóstico de PCM. Ademais, foi possível inferir, através

da revisão, a variação de parâmetros ecológicos, como hospedeiros animais (sugere-se que o tatu seja predominantemente infectado pelas espécies do complexo *brasiliensis*) e clínicos, como a apresentação de determinados sintomas (hipótese de que *P. americana* possua maior ação sobre as glândulas adrenais), a depender da espécie responsável pela infecção. É necessária, portanto, a condução de estudos direcionados e a partir de uma maior quantidade de amostras, visando elucidar o real impacto da reclassificação taxonômica nas já conhecidas e definidas características do gênero e da micose e seus reflexos em parâmetros ainda não abordados, como prognóstico e terapêutica da doença.

REFERÊNCIAS

ALVES, Fernanda L. *et al.* Transposable elements and two other molecular markers as typing tools for the genus *Paracoccidioides*. **Medical Mycology**, [S.L.], v. 53, n. 2, p. 165-170, 24 dez. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myu074>.

ANDRADE-SILVA, Juliana *et al.* Molecular epidemiology of *Paracoccidioides* spp. recovered from patients with paracoccidioidomycosis in a teaching hospital from Minas Gerais State of Brazil. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 15, n. 11, p. 1-18, 29 nov. 2021. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0009956>.

BAGAGLI, Eduardo *et al.* *Paracoccidioides brasiliensis* Isolated from Nine-Banded Armadillos (*Dasypus novemcinctus*) Reveal Population Structure and Admixture in the Amazon Basin. **Journal Of Fungi**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 54-65, 15 jan. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jof7010054>.

CHAVES, Alison Felipe Alencar *et al.* Updates in *Paracoccidioides* Biology and Genetic Advances in Fungus Manipulation. **Journal Of Fungi**, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 116-144, 4 fev. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jof7020116>.

COCIO, Tiago A. *et al.* Phylogenetic Species of *Paracoccidioides* spp. Isolated from Clinical and Environmental Samples in a Hyperendemic Area of Paracoccidioidomycosis in Southeastern Brazil. **Journal Of Fungi**, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 132-144, 11 ago. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jof6030132>.

CORDOVA, Leopoldo A.; TORRES, Jaime. **Paracoccidioidomycosis**. NCBI Bookshelf. A service of the National Library of Medicine, National Institutes of Health. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Jan. 2021.

GONZALEZ, Angel; HERNANDEZ, Orville. New insights into a complex fungal pathogen: the case of *Paracoccidioides* spp.. **Yeast**, [s. l.], v. 33, n. 4, p. 113-128, 9 fev. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/yea.3147>.

HARRIS, G. Spatafora; KEATH, E. J.; MEDOFF, J.. Characterization of Alpha and Beta Tubulin Genes in the Dimorphic Fungus *Histoplasma capsulatum*. **Microbiology**, [S.L.], v. 135, n. 7, p. 1817-1832, 1 jul. 1989. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-135-7-1817>

HILLIS, David M.; DIXON, Michael T.. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **The Quarterly Review Of Biology**, [S.L.], v. 66, n. 4, p. 411-453, dez. 1991. University of Chicago Press. <http://dx.doi.org/10.1086/417338>.

HRYCYK, Marluce Francisca *et al.* Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*, *P. lutzii* and related species: infection in armadillos, soil occurrence and mycological aspects. **Medical Mycology**, [S.L.], p. 950-962, 6 jan. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myx142>.

KAUFFMAN, Carol A. et al. **Essentials of Clinical Mycology**. 2. ed. Nova Iorque: Springer, 2011. 568 p.

KAVANAGH, Kevin. **Fungi: biology and applications**. 3. ed. Hoboken: Wiley Blackwell, 2018. 422 p.

KEELING, Patrick J. Congruent evidence from α -tubulin and β -tubulin gene phylogenies for a zygomycete origin of microsporidia. **Fungal Genetics And Biology**, [S.L.], v. 38, n. 3, p. 298-309, abr. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1087-1845\(02\)00537-6](http://dx.doi.org/10.1016/s1087-1845(02)00537-6).

MACEDO, Priscila Marques de *et al.* Clinical features and genetic background of the sympatric species *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides americana*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 13, n. 4, p. 1-20, 15 abr. 2019. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0007309>.

MACHADO, Gabriel C. **Comparação entre o processo de virulência em *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii* com utilização de modelo alternativo de bioensaio e knockdown gênico**. 2015. 69 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Ciências

Biológicas (Genética), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Bocatú, 2015.

MARQUES, Sílvio A. Paracoccidioidomycosis. **Clinics In Dermatology**, [S.L.], v. 30, n. 6, p. 610-615, nov. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2012.01.006>.

MARQUES, Sílvio Alencar *et al.* Paracoccidioidomycosis manifested by sarcoidosis-like cutaneous lesions and caused by *Paracoccidioides brasiliensis sensu stricto* (S1a). **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [S.L.], v. 93, n. 6, p. 902-904, dez. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20188293>.

MARTINEZ, Roberto. EPIDEMIOLOGY OF PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 57, n. 19, p. 11-20, set. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0036-46652015000700004>.

MATTOS, Karine *et al.* An update on the occurrence of *Paracoccidioides* species in the Midwest region, Brazil: molecular epidemiology, clinical aspects and serological profile of patients from mato grosso do sul state. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 15, n. 4, p. 1-14, 7 abr. 2021. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0009317>.

MAVENGERE, Heidi *et al.* *Paracoccidioides* Genomes Reflect High Levels of Species Divergence and Little Interspecific Gene Flow. **Mbio**, [S.L.], v. 11, n. 6, p. 1-18, 22 dez. 2020. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mbio.01999-20>.

MENDES, *et al.* Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, p. 224-28, 2017.

MOREIRA, Adriana P. V. Paracoccidioidomicose: histórico, etiologia, epidemiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos. **Boletim Epidemiológico Paulista**, [São Paulo], v.5, n. 51, p. 11-24, mar. 2008.

MOREIRA, André L. E. *et al.* Immunoproteomic Approach of Extracellular Antigens From *Paracoccidioides* Species Reveals Exclusive B-Cell Epitopes. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 10, p. 1-17, 28 jan. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.02968>.

OLIVEIRA, Altacis Junior *et al.* Principais marcadores moleculares. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 10, n. 15, p. 1-7, 26 nov. 2021. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i15.23633>.

OLIVEIRA, Haroldo Cesar de. **Caracterização e identificação de moléculas de superfície presentes em *Paracoccidioides* spp.** 2014. 156 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

OLIVEIRA, Jeferson C. de. **Tópicos em Micologia Médica**. 4. ed. Rio de Janeiro, 2014. 230 p.

RESTREPO, A., GONZALES, A. AGUDELO, C.A. Paracoccidioidomycosis. In: KAUFFMAN, Carol A. *et al.* **Essentials of Clinical Mycology**. 2. ed. Nova Iorque: Springer, 2011. 568 p.

ROBERTO, T.N. *et al.* Exploring genetic diversity, population structure, and phylogeography in *Paracoccidioides* species using AFLP markers. **Studies In Mycology**, [S.L.], v. 100, p. 100131, set. 2021. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute. <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2021.100131>.

ROBERTO, Thiago N. *et al.* Identifying *Paracoccidioides* phylogenetic species by PCR-RFLP of the alpha-tubulin gene. **Medical Mycology**, [S.L.], v. 54, n. 3, p. 240-247, 13 dez. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myv083>.

SAMPAIO, M. I. C., *et al.* 2014. **Boletim Informativo - Biblioteca Dante Moreira Leite**. Biblioteca IPUSP, ano IV, n.2, 7p.

SHIKANAI-YASUDA, Maria Aparecida *et al.* II Consenso Brasileiro em Paracoccidiodomicose – 2017. **Epidemiol. Serv. Saude**, Brasília, 27(núm. esp.):e0500001, 2018.

SHIKANAI-YASUDA, Maria Aparecida *et al.* Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidiodomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [Minas Gerais], v. 50, n. 5, p. 715-740, 12 jul. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0230-2017>.

SHIKANAI-YASUDA, Maria Aparecida. PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS TREATMENT. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [S.L.], v. 57, n. 19, p. 31-37, set. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s003646652015000700007>.

SIDRIM, Jose J. C.; ROCHA, Marcos F. G.. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 2004, 388p.

SILVA, Livia C. *et al.* Overview of Antifungal Drugs against Paracoccidiodomycosis: how do we start, where are we, and where are we going?. **Journal Of Fungi**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 300, 19 nov. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jof6040300>.

SOUZA, Marcela T. de; SILVA, Michelly D. da; CARVALHO, Rachel de. Revisão integrativa: o que é e como fazer. **Einstein**. 2010; 8(1 Pt 1):102-6

TEIXEIRA, Marcus M. *et al.* Genomic diversity of the human pathogen *Paracoccidioides* across the South American continent. **Fungal Genetics And Biology**, [S.L.], v. 140, p. 1-18, jul. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103395>.

TURISSINI, David A. *et al.* Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. **Fungal Genetics And Biology**, [S.L.], v. 106, p. 9-25, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2017.05.007>.

WHITE, T. J. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In. INNIS, M. A. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. Academic Press, San Diego, 1990, p. 315-322.

ZANCOPE-OLIVEIRA, Rosely M. *et al.* Diagnostic Aspects of Paracoccidioidomycosis. **Curr Trop Med Rep.** 1:111, 2014.