



**Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular
Dissertação de Mestrado**

Epidemiologia molecular da paracoccidioidomicose no Paraguai

LUZ ROCIO CHAMORRO CORREA

Brasília

2025



LUZ ROCIO CHAMORRO CORREA

Epidemiologia molecular da paracoccidioidomicose no Paraguai

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, para obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Marcus de Melo Teixeira

Brasília

Março/2025

LUZ ROCIO CHAMORRO CORREA

Epidemiologia molecular da paracoccidioidomicose no Paraguai

Dissertação apresentada à
Universidade de Brasília, como parte
das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Patologia Molecular,
para obtenção do título de Mestre em
Patologia Molecular.

Brasília, 20 de março de 2025

Orientador: Dr. Marcus de Melo Teixeira

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Priscila Marques de Macedo

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI/Fiocruz) – Rio de Janeiro

Prof. Dr. Walter Massa Ramalho

Universidade de Brasília (UnB) - Brasília

Prof. Dr. Marcus de Melo Teixeira (Presidente)

Universidade de Brasília (UnB) - Brasília

Prof. Dr. Ciro Martins Gomes (Suplente)

Universidade de Brasília (UnB) - Brasília

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ce Chamorro Correa, Luz Rocio
Epidemiologia molecular da paracoccidiodomicose no
Paraguai / Luz Rocio Chamorro Correa; orientador Marcus de
Melo Teixeira. Brasília, 2025.
73 p.

Tese (Mestrado em Patologia Molecular) Universidade de
Brasília, 2025.

1. Paracoccidiodomicose. 2. Paraguai. 3. Epidemiologia.
4. Georreferenciamento. 5. Tipagem Genômica. I. de Melo
Teixeira, Marcus , orient. II. Título.

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Microbiologia, Imunologia e Biotecnologia (LabMIB) – Núcleo de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, com apoio financeiro do CNPq, CAPES e FAPDF, em parceria o Centro de especialidades Dermatológicas, San Lorenzo, Paraguai.

Dedico este trabalho à minha família Chamorro Correa & Associados, por sempre serem meus pilares, minha fortaleza e meu apoio incondicional, e também a Felipe, por ser meu porto seguro, minha paz e meu lar longe de casa.

"Persevera con valentía."

Padre José Kentenich

*“Ore avei paraguaietéva
Soldado ja'érõ urunde'ymi
Ndaha'evointe rojalavaséva
Ndoróikotevêi ñererochichĩ!
Kundt ko oimo'ãnte rakã'e ijypýrõ
Ojuhuta ápe piré pererĩ
Há ojepojoka gringo tuja vyro
Nanawa rokẽre ojooso itĩ.”*

Estrofa de 13 Tuyuti, polca paraguaya en guaraní

*“Nós também somos paraguaios
autênticos Soldados duros como o urunde'y
Não somos de querer nos elogiar ou nos gabar
Não precisamos de adulações
Kundt acreditou no início
que aqui encontraria covardes ou fracos
E o gringo velho e tolo quebrou a mão
e deu de cara contra os portões de Nanawa.”*

Estrofe de 13 de Tuyuti, polca paraguaia

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, quero agradecer a Deus e à Virgem Maria, pois em cada passo senti o cuidado e a presença deles. Com certeza, sou uma filha muito amada. Ao longo dessa jornada, preencheram minha vida com anjos e bênçãos.

Aos meus pais, Jorge e Myriam, por me darem o presente mais lindo: a vida, e por me fornecerem todas as ferramentas necessárias, me sustentando e sempre me apoiando na busca e realização dos meus sonhos. A distância nunca foi obstáculo para que me mostrassem seu amor, e em todo momento me transmitiram tranquilidade e confiança para alcançar minhas metas.

Ao meu orientador, Marcus Teixeira, pela confiança depositada em mim para a realização deste projeto, por disponibilizar todos os recursos necessários para o alcance dos objetivos e por compartilhar seu compromisso, entusiasmo e conhecimentos na área de pesquisa.

Ao meu chefe do CED, José Brunelli, por me transmitir sua paixão pelos fungos, e por me apoiar e guiar na realização deste projeto.

Aos meus irmãos, Sofi e Giuli, por ser os melhores irmãos que alguém pode desejar, por acreditarem em mim desde sempre, muito antes de eu começar esta trajetória, e por continuarem a me apoiar com força ao longo de todo esse caminho. Por cuidarem de nossa família enquanto me davam a tranquilidade de me focar nos estudos. E estar pendente de mim, alentando-me sempre.

Ao “mi coracion”, Felipe, que chegou à minha vida tornando-se meu companheiro ideal. Ele assumiu meus objetivos como se fossem seus e sempre esteve atento ao meu bem-estar e felicidade. Esteve mais do que presente, fazendo-me sentir em casa, cuidando de mim e me apoiando com tanto amor, sempre me fazendo sorrir, até nos meus piores dias. Você é o melhor presente-surpresa que esta aventura poderia me oferecer.

Aos meus cunhados, Mija e Tania, por serem tão atenciosos, amorosos e comprometidos comigo quanto são com meus irmãos.

À minha afilhada, Ana Paula, por trazer tanta alegria e amor à nossa família e por ser a razão de eu querer ser a melhor versão de mim mesma.

Ao time Leeme, por serem excelentes colegas. E, de forma muito especial, a Bernardo, João Paulo e Lucas, por não serem apenas profissionais maravilhosos, mas também grandes amigos, que me sustentaram inúmeras vezes, sem nunca me deixarem cair.

À equipe do LabMIB, pela estrutura, conhecimentos e apoio fornecidos.

Aos meus colegas e amigos do CED, Fer, Ami e Meli, por me darem suporte tanto no âmbito profissional quanto no pessoal, por serem grandes amigos e professores além de compartilharem comigo tantas aventuras.

À Paula e ao Renan, que foram meu suporte em tantas ocasiões. Vocês tornaram tudo melhor e mais divertido, além de serem pessoas que sempre me escutaram e se preocuparam comigo. Fizeram dessa experiência ainda mais especial.

À minha família do LBQP, em especial ao José Miguel, Carlos, Duda, Bea e Thiago, que me receberam tão bem, me ajudaram a me adaptar e, além disso, me presentearam com sua preciosa amizade.

À minha companheira da Colina e primeira amiga em Brasília, Mel, você tornou a mudança drástica em minha vida muito mais leve, se preocupando, cuidando e amando como uma irmã.

Aos amigos que fiz fora do laboratório, Priscila e Luan, que, desde o primeiro momento, foram anjos na minha vida. Eles estiveram comigo em cada passo e processo, desde os momentos de festa para aliviar o estresse até a busca por um apartamento. Além disso, sempre me escutaram, me deram forças, mantendo sempre a fé e a alegria na vida.

Aos meus sogros, Eneides e Gerson, pelo amor, apoio e atenção constantes, por me cuidarem como uma filha, por confiarem em mim e por desejarem me ver feliz ao lado do nosso “docinho da casa”.

Ao meu amigo Alex Araújo, que está sempre a um clique de distância, me ouvindo, apoiando e sabendo exatamente o que dizer para me acalmar.

À minha amiga Pachi, por estar sempre incondicionalmente ao meu lado. Mesmo com cada uma de nós envolvida em milhões de coisas, ela sempre me apoiando e atenta a mim.

À minha psicóloga Miri, por me fornecer as ferramentas necessárias para enfrentar cada situação e por me ajudar a aproveitar e confiar no processo.

Todos eles foram uma parte crucial para a realização deste projeto. Aqui, escrevi de forma muito resumida, mas, na verdade, o amor e a gratidão que sinto são imensos. *AGUYJE!*

CHAMORRO, Luz Rocio Correa. **Epidemiologia molecular da paracoccidioidomicose no Paraguai** 2025. 69 págs. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, 2025.

RESUMO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica endêmica na América Latina, com elevada prevalência no Brasil, Argentina, Venezuela e Colômbia. No Paraguai, apesar da proximidade geográfica com essas áreas endêmicas, a PCM no Paraguai é frequentemente negligenciada, com mais de 400 casos registrados, porém com escassas informações sobre sua epidemiologia e diversidade de espécies de *Paracoccidioides*. Este estudo descreve aspectos epidemiológicos e moleculares da PCM no Paraguai entre 2014 e 2024, por meio de uma análise retrospectiva de casos diagnosticados no Centro de Especialidades Dermatológicas (CED) em San Lorenzo. Dados clínicos e epidemiológicos foram obtidos do banco de dados da Seção de Micologia, e o sequenciamento completo do genoma de nove isolados clínicos foi realizado, identificando polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) utilizando o pipeline NASP. Uma árvore filogenética de Máxima Verossimilhança foi construída com o IQ-TREE v2.1.1 para análise das relações evolutivas. Foram confirmados 66 casos de PCM no período, predominando homens com a forma crônica da doença. A maioria dos casos (69,7%) ocorreu em trabalhadores agrícolas, evidenciando alto risco ocupacional. O comprometimento pulmonar e mucoso foi frequente, principalmente em homens de 40 a 60 anos, com apenas dois casos em mulheres. A análise de densidade de Kernel revelou alta concentração de casos no Litoral Central e Chaco Úmido, corroborada pela modelagem de nicho ecológico, que indicou maior probabilidade de ocorrência na Região Oriental, especialmente em *San Pedro* e *Caaguazú*. A caracterização genômica revelou a predominância de *Paracoccidioides brasiliensis* S1B no Paraguai, além da primeira detecção de *P. brasiliensis* S1A e de um isolado com perfil genético misto S1A/S1B, indicando uma diversidade genética até então não documentada no país. Um Este estudo fornece a primeira caracterização epidemiológica e molecular abrangente da PCM no Paraguai, evidenciando a predominância de casos crônicos, o risco ocupacional em trabalhadores rurais e uma diversidade genética previamente não documentada.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose, Paraguai, Epidemiologia, Georreferenciamento, Tipagem Genômica.

CHAMORRO, Luz Rocio Correa. **Molecular epidemiology of paracoccidioidomycosis in Paraguay.** 2025. 69 pages. Thesis (Msc. in Molecular Pathology) – University of Brasília, Brasília, 2025.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis endemic to Latin America, with a high prevalence in Brazil, Argentina, Venezuela, and Colombia. In Paraguay, despite its geographical proximity to these endemic areas, PCM is often neglected, with more than 400 recorded cases but scarce information regarding its epidemiology and the diversity of *Paracoccidioides* species. This study describes the epidemiological and molecular aspects of PCM in Paraguay between 2014 and 2024 through a retrospective analysis of diagnosed cases at the Centro de Especialidades Dermatológicas (CED) in San Lorenzo. Clinical and epidemiological data were obtained from the Mycology Section database, and whole-genome sequencing of nine clinical isolates was performed, identifying single nucleotide polymorphisms (SNPs) using the NASP pipeline. A Maximum Likelihood phylogenetic tree was constructed with IQ-TREE v2.1.1 to analyze evolutionary relationships. A total of 66 PCM cases were confirmed during the period, predominantly in men with the chronic form of the disease. Most cases (69.7%) occurred in agricultural workers, highlighting a high occupational risk. Pulmonary and mucosal involvement was frequent, mainly in men aged 40 to 60 years, with only two cases occurring in women. Kernel density analysis revealed a high concentration of cases in the Central Littoral and Humid Chaco, which was corroborated by ecological niche modeling, indicating a higher probability of occurrence in the Eastern Region, particularly in San Pedro and Caaguazú. The genomic characterization revealed the predominance of *Paracoccidioides brasiliensis* S1B in Paraguay, as well as the first detection of *P. brasiliensis* S1A and a strain with a mixed S1A/S1B genetic profile, indicating a previously undocumented genetic diversity in the country. This study provides the first comprehensive epidemiological and molecular characterization of PCM in Paraguay, highlighting the predominance of chronic cases, the occupational risk for rural workers, and a previously undocumented genetic diversity.

Key-words: Paracoccidioidomycosis, Paraguay, Epidemiology, Georeferencing, Genome Typing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Regiões endêmicas da paracoccidioidomicose (PCM).	3
Figura 2. Distribuição global estimativa de casos paracoccidioidomicose (PCM).	4
Figura 3. Exposição a propágulos de <i>Paracoccidioides</i> spp. e transição para a forma patogênica.	6
Figura 4. Morfologia macroscópica e microscópica da fase leveduriforme de <i>Paracoccidioides</i> spp.: (A) Aspecto macroscópico observado em meio BHI a 37°C, destacando as colônias cerebriformes características do fungo; (B) Aspecto microscópico, observado em lâmina com coloração de azul de lactofenol, evidenciando células esféricas com múltiplos brotamentos, típicas do fungo.	7
Figura 5. Distribuição geográfica das espécies do gênero <i>Paracoccidioides</i> spp. e seus respectivos hospedeiros.	9
Figura 6. Microscopia com NaOH observando as células com multibrotamentos.	12
Figura 7. Histórico da paracoccidioidomicose (PCM) e casos no Paraguai.	21
Figura 8. Mapa do Paraguai: Divisão político-administrativa.	22
Figura 9. Mapa do Paraguai, regiões naturais.	23
Figura 10. Fluxograma do processo de trabalho.	28
Figura 11. Mosaico de imagens representativas obtidas por microscopia para cada isolado fúngico analisado.	34
Figura 12. Número de casos de paracoccidioidomicose (PCM) por ano e sexo biológico no CED (2014–2024).	36
Figura 13. Perfil ocupacional dos pacientes dos pacientes com paracoccidioidomicose atendidos entre 2014 e 2024, no CED.	37
Figura 14. Distribuição geográfica dos casos de paracoccidioidomicose (PCM) por estado no Paraguai.	39
Figura 15. Mapa de prevalência da paracoccidioidomicose (PCM) no Paraguai.	40
Figura 16. O mapa ilustra a distribuição espacial dos casos de paracoccidioidomicose (PCM) no Paraguai, utilizando a técnica de Estimativa de Densidade de Kernel (KDE).	41
Figura 17. Modelagem de nicho ecológico para paracoccidioidomicose (PCM) no Paraguai (2004–2024) Utilizando Random Forest Modeling.	42
Figura 18. Árvore filogenética de nove isolados de <i>Paracoccidioides</i> do Paraguai.	44
Figura 19. Análise de componentes principais (PCA) da distribuição dos genótipos S1A, S1B e S1A/S1B.	45
Figura 20. Análise da estrutura populacional dos genomas de <i>Paracoccidioides</i> spp. utilizando o software FASTSTRUCTURE.	46
Figura 21. Distribuição geográfica por distrito dos casos de paracoccidioidomicose (PCM) e dos isolados genotipados no Paraguai.	48
Figura 22. Variação das áreas das células leveduriformes em genótipos de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .	49

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1. Medicamentos e doses recomendadas para o tratamento da paracoccidioidomicose (PCM).</i>	<i>18</i>
<i>Tabela 2. Dados sociodemográficos dos casos de paracoccidioidomicose (n=66), diagnosticados no CED de 2014 a 2024.</i>	<i>38</i>
<i>Tabela 3. Quantificação e pureza do DNA extraído de isolados de Paracoccidioides por qPCR e Espectrofotometria.</i>	<i>43</i>

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aBayes: Transformação Bayesiana (*Bayesian Transformation*)
ABCD: Anfotericina B em Dispersão Coloidal
ABLC: Complexo Lipídico de Anfotericina B
ADN: Ácido Desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)
aLRT: Teste de Razão de Verossimilhança Aproximada (*Approximate Likelihood Ratio Test*)
AmB: Anfotericina B
AUC: Área sob a curva (*Area under the curve*)
BHI: Infusão Cérebro-Coração (*Brain Heart Infusion*)
BIC: Critério de Informação Bayesiano do (*Bayesian Information Criterion*)
BSL2: Nível de Biossegurança 2 (*Biosafety Level 2*)
CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CED: Centro de Especialidades Dermatológicas
CIE: Contraímunoelctroforese (*Counterimmunoelectrophoresis*)
CT: Ciclo Limiar (*Threshold Cycle*)
DTN: Doença Tropical Negligenciada (*Neglected Tropical Disease*)
ELISA: Imunoensaios Baseados em Enzimas (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)
ENO: Enolase
FAPDF: Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal
FBA: Frutose-bifosfato aldolase
GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GMS: Prata Gomori-Grocot (*Gomori-Grocott Methenamine Silver stain*)
gp43: Glicoproteína de 43 kDa (*43 kDa glycoprotein*)
gp70: Glicoproteína de 70 kD (*70 kDa glycoprotein*)
GPY: Glicose-Peptona-Extrato de Levedura
HE: Hematoxilina-Eosina (*Hematoxylin-Eosin*)
HNI: *Hospital Nacional de Itauguá*
HSPs: Proteínas de Choque Térmico (*Heat Shock Proteins*)
IDD: Imunodifusão Dupla (*Double Immunodiffusion*)
IMT: Instituto de Medicina Tropical
INCAN: Instituto Nacional do Câncer
INERAM: Instituto Nacional de Doenças Respiratórias e do Meio Ambiente Juan Max Boettner
INI/Fiocruz: Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz
IPS: Instituto de Previsão Social
ITS: Regiões espaçadoras internas transcritas (*Internal Transcribed Spacer*)
KDE: Estimativa de densidade Kernel (*Kernel Density Estimation*)
KOH: Hidróxido de potássio
LA: Aglutinação do látex (*Latex Agglutination*)
LAMP: amplificação isotérmica mediada por alça (*Loop-Mediated Isothermal Amplification*)
LCSP: Laboratório Central de Saúde Pública do Paraguai
MADES: Ministério do Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável
MaxEnt: Máxima Entropia (*Maximum Entropy*)
MNE: Modelagem de Nicho Ecológico
MPI: versão multiencadeada (*multi-threaded*)
NaOH: Hidróxido de sódio
NASP: Pipeline de SNP da Northern Arizona (*Northern Arizona SNP Pipeline*)

NGS: Sequenciamento de Nova Geração (*Next-Generation Sequencing*)
NO: Óxido nítrico
OMS: Organização Mundial de Saúde
OPS: Organização Pan-Americana da Saúde
PAAF: Punção aspirativa por agulha fina
PAMP: Padrões moleculares associados a patógenos
PAS: Ácido Periódico de Schiff (*Periodic Acid-Schiff*)
pb: Pares de base
PC1: Primeiro componente principal (*First Principal Component*)
PC2: Segundo componente principal (*Second Principal Component*)
PCA: Análise de Coordenadas Principais (*Principal Coordinate Analysis*)
PCM: Paracoccidioidomicose
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
PCR-RFLP: Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de Restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)
PIB: Produto Interno Bruto
PP-PCM: Forma pulmonar primária da Paracoccidioidomicose
qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*)
RPM: Rotações por Minuto (*Revolutions Per Minute*)
SAB: Sabouraud
SCC: Ágar Sabouraud com Cloranfenicol e Cicloheximida (*Sabouraud Chloramphenicol Cycloheximide*).
SENEPA: Serviço Nacional de Erradicação da Malária
SH-aLRT: Teste de Razão de Verossimilhança Aproximada *Shimodaira-Hasegawa* (*Shimodaira-Hasegawa approximate likelihood ratio test*)
SNPs: Polimorfismos de Nucleotídeo Único (*Single Nucleotide Polymorphisms*)
SOD: Superóxido Dismutase (*Superoxide Dismutase*)
Ta1: Células T auxiliares do tipo 1 (*T-helper 1 Cells*)
Ta17: Células T auxiliares do tipo 17 (*T-helper 17 Cells*)
Ta2: Células T auxiliar do tipo 2 (*T-helper 2 Cells*)
Ta9: Células T auxiliar do tipo 9 (*T-helper 9 Cells*)
TMP-SMX: Sulfametoxazol-Trimetoprima
TPI: Triose-fosfato isomerase (*Triose-phosphate isomerase*)
UFBoot: *Bootstrap* Ultrarrápida (*UltraFast Bootstrap*)
UnB: Universidade de Brasília
WGS: Sequenciamento do Genoma Completo (*Whole-Genome Sequencing*)

SUMÁRIO

Resumo.....	VIII
Abstract	IX
Lista de Figuras	X
Lista de Tabelas	XI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XII
Sumário	XIV
1. Introdução.....	1
1.1 Micoses endêmicas na América Latina e paracoccidioidomicose	1
1.2 Epidemiologia.....	3
1.3 Ciclo de vida e transmissão de <i>Paracoccidioides</i> spp.....	5
1.4 Taxonomia	7
1.5 Aspectos clínicos	9
1.6 Diagnóstico	11
1.6.1 Exame microscópico direto e cultivo	11
1.6.2 Exame Citopatológico e histopatológico	13
1.6.3 Testes Sorológicos.....	13
1.6.4 Testes Moleculares	15
1.7 Tratamento.....	16
1.8 Resposta Imune e fatores de virulência	18
1.9 Paracoccidioidomicoses no Paraguai.....	20
1.10 Epidemiologia molecular	23
2. Justificativa.....	26
3. Objetivos.....	27
3.1 Objetivo geral.....	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
4. Materiais e Métodos.....	27
4.1 Aspectos éticos.....	27
4.2 Coleta de dados clínicos e sociodemográficos de pacientes com paracoccidioidomicose no CED.....	28
4.3 Georreferenciamento.....	29
4.4 Recuperação dos isolados clínicos de <i>Paracoccidioides</i> sp. da micoteca do CED 30	
4.5 Extração de DNA dos isolados clínicos de <i>Paracoccidioides</i> spp.....	30

4.6	Sequenciamento genômico e genotipagem dos isolados clínicos de <i>Paracoccidioides</i> spp.	31
4.7	Comparação das áreas das células	33
4.8	Modelamento de nicho ecológico de <i>Paracoccidioides</i>	34
5.	Resultados	35
5.1	Estudo retrospectivo da paracoccidioidomicose no CED	35
5.2	Georreferenciamento.....	38
5.3	Recuperação de isolados clínicos, sequenciamento genômico, análises genéticas: árvore filogenética, PCA e <i>fast structure</i>	42
5.4	Comparação da área de células leveduriformes	48
6.	DISCUSSÃO	49
7.	CONCLUSÕES	59
8.	PERSPECTIVAS	60
9.	Referências BIBLIOGRÁFICAS	60

1. INTRODUÇÃO

1.1 Micoses endêmicas na América Latina e paracoccidioidomicose

As micoses endêmicas são infecções causadas por fungos dimórficos térmicos, capazes de provocar tanto doenças primárias quanto infecções oportunistas (LOCKHART et al., 2021; QUEIROZ-TELLES et al., 2017). Essas infecções ocorrem em regiões geográficas específicas, influenciadas por fatores ambientais como o clima, a vegetação e as características do solo (ASHRAF et al., 2020; DE ALMEIDA et al., 2018). Na América Latina, a rica diversidade ecológica favorece o crescimento de uma ampla variedade de fungos patogênicos, incluindo as espécies pertencentes a gêneros como *Coccidioides*, *Histoplasma*, *Paracoccidioides* e *Sporothrix* (ALVES; BORGES; ALMEIDA, 2024; ASHRAF et al., 2020; FALCI; PASQUALOTTO, 2019; QUEIROZ-TELLES et al., 2017), responsáveis pelas principais micoses endêmicas da região: coccidioidomicose, histoplasmose, paracoccidioidomicose (PCM) e esporotricose, respectivamente (THOMPSON; PASQUALOTTO, 2021).

Essas infecções constituem um grave problema de saúde pública na América Latina, devido à sua elevada capacidade de provocar incapacitações físicas, além de estarem associadas a um risco significativo de morte prematura, especialmente em casos não diagnosticados e/ou tratados de forma inadequada (LOCKHART et al., 2021). A predominância de atividades rurais na região aumenta a exposição a habitats fúngicos e o risco de infecção, onde a exposição aos fungos ocorre predominantemente por inalação de estruturas fúngicas infecciosas presentes no solo ou pela inoculação através de traumas cutâneos (COLOMBO et al., 2011).

Além disso, as doenças fúngicas com porta de entrada pulmonar frequentemente apresentam sintomas semelhantes aos de outras patologias, como infecções bacterianas ou virais, retardando o diagnóstico e o tratamento adequado. Em muitos casos, micoses só são consideradas como possibilidades de diagnóstico após falha no tratamento empírico para pneumonias adquiridas na comunidade (PAC) como tuberculose e infecções virais (PASQUALOTTO, 2024; SALZER et al., 2018). A ausência de notificação obrigatória dessas infecções fúngicas contribui para a subestimação de sua real prevalência, dificultando a implementação de políticas públicas eficazes para o seu controle (MILLINGTON et al., 2018).

As micoses sistêmicas, de modo geral, afetam primariamente o sistema respiratório, mas, podem disseminar-se para outros órgãos em casos mais graves, especialmente em indivíduos com o sistema imunológico comprometido (TIRADO-SÁNCHEZ; GONZÁLEZ; BONIFAZ, 2020). Entretanto, a real prevalência dessas infecções é frequentemente

subestimada, já que não são doenças de notificação obrigatória e os dados epidemiológicos disponíveis muitas vezes se baseiam em estudos isolados ou relatos de casos (MILLINGTON et al., 2018).

Dentre as micoses endêmicas, a PCM se destaca como a micose sistêmica de maior importância na América Latina, sendo endêmica principalmente no Brasil, Venezuela, Colômbia e Argentina (COLOMBO et al., 2011) (Figura 1). Recentemente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu a PCM como uma doença tropical negligenciada (DTN) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). Essa inclusão revela o impacto acentuado sobre populações socialmente e economicamente vulneráveis, que têm menos acesso a diagnóstico e tratamento adequados. Também evidencia a escassez de investimentos em novas abordagens diagnósticas e terapêuticas (ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2014). O impacto socioeconômico da PCM é significativo, pois acomete principalmente adultos em idade ativa de trabalho. Seu alto potencial incapacitante representa um grande desafio para a saúde pública, afetando a qualidade de vida dos pacientes e aumentando a pressão sobre o sistema de saúde (FALCÃO et al., 2024; MARTINEZ, 2015).

A PCM é causada por espécies de fungos pertencentes ao gênero *Paracoccidioides*. Foi descrita pela primeira vez em 1908 pelo médico Adolfo Lutz, que relatou em uma micose grave associada a lesões ulceradas na boca e comprometimento ganglionar, identificando um fungo distinto de *Coccidioides immitis*. Observando semelhanças morfológicas com outras micoses descritas na América do Sul, classificou a doença no grupo das "hifoblastomicoses americanas" (LUTZ; 1908). Posteriormente, em 1912, Splendore aprofundou os estudos sobre a morfologia do fungo e propôs a denominação *Zymonema brasiliensis* (LACAZ, et al., 1982). Já em 1930, Almeida identificou o agente etiológico como *Paracoccidioides brasiliensis*, frequentemente confundida com *C. immitis*, confirmando as diferenças entre a PCM e a coccidioidomicose nos Estados Unidos (ALMEIDA, 1930).

Com a identificação de casos isolados da doença em outros países da América do Sul, a PCM passou a ser conhecida por diferentes denominações, como blastomicose sul-americana, doença de Lutz e doença de Lutz-Splendore-Almeida (ALMEIDA, 1930). No entanto, o termo paracoccidioidomicose foi oficialmente estabelecido em 1971, durante uma reunião de micologistas em Medellín, Colômbia, sendo amplamente aceito desde então (LACAZ et al., 2002).

Apesar dos avanços no diagnóstico e tratamento, a PCM continua sendo um desafio para a saúde pública na América Latina, sendo necessário um maior investimento em estratégias de vigilância epidemiológica, diagnóstico precoce e tratamento adequado para reduzir sua morbidade e mortalidade (MARTINEZ, 2017).

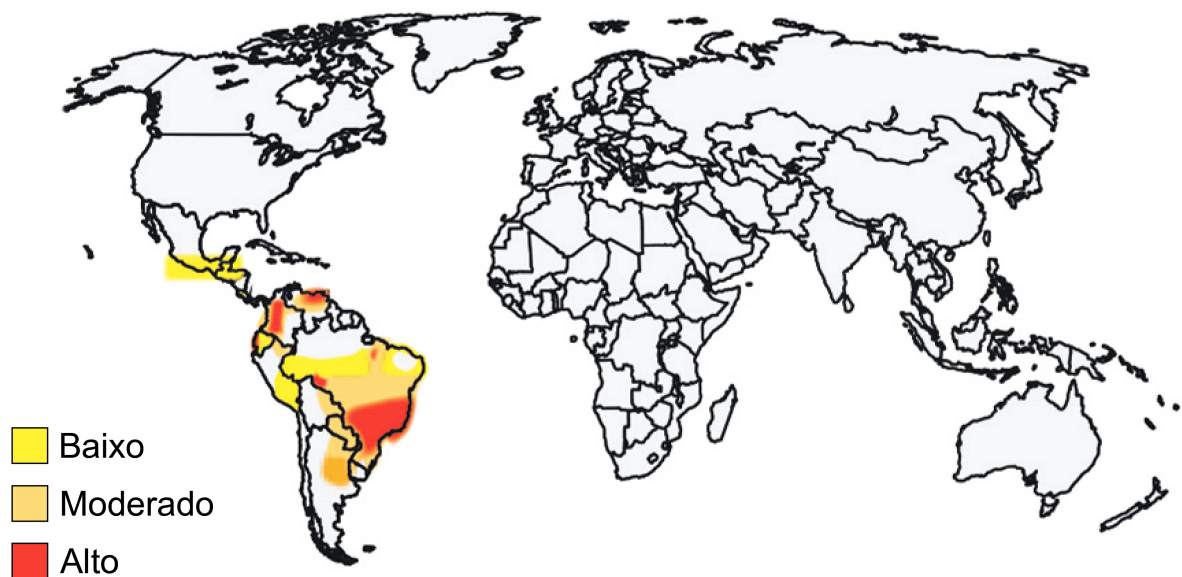


Figura 1. Regiões endêmicas da paracoccidioidomicose (PCM).

Fonte: Adaptado de Thompson et al., 2021.

1.2 Epidemiologia

A PCM é uma micose endêmica restrita ao continente americano, com distribuição geográfica que se estende desde o sul do México, na América do Norte, atravessando a América Central e alcançando a América do Sul, até o norte da Argentina e o Uruguai. A maioria dos casos diagnosticados fora da América Latina ocorre em pacientes com histórico de viagens a áreas endêmicas (ASHRAF et al., 2020).

São reconhecidas áreas de alta, média e baixa endemicidade, entre os países com maior número de casos, observa-se uma alta endemicidade da PCM na Brasil Venezuela, Colômbia e Argentina (MARTINEZ, 2017). O Brasil concentra aproximadamente 80% dos casos, enquanto os demais países sul-americanos, como Colômbia, Venezuela e Argentina, apresentam uma menor proporção (PRADO et al., 2009). Pesquisas evidenciam que a PCM é a principal causa de morte entre as micoses sistêmicas no Brasil (DAMASCENO et al., 2021; PRADO et al.,

2009), figurando também entre as dez principais causas de óbito por doenças infecciosas e parasitárias, crônicas e recorrentes no país, segundo o Ministério da Saúde (COUTINHO et al., 2002).

Assim como ocorre com outras micoses endêmicas, a PCM é comumente relatada em regiões de floresta tropical ou subtropical, caracterizadas com solo ácido (particularmente em áreas de cultivo de café, algodão e tabaco), altitude média, vegetação abundante, média de temperatura entre 17 e 28°C, precipitação anual média entre 1100 e 2500 mm e alta umidade relativa do ar (CAVALLO et al., 2002; LONDERO et al., 1972; RESTREPO; MCEWEN; CASTAÑEDA, 2001). Essas características geográficas e climáticas são frequentemente observadas em ambientes rurais, onde favorecem a ocorrência de *Paracoccidioides* spp. no solo latino-americano. Nessas regiões, a doença afeta principalmente trabalhadores rurais com acesso limitado à informação e aos serviços de saúde, incluindo diagnóstico e tratamento (GÓES et al., 2014).

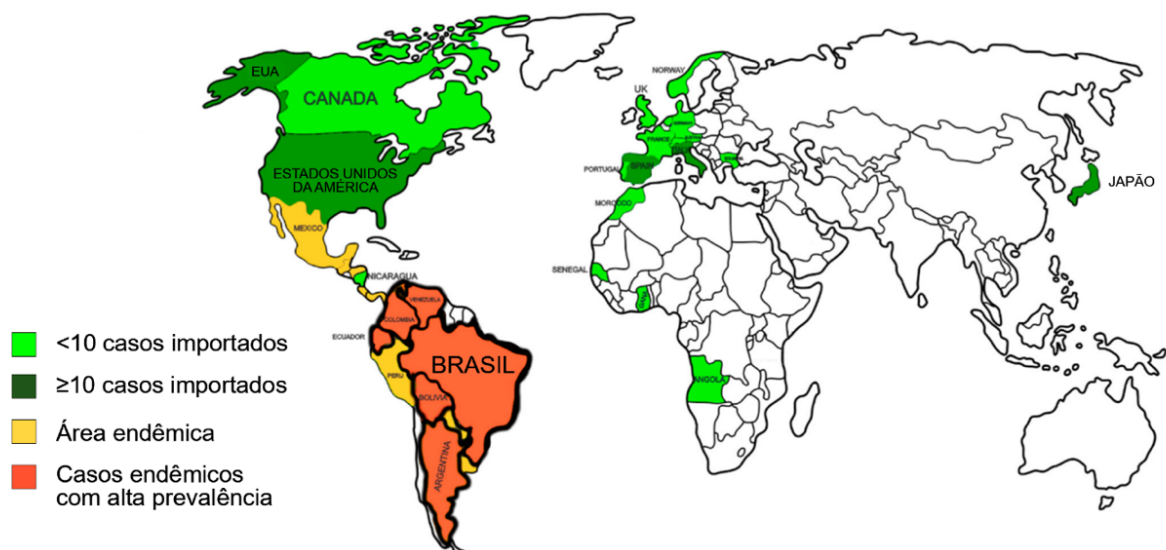


Figura 2. Distribuição global estimativa de casos paracoccidioidomicose (PCM).

Fonte: Adaptado de Pecanha et al. (2022).

Além das áreas endêmicas, casos importados de PCM causados por *Paracoccidioides* spp. já foram relatados na América do Norte, África, Europa e Ásia. Os pacientes afetados são, principalmente, viajantes e imigrantes de locais endêmicos (AJELLO; POLONELLI, 1985; KAMEI et al., 2003; PASQUALOTTO, 2024; PEÇANHA et al., 2022; SOUSA et al., 2022; WAGNER et al., 2021). No entanto, os sintomas podem levar anos ou até décadas para se

manifestarem, frequentemente quando o paciente já está vivendo em áreas urbanas ou em outros países fora das regiões endêmicas (PALHETA-NETO et al., 2003).

Quanto aos indivíduos afetados, a literatura evidencia uma predominância de casos em indivíduos do sexo masculino, com faixa etária entre 30 e 60 anos (DE MATOS et al., 2012; FRANCISCO COUTINHO et al., 2002b; PANIAGO et al., 2003; VIEIRA et al., 2014). Mulheres, crianças e idosos representam uma minoria dos casos, embora possa haver um viés de subdiagnóstico nesses grupos (ROMANELI et al., 2019). Como mencionado anteriormente, trabalhadores rurais compõem o grupo de risco para esta doença, considerando a constante exposição ao solo contaminado com partículas fúngicas de *Paracoccidioides* spp. (CHAVES et al., 2021; PALHETA-NETO et al., 2003).

1.3 Ciclo de vida e transmissão de *Paracoccidioides* spp.

O nicho ecológico específico de *Paracoccidioides* spp. ainda é pouco conhecido devido à raridade de seu isolamento em amostras ambientais, o que dificulta a identificação precisa de sua localização e das características do micronicho (ARANTES et al., 2016; FRANCO et al., 2000). No entanto, acredita-se que esse fungo prolifere naturalmente em solos com condições bióticas e abióticas favoráveis ao seu desenvolvimento (RESTREPO et al., 2000; RESTREPO; MCEWEN; CASTAÑEDA, 2001). Na natureza, *Paracoccidioides* spp. está presente predominantemente na forma miceliana e saprofítica, produzindo propágulos infectantes (LACAZ, 2018).

O fungo pode ser encontrado em solos com altos teores de matéria orgânica, umidade e temperatura moderadas, características comumente observadas em regiões rurais. Atividades humanas que perturbam o solo, como práticas agrícolas, desmatamento e escavações, favorecem a dispersão dos propágulos fúngicos em aerossol, aumentando o risco de inalação e infecção (BOCCA et al., 2013). Os tatus desempenham um papel relevante na ecologia do fungo, pois suas atividades de escavação expõem esporos presentes no solo, facilitando sua dispersão pelo ar (SILVA VERGARA; MARTINEZ, 1998). Além disso, há uma coincidência geográfica entre as áreas de ocorrência dos tatus e as regiões com maior prevalência da doença em humanos, sugerindo uma interação ecológica entre esses mamíferos, o fungo e a transmissão ambiental (MARTINEZ, 2015; RESTREPO-MORENO, 2018).

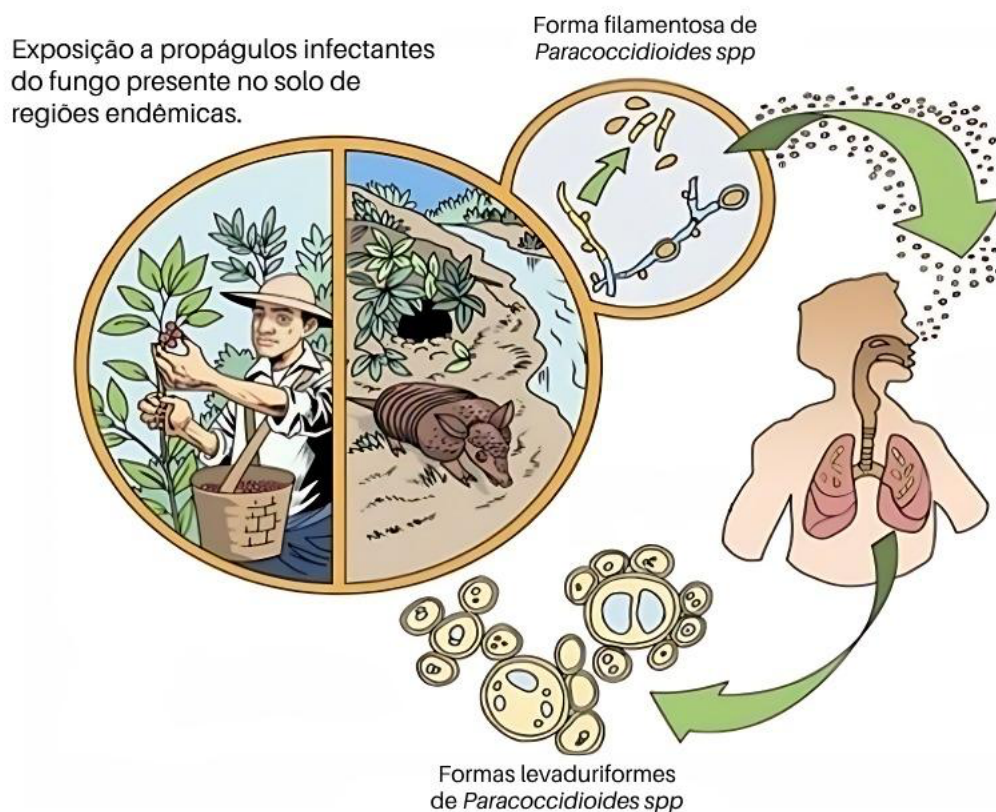


Figura 3. Exposição a propágulos de *Paracoccidioides* spp. e transição para a forma patogênica.

Fonte: Adaptado de Araujo *et al.* (2023).

O ciclo de vida de *Paracoccidioides* spp. envolve a transição entre duas fases morfológicas distintas. Na fase micelial, predominante no ambiente, o fungo apresenta morfologia filamentosa, formando colônias cotonosas e brancas (BONIFAZ TRUJILLO, 2012). Microscopicamente, apresenta hifas finas, hialinas, septadas e ramificadas, que podem se fragmentar em artroconídios, considerados os principais propágulos infecciosos (SIL; ANDRIANOPOULOS, 2015). A transição dimórfica ocorre após a inalação dos propágulos, que se instalam nos alvéolos pulmonares de hospedeiros mamíferos, onde sofrem conversão para a fase leveduriforme devido à temperatura corporal elevada ($\sim 37^{\circ}\text{C}$) e a alterações metabólicas (NUNES *et al.*, 2005).

Essa transição é essencial para a patogenicidade do fungo, permitindo sua sobrevivência no hospedeiro e sua disseminação pelo organismo infectado (STURME *et al.*, 2011). Na fase leveduriforme, observada em hospedeiros mamíferos, o fungo apresenta colônias cremosas, de coloração bege, com aspecto cerebriforme e verso incolor (Figura 4, A) (SIQUEIRA *et al.*, 2016). Microscopicamente, as células são arredondadas, parede celular espessa e refringente, diâmetro variando entre 10 e 40 μm , e podem apresentar múltiplos brotamentos de 2 a 6 μm ,

formando estruturas conhecidas como "timão de navio" ou, quando com apenas dois brotos, a figura do "Mickey Mouse" (Figura 4, B) (PEÇANHA-PIETROBOM et al., 2023).

A patogenicidade de *Paracoccidioides* spp. é regulada por diversos fatores moleculares (MALDONADO LIRA, 2001). Esses mecanismos são essenciais para a adaptação do fungo ao ambiente intracelular e sua disseminação sistêmica. O conhecimento sobre o ciclo de vida e transmissão de *Paracoccidioides* spp. é essencial para a compreensão da epidemiologia da PCM. Embora o nicho ambiental do fungo ainda não esteja completamente elucidado, a transição dimórfica e fatores como interação com animais e perturbação do solo desempenham um papel crucial na sua dispersão e transmissão (CHAVES et al., 2021).

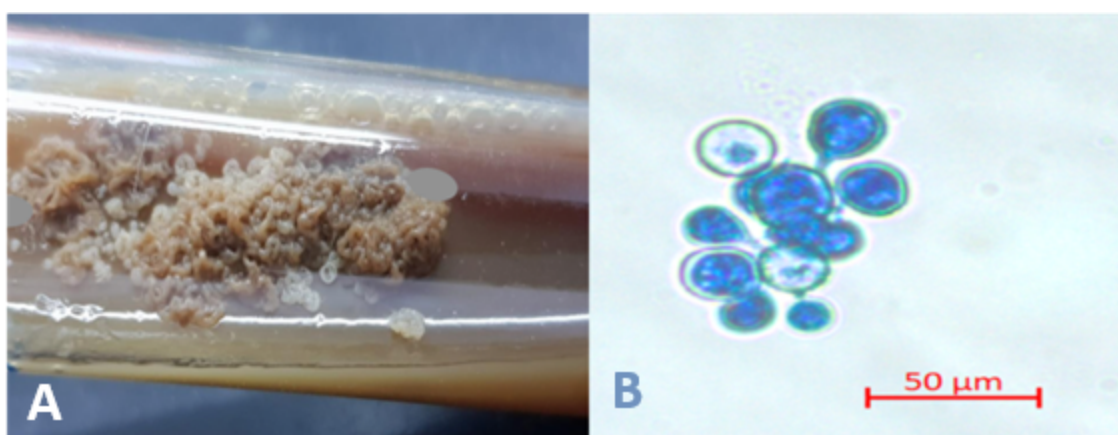


Figura 4. Morfologia macroscópica e microscópica da fase leveduriforme de *Paracoccidioides* spp.: (A) Aspecto macroscópico observado em meio BHI a 37°C, destacando as colônias cerebriformes características do fungo; (B) Aspecto microscópico, observado em lâmina com coloração de azul de lactofenol, evidenciando células esféricas com múltiplos brotamentos, típicas do fungo.

Fonte: o autor.

1.4 Taxonomia

Desde sua identificação até 2006, o gênero *Paracoccidioides* era considerado como uma única espécie, *P. brasiliensis*, reconhecida como o único agente etiológico da PCM (Restrepo et al., 2019). No entanto, avanços na genética molecular, aliados ao desenvolvimento de tecnologias de sequenciamento que evoluíram rapidamente nos últimos anos, permitiram redefinir essa classificação. Matute e colaboradores identificaram, em 2006, por meio de análise de sequência de multi-locus, as espécies filogenéticas S1, PS2 e PS3 dentro do complexo *P. brasiliensis* (MATUTE et al., 2006). Posteriormente, foi possível a identificação de um quarto grupo genético, chamado de PS4, composto por isolados clínicos originários da Venezuela (SALGADO-SALAZAR et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2014; THEODORO et al., 2012).

Em 2008, diversos estudos identificaram diferenças genéticas em um isolado de *P. brasiliensis* proveniente do estado de Goiás (Pb01), levando à proposição de uma nova variante genética dentro do complexo, denominada "Pb01-like". Posteriormente, essa variante foi reclassificada como uma nova espécie, *Paracoccidioides lutzii*, e reconhecida como distinta do complexo *P. brasiliensis*. (CARRERO et al., 2008; DE MELO TEIXEIRA et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2009; THEODORO; BAGAGLI; OLIVEIRA, 2008).

Em 2017, Turissini e colaboradores propuseram elevar as quatro espécies filogenéticas do complexo *P. brasiliensis* ao status de espécies formais. Dessa forma, foram estabelecidas as seguintes denominações: *P. brasiliensis sensu stricto* para S1, *P. americana* para PS2, *P. restrepiensis* para PS3 e *P. venezuelensis* para PS4 (TURISSINI et al., 2017). Atualmente, a filogenia do gênero *Paracoccidioides* indica que este é composto por sete espécies distintas (FERNANDEZ et al., 2024).

Entre as espécies cultiváveis, que causam predominantemente doenças pulmonares, estão: *P. brasiliensis sensu stricto* (composta por S1A e S1B), *P. americana* (PS2), *P. restrepiensis* (PS3), *P. venezuelensis* (PS4), e *P. lutzii* (MAVENGERE et al., 2020; TEIXEIRA et al., 2020, 2014). Por outro lado, duas espécies de *Paracoccidioides* não cultiváveis, associadas predominantemente a manifestações cutâneas, foram recentemente incorporadas ao gênero. A primeira, *Paracoccidioides lobogeorgii* (anteriormente *Lacazia loboi*), é o agente etiológico da lobomicose, também conhecida como doença de Jorge Lobo, uma infecção de caráter cutâneo e subcutâneo. A segunda, *Paracoccidioides ceti*, corresponde a uma linhagem que causa infecção em golfinhos (VILELA et al., 2016, 2021; VILELA; MENDOZA, 2018).

Quanto à distribuição geográfica das espécies mencionadas, a espécie filogenética *P. brasiliensis* é encontrada predominante na América do Sul, especialmente no sudeste do Brasil e Argentina (GIUSIANO et al., 2018; TEIXEIRA et al., 2020). Casos de *P. americana* só foram relatados na Venezuela e no Brasil, *P. restrepiensis* é endêmica na Colômbia, *P. venezuelensis* é endêmica e exclusiva na Venezuela, enquanto *P. lutzii* é distribuída principalmente no centro-oeste do Brasil (COCIO et al., 2020; MUÑOZ et al., 2016a; PINHEIRO et al., 2020; TEIXEIRA et al., 2009). Em relação às duas novas espécies, propõe-se que a distribuição de *P. lobogeorgii* inclua vários países da América Latina (México, Argentina, Brasil) mas com maior prevalência nas regiões da floresta amazônica. A distribuição de *P. ceti* também abrange vários países da América Latina e se espalha infectando golfinhos (VILELA et al., 2021).

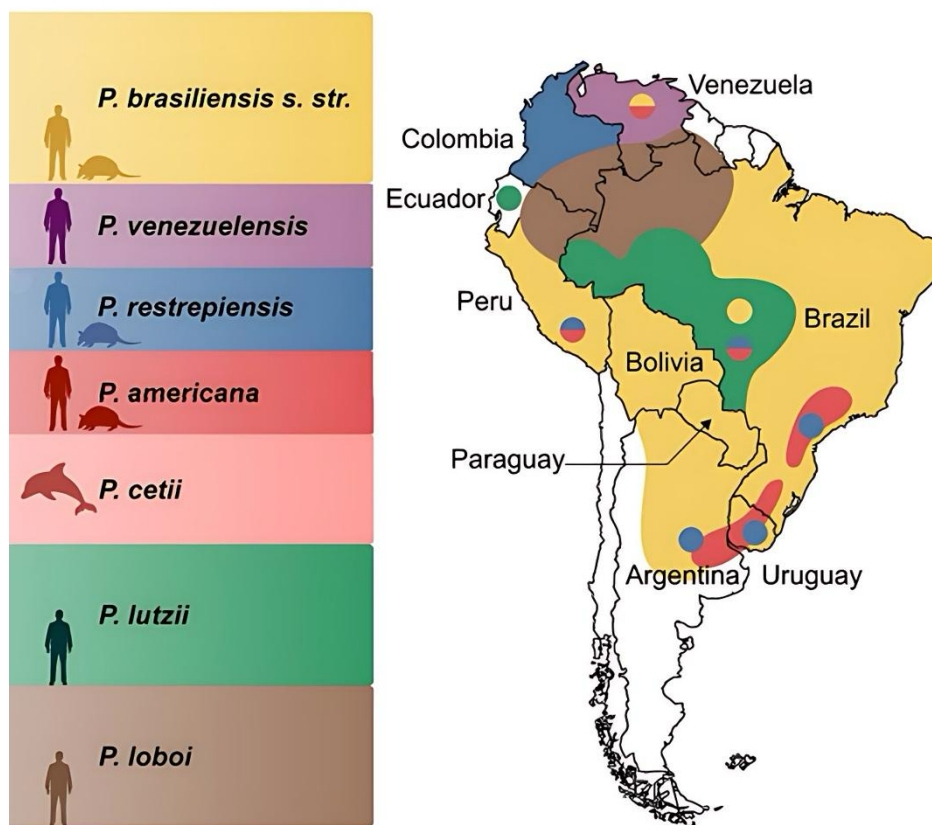


Figura 5. Distribuição geográfica das espécies do gênero *Paracoccidioides* spp. e seus respectivos hospedeiros.

Fonte: Adaptado de Rodrigues et al. (2023)

1.5 Aspectos clínicos

Diferentes classificações clínicas da PCM foram propostas ao longo do tempo, refletindo distintas abordagens para compreender a evolução e apresentação da doença. De acordo com o II Consenso Brasileiro em Paracoccidioidomicose (2017), a PCM é classificada em três categorias principais: A) Infecção paracoccidióidica; B) Paracoccidioidomicose (doença), subdividida em: B.1) Forma aguda/subaguda (juvenil), classificada em moderada e grave; B.2) Forma crônica, classificada em leve, moderada e grave; C) Forma residual (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A forma aguda ou subaguda da PCM, também denominada tipo juvenil, acomete principalmente crianças e jovens adultos, representando entre 5% e 25% dos casos diagnosticados (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). Essa apresentação clínica caracteriza-se por uma evolução rápida e agressiva, apresentando a manifestação mais grave da doença, com alta taxa de letalidade, especialmente em crianças e adolescentes, devido à ineficácia da resposta imunológica celular nesses indivíduos (DE MACEDO et al., 2017).

A patogênese dessa forma está associada a uma resposta imunológica desregulada de células Th2, o que compromete a capacidade do hospedeiro em controlar a carga fúngica, favorecendo a disseminação sistêmica do patógeno (DE MACEDO et al., 2017). Essa forma clínica acomete ambos os sexos, com uma prevalência semelhante entre homens e mulheres. A evolução da PCM aguda é frequentemente fulminante, com manifestações clínicas surgindo semanas ou meses após a exposição primária ao *P. brasiliensis*. (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Os principais sinais e sintomas incluem febre persistente, perda de peso significativa e linfadenomegalia generalizada, frequentemente associada a hepatomegalia e esplenomegalia. Além disso, o aumento dos gânglios linfáticos, muitas vezes evoluindo para supuração e formação de fístulas, pode ocasionar atraso no diagnóstico. Essas manifestações clínicas são as características predominantes dessa forma clínica da doença (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). Diferentemente da PCM crônica, o comprometimento pulmonar é raro na apresentação aguda, o que a diferencia de outras formas da doença. Embora lesões em órgãos como pele, ossos, cavidade oral e intestinos possam ocorrer, elas são menos frequentes nesta forma clínica (MARQUES et al., 2007).

Já a forma crônica ou adulta da PCM corresponde a 80% a 95% dos casos da doença. Afeta predominantemente homens acima de 30 anos, em uma razão de aproximadamente 10:1 em relação às mulheres, e tem como principal característica o comprometimento pulmonar e do trato respiratório superior (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). As mucosas orais e a pele perioral também são frequentemente acometidas, resultando em lesões ulceradas e inflamatórias ao redor da boca e do nariz afetadas (MARQUES et al., 2007). Além disso, a disseminação hematogênica do fungo pode levar ao envolvimento de órgãos como as glândulas adrenais, ossos e, em alguns casos, o sistema nervoso central indivíduos (DE ALMEDIA et al., 2004).

O período de latência da PCM crônica pode ser bastante variável, podendo se estender de anos a décadas, o que contribui para sua evolução insidiosa e progressiva (HAHN et al., 2022). Clinicamente, essa forma pode se manifestar de duas maneiras principais: unifocal, quando acomete apenas um órgão ou sistema, sendo os pulmões o principal local de envolvimento; e multifocal, quando há acometimento simultâneo de múltiplos órgãos e sistemas, como pele, mucosas, pulmões e glândulas suprarrenais. As manifestações clínicas mais frequentes incluem lesões ulceradas nas mucosas oral, faríngea e laríngea, além de

comprometimento cutâneo caracterizado por lesões ulceradas ou verrucosas (HAHN et al., 2022).

Entre as diferentes propostas de classificação, destaca-se a abordagem de Benard (BENARD et al., 2021), que revisita os conceitos tradicionais da PCM ao sugerir uma transição gradual entre a forma pulmonar primária (PP-PCM) e a forma crônica, em contraste com a visão convencional de reativação abrupta de focos latentes. Essa proposta amplia a compreensão dos desfechos clínicos da PCM, fornecendo novas perspectivas sobre sua patogênese e manejo, o que pode influenciar futuras abordagens terapêuticas e estratégias de acompanhamento dos pacientes.

1.6 Diagnóstico

O diagnóstico da PCM é realizado por meio da integração dos dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (ALMEIDA-PAES et al., 2022). No aspecto laboratorial, se baseia principalmente na identificação e no isolamento do fungo, realizados por meio de exames microscópicos e cultivo micológico, que são considerados o "padrão-ouro" para confirmar a doença (ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2014).

No entanto, a citopatologia e a histopatologia também são ferramentas de grande valor no diagnóstico da PCM (ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2014). Adicionalmente, outras técnicas, como os testes sorológicos, são utilizadas como ferramentas complementares, permitindo a detecção de anticorpos específicos circulantes. Entretanto as técnicas sorológicas apresentam limitações relacionadas à sensibilidade e especificidade (DA SILVA et al., 2016). Nesse cenário, as técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) “*in house*” vêm ganhando relevância como ferramentas diagnósticas, permitindo a detecção específica e sensível do agente etiológico, mesmo em amostras com baixa carga fúngica (ROCHA-SILVA et al., 2017).

1.6.1 Exame microscópico direto e cultivo

Para a realização do exame microscópico direto, podem ser utilizados diferentes tipos de amostras clínicas, como raspados de lesões na pele e mucosas, escarro, lavado broncoalveolar, aspirados de linfonodos, líquido cefalorraquidiano, entre outras (RESTREPO; GÓMEZ; TOBÓN, 2012). Essas amostras são processadas e posteriormente montadas em lâminas, às quais se adiciona hidróxido de potássio (KOH) a 10% ou hidróxido de sódio

(NaOH) a 4%, permitindo a clarificação do material para análise microscópica em aumentos de 40x a 100x (ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2014).

Esse procedimento permite a visualização das células fúngicas características de *Paracoccidioides* sp., que são leveduriformes, arredondadas, de parede celular espessa e refringente, com tamanhos variados (4–40 µm) e vacúolos lipídicos proeminentes. Também é possível observar células-mãe de grande tamanho, rodeadas por várias células-filhas, apresentando brotamento múltiplo em forma de "timão de navio". Em outros casos, algumas células apresentam apenas dois brotos, adquirindo uma aparência semelhante ao "Mickey Mouse" (Figura 6) (PEÇANHA-PIETROBOM et al., 2023).

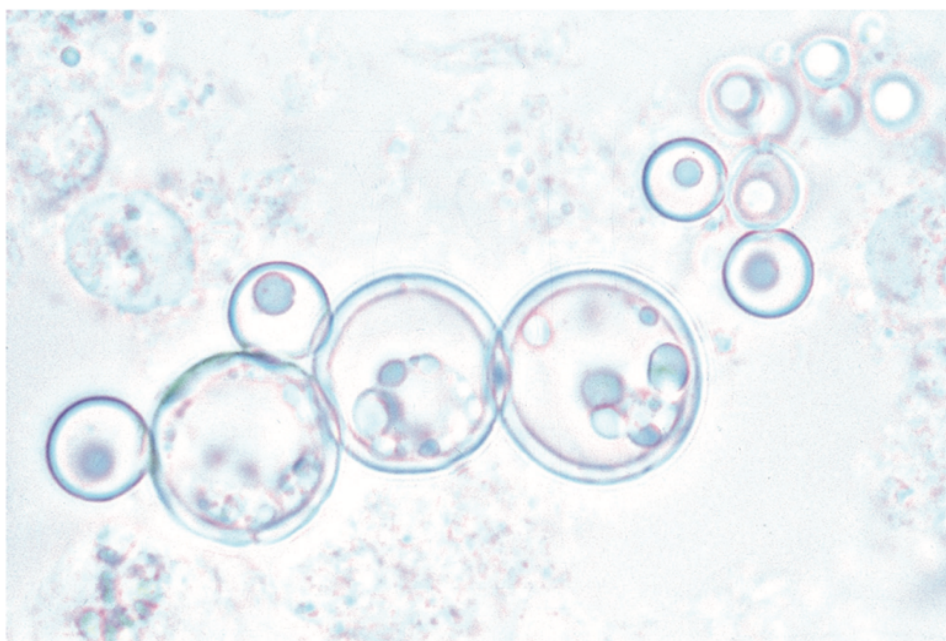


Figura 6. Microscopia com NaOH observando as células com multibrotamentos.

Fonte: Adaptado de Restrepo et al., (2019).

Para o isolamento do fungo, o cultivo pode ser realizado em diferentes meios, como ágar Sabouraud (SAB), ágar Sabouraud suplementado com antibióticos como cicloheximida e cloranfenicol (SCC), ágar Infusão Cérebro e Coração (BHI), ágar Glicose-Peptona-Extrato de Levedura (GPY) e meio de Fava-Netto, entre outros (GÓMEZ; TOBÓN; GONZÁLEZ, 2024).

Paracoccidioides sp. é um fungo de crescimento lento e difícil. Por essa razão, utiliza-se meios enriquecidos com nutrientes essenciais e antibióticos, para inibir a proliferação de bactérias da microbiota comum, que podem crescer mais rapidamente e competir com o fungo, dificultando seu isolamento (RESTREPO; GÓMEZ; TOBÓN, 2012).

Em laboratório, as amostras são cultivadas simultaneamente nas duas temperaturas, mencionadas a seguir. A temperatura ambiente de 25- 28°C, o fungo *Paracoccidioides* sp.

crece na forma filamentosa, sendo possível observar o desenvolvimento de colônias irregulares de cor branca a creme e superfície elevada após um período de incubação de 15 a 30 dias (TELES; MARTINS, 2011). Já a 35-37°C, com um período de incubação entre 10 e 15 dias, apresenta-se na forma leveduriforme, caracterizando-se por colônias cremosas, cerebriformes de coloração bege. O tempo de desenvolvimento das colônias é variável, podendo levar semanas ou até meses (NUCCI; COLOMBO; QUEIROZ-TELLES, 2009).

1.6.2 Exame Citopatológico e histopatológico

O exame citopatológico é realizado por meio da análise de células isoladas provenientes de diversas amostras, como escarro, lavado broncoalveolar, punção aspirativa por agulha fina (PAAF) de linfonodos, além de raspados de lesões cutâneas e mucosas. Essas amostras podem ser coradas com colorações como Giemsa, Papanicolaou, impregnação pela prata Gomori-Grocot (GMS), ácido periódico de Schiff (PAS), permitindo a identificação das formas leveduriformes características de *Paracoccidioides* sp. (DE SOUZA VIANNA et al., 2013; SIVIERI DE ARAÚJO; SOUSA; CORREIA, 2003).

O exame histopatológico, por sua vez, é baseado na análise de biópsias de tecidos afetados, como pele, mucosas, linfonodos e pulmões. As amostras são processadas, incluídas em parafina e coradas principalmente com Hematoxilina-Eosina (HE), PAS e GMS, o que permite uma melhor visualização das estruturas fúngicas e da resposta inflamatória tecidual. A formação de granulomas com células gigantes multinucleadas, infiltrado polimorfonuclear e as células de levedura características de *Paracoccidioides* sp. são marcantes da doença nos estágios avançados. Esse tipo de exame também possibilita a avaliação da gravidade da infecção (AMEEN; TALHARI; TALHARI, 2010; JENSEN, 2021).

1.6.3 Testes Sorológicos

Os testes sorológicos disponíveis para o diagnóstico da PCM podem detectar tanto anticorpos quanto antígenos circulantes em diversos fluidos biológicos (MENDES et al., 2017). No entanto, os mais utilizados são aqueles que identificam anticorpos específicos contra antígenos do *Paracoccidioides* spp. (DE CAMARGO, 2008). Esses testes apresentam limitações, pois são influenciados pela variabilidade da resposta imune do hospedeiro, especialmente em indivíduos imunossuprimidos. Os testes sorológicos para a detecção de anticorpos são amplamente utilizados como método complementar em laboratórios de regiões endêmicas e desempenham um papel essencial no prognóstico da doença, permitindo o

monitoramento dinâmico dos títulos de anticorpos ao longo do tratamento. Essa abordagem auxilia na tomada de decisão clínica sobre a continuidade ou interrupção da terapia antifúngica, contribuindo para um manejo mais preciso e eficaz da doença, especialmente em pacientes imunossuprimidos (TELES; MARTINS, 2011).

Entre as principais técnicas sorológicas empregadas no diagnóstico da PCM, destacam-se a imunodifusão dupla em gel de ágar (IDD), a contraimuno eletroforese (CIE), o teste de aglutinação do látex (LA) (CAMARGO; DE; 2000, [s.d.]; PEÇANHA et al., 2022).

Por outro lado, os testes sorológicos são úteis na avaliação da gravidade da doença, uma vez que os títulos de anticorpos na PCM correlacionam-se com a gravidade do quadro clínico, sendo mais elevados nas formas disseminadas e na apresentação aguda/subaguda. Ademais, essas técnicas são empregadas no monitoramento da resposta ao tratamento, permitindo acompanhar a redução progressiva dos títulos de anticorpos ao longo do tempo (ALMEIDA-PAES et al., 2022; MENDES et al., 2017).

A IDD tem sido o método mais amplamente utilizado no contexto laboratorial-hospitalar para a PCM, devido à sua simplicidade e ao fato de não exigir equipamentos de alto custo (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). No entanto, esta técnica apresenta desvantagens, como a ocorrência de resultados falso-negativos, especialmente em pacientes gravemente imunocomprometidos. Apesar dessas limitações, a IDD apresenta uma alta taxa de eficiência, variando entre 65% e 100%, sendo seu desempenho influenciado pela preparação antigênica utilizada (ALMEIDA-PAES et al., 2022; CANO; RESTREPO, 1987; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A padronização dos antígenos utilizados nos ensaios sorológicos representa um desafio nessas técnicas, uma vez que diferentes espécies do complexo *Paracoccidioides* apresentam variações na composição antigênica (DE MACEDO et al., 2019; MATTOS et al., 2021). A glicoproteína GP43 é o principal antígeno imunorreativo de *Paracoccidioides* spp.; no entanto, sua produção varia entre as espécies do fungo, especialmente em *P. lutzii*, que secreta gp43 em menores quantidades e pode apresentar uma organização molecular alterada (CAPELLA MACHADO et al., 2013; LEITÃO et al., 2014).

Essas diferenças nos perfis antigênicos das espécies de *Paracoccidioides* induzem distintas respostas imunes humorais no hospedeiro, impactando diretamente a sensibilidade dos testes sorológicos (DA SILVA et al., 2016; HIGUITA-GUTIÉRREZ et al., 2019).

1.6.4 Testes Moleculares

Considerando as limitações dos métodos convencionais de diagnóstico descritas nas seções anteriores, destacam-se fatores como a necessidade de profissionais experientes para a análise dos exames, o longo tempo necessário para o cultivo, a ocorrência de reações cruzadas e resultados falso-negativos, além do polimorfismo da proteína glicoproteína de 43 kDa (gp43), que pode desaparecer da circulação durante o tratamento (DEL NEGRO et al., 1995; MORAIS et al., 2000; PUCCIA; TRAVASSOS, 1991; TELES; MARTINS, 2011). Ademais, esses métodos não permitem a diferenciação entre as espécies do gênero *Paracoccidioides* (TELES; MARTINS, 2011).

Em resposta a essas limitações, métodos moleculares vêm sendo desenvolvidos para auxiliar no diagnóstico da PCM, complementando os métodos microbiológicos, histopatológicos e imunológicos (WICKES; WIEDERHOLD, 2018). O diagnóstico molecular baseia-se na detecção direta do material genético do fungo em diferentes tipos de amostras, incluindo isolados fúngicos em cultivo, fluidos biológicos, biópsias e amostras ambientais, sem a necessidade de isolamento prévio do microrganismo (GAVIRIA et al., 2015; KOISHI et al., 2010; PINHEIRO et al., 2021, 2023; ROCHA-SILVA et al., 2017, 2018).

A principal técnica utilizada é a reação em cadeia da polimerase (PCR), que permite a amplificação de sequências-alvo do DNA fúngico, conferindo alta sensibilidade ao diagnóstico, mesmo quando a carga fúngica na amostra é reduzida (HAHN et al., 2022; MENDES et al., 2017). Diferentes variações da PCR são empregadas para aprimorar a especificidade e a sensibilidade da detecção, incluindo duplex PCR, nested PCR, semi-nested PCR, PCR em tempo real (qPCR) e PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (HAHN et al., 2022).

Entre os alvos moleculares mais estudados para a identificação de *Paracoccidioides* estão as regiões espaçadoras internas transcritas (ITS) do DNA ribossomal e o gene da gp43, que têm sido amplamente utilizados no desenvolvimento de *primers* específicos para a detecção de *P. brasiliensis*, tanto em culturas quanto diretamente em amostras clínicas de pacientes com PCM (GOMES et al., 2000; IMAI et al., 2000). Além da PCR, técnicas baseadas em amplificação isotérmica (LAMP - *Loop-Mediated Isothermal Amplification*) surgiram como alternativas promissoras, permitindo a detecção rápida e específica de *Paracoccidioides* sem necessidade de equipamentos sofisticados, sendo viáveis para aplicação em laboratórios com infraestrutura limitada (ENDO et al., 2004). Recentemente, estratégias de metagenômica e

sequenciamento de nova geração (NGS) também têm sido exploradas para identificar o fungo diretamente em amostras clínicas e ambientais, permitindo a caracterização da diversidade genética e a diferenciação entre espécies do complexo *P. brasiliensis* e *P. lutzii* sem necessidade de cultivo prévio (PINHEIRO et al., 2020).

O desenvolvimento contínuo de testes moleculares específicos e de alto desempenho é essencial para aprimorar o diagnóstico da PCM, especialmente em regiões endêmicas, onde a detecção precoce pode impactar diretamente a condução do tratamento e o prognóstico dos pacientes (ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2014). Apesar dos avanços significativos no desenvolvimento de testes moleculares para o diagnóstico da PCM, ainda há um desafio crucial a ser superado: a validação em cenários clínicos reais. Muitos dos métodos descritos demonstram alta sensibilidade e especificidade em estudos experimentais e laboratoriais, mas sua aplicação rotineira na prática clínica ainda requer avaliação padronizada em diferentes populações, condições ambientais e tipos de amostras (PINHEIRO et al., 2020). Além disso, a falta de consenso sobre alvos genéticos ideais, a necessidade de comparação com métodos diagnósticos convencionais e a disponibilidade limitada desses testes em áreas endêmicas são fatores que dificultam sua ampla implementação. Assim, embora os testes moleculares representem uma abordagem promissora para o diagnóstico rápido e preciso da PCM, mais estudos clínicos e multicêntricos são necessários para validar sua aplicabilidade, confiabilidade e impacto na tomada de decisões médicas.

1.7 Tratamento

A abordagem terapêutica da PCM deve considerar sua característica sistêmica, levando em conta o estado geral do paciente, a forma de apresentação da doença (subaguda ou crônica) e os órgãos afetados (RESTREPO A; TOBÓN AM; GONZALEZ A, 2019). A definição do tratamento e sua duração deve considerar a gravidade do caso, antecedentes de falhas terapêuticas, viabilidade do uso de medicação oral, existência de comorbidades, gestação e adesão do paciente ao regime proposto no II Consenso Brasileiro em Paracoccidioidomicose (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Além do tratamento antifúngico, é essencial adotar medidas de suporte, como o controle da tríade desnutrição-imunossupressão-infecção. A interrupção do consumo de álcool e tabaco, hábito frequente entre pacientes com PCM, também contribui significativamente para a recuperação (RESTREPO A; TOBÓN AM; GONZALEZ A, 2019). O tratamento da PCM

baseia-se em três principais classes de antifúngicos: sulfonamidas, polienos (anfotericina B) e derivados dos azóis. As opções terapêuticas incluem:

Sulfonamidas de eliminação lenta: A dose recomendada de sulfametoxazol-trimetoprima para adultos é de 800/160 mg duas vezes ao dia, enquanto para crianças varia entre 40-50 mg/kg de sulfametoxazol e 8-10 mg/kg de trimetoprima, também duas vezes ao dia (Tabela 1) (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A terapia deve ser mantida por até dois anos, embora a longa duração esteja associada a altas taxas de abandono. Essa combinação destaca-se pela boa eficácia, baixo custo e possibilidade de administração oral ou parenteral quando necessário, tornando-se uma opção valiosa devido à sua acessibilidade e boa tolerabilidade (MARQUES, 2013).

O principal efeito adverso é a mielotoxicidade, que pode ser controlada com ácido folínico sem comprometer a eficácia do tratamento. Além disso, essa terapia pode ser usada inicialmente em associação com anfotericina B (AmB) (GÓMEZ; TOBÓN; GONZÁLEZ, 2024).

Azóis sistêmicos: O azól de escolha para essa micose é o itraconazol, que apresenta uma eficácia em até 95% dos casos, com poucos efeitos colaterais, e a taxa de recidiva é de aproximadamente 5% (GÓMEZ; TOBÓN; GONZÁLEZ, 2024). Como terapia primária para casos mais brandos, recomenda-se o itraconazol, que induz uma melhora clínica mais rápida e uma cura sorológica superior em comparação a outros (CAVALCANTE et al., 2014).

A dose usual para adultos varia entre 200 e 400 mg/dia por até seis meses. Para crianças com mais de 5 anos e peso inferior a 30 kg, a dose recomendada é de 5 a 10 mg/kg/dia, ajustando-se conforme os parâmetros de cura (Tabela 1). Em casos graves de PCM em adultos, doses mais altas podem ser administradas (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Para melhor biodisponibilidade e absorção, recomenda-se a formulação em solução oral no caso sejam utilizadas cápsulas de itraconazol, deve-se evitar medicamentos que reduzam a acidez gástrica (GÓMEZ; TOBÓN; GONZÁLEZ, 2024).

De maneira geral, os azóis apresentam bons resultados e baixas taxas de recidiva. Estudos recentes indicam que o voriconazol (800 mg/dia, isolado ou em combinação) pode ser uma alternativa eficaz. Diferentemente das sulfonamidas, os azóis possibilitam a cura clínica e micológica em aproximadamente seis a oito meses (MUKHERJEE et al., 2005).

Anfotericina B: A dose da anfotericina B desoxicolato varia entre 0,5 e 0,7 mg/kg/dia. Para as formulações lipídicas, a dose padrão é de 3 mg/kg/dia, podendo variar entre 3 e 5 mg/kg/dia (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Esse antifúngico é a terapia de escolha para casos graves e disseminados, sendo geralmente administrado em ambiente hospitalar devido aos seus efeitos adversos (GÓMEZ; TOBÓN; GONZÁLEZ, 2024). A duração do tratamento varia de 2 a 4 semanas, dependendo da melhora clínica do paciente. Após esse período, a terapia deve ser continuada com antifúngicos orais (PEÇANHA et al., 2016).

Devido à alta toxicidade da anfotericina B desoxicolato, pode-se optar por formulações lipídicas, como a anfotericina B lipossomal, que reduz o risco de nefrotoxicidade. Além disso, outras formulações lipídicas, como a anfotericina B em dispersão coloidal (ABCD) e o complexo lipídico de anfotericina B (ABLC), foram desenvolvidas e estão disponíveis em diversos países (PEÇANHA et al., 2016).

Tabela 1. Medicamentos e doses recomendadas para o tratamento da paracoccidioidomicose (PCM).

Medicamento	Dose	Duração média
Itraconazol*	200mg diários **Crianças com <30 kg e >5 anos – 5 a 10mg/kg/dia; ajustar dose sem abrir a cápsula	9-18 meses
Cotrimoxazol*	Trimetoprim, 160mg + Sulfametoxazol, 800mg (VO 8/8 h ou 12/12h) Crianças – trimetoprim, 8 a 10mg/kg Sulfametoxazol, 40 a 50mg/kg, VO 12/12 h	18-24 meses***
Anfotericina B	Desoxicolato, 0,5 a 0,7 mg/kg/dia Formulações lipídicas, 3 a 5 mg/kg/dia	2-4 semanas**** (até melhora)

Nota:
* Não usar concomitantemente com astemizol, antiácidos e bloqueadores de receptor H₂, barbitúricos, disápride, ciclosporina, didanosina, digoxina, fentanil, fenitoína, rifampicina, disápride e terfenadina.
** Maior experiência em crianças – com sulfametoxazol/trimetoprim.
*** Prolongar a duração do tratamento quando há envolvimento de sistema nervoso central.
**** Requer tratamento de manutenção com itraconazol ou cotrimoxazol.

Fonte: Adaptado de Shikanai-Yasuda et al., 2017.

1.8 Resposta Imune e fatores de virulência

A PCM é uma micose sistêmica cuja evolução da doença depende da complexa interação entre os fatores de virulência do *Paracoccidioides* e a resposta imunológica do hospedeiro. A progressão da infecção pode resultar na eliminação do patógeno sem sequelas ou na disseminação da doença, levando a manifestações crônicas e debilitantes (BURGER et al., 2021).

A resposta imune mediada por células T auxiliares do tipo 1 (Ta1) desempenha um papel fundamental na contenção da infecção, promovendo a ativação de macrófagos e a

formação de granulomas organizados (BURGER et al., 2021). Além disso, as células T auxiliares do tipo 17 (Ta17), também contribuem para a proteção contra infecções fúngicas. Foi demonstrado que essas células estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, recrutando neutrófilos e outras células para controlar os patógenos no local da infecção (VELDHOEN, 2017). No entanto, *Paracoccidioides* possui diversos mecanismos de evasão imunológica que favorecem sua persistência no hospedeiro, contribuindo para a cronicidade da doença e suas complicações clínicas (CAMACHO; NIÑO-VEGA, 2017).

A resposta imunológica contra *Paracoccidioides* inicia-se com a ativação da imunidade inata, que reconhece o patógeno e desencadeia mecanismos de defesa essenciais para conter a infecção. Esse processo envolve o reconhecimento de padrões moleculares fúngicos e a ativação celular, promovendo uma resposta inicial contra o microrganismo (CALICH et al., 2008).

A resposta imune adaptativa contra *Paracoccidioides* é mediada por células T e B, sendo a imunidade celular essencial para o controle da infecção (CEZAR-DOS-SANTOS et al., 2020). Como mencionado anteriormente, a ativação das respostas Ta1 e Ta17 promove a ativação de macrófagos e a formação de granulomas organizados, restringindo a disseminação do fungo. Em contraste, uma resposta predominante de perfil de células T auxiliar do tipo 2 (Ta2) ou perfil de células T auxiliar do tipo 9 (Ta9) está associada à maior susceptibilidade, favorecendo a progressão da doença (BURGER et al., 2021).

Embora os anticorpos não constituam a principal via de defesa, eles desempenham um papel na neutralização do patógeno e na modulação da resposta imune. Evidências sugerem que anticorpos monoclonais específicos podem inibir o crescimento fúngico e reduzir a carga da infecção, demonstrando potencial terapêutico (TOLEDO et al., 2010).

Os fatores de virulência de *Paracoccidioides* spp. modulam a resposta imune protectora de várias maneiras, desempenham um papel crucial na adesão, invasão, evasão da resposta imune e adaptação ao hospedeiro, promovendo a sobrevivência do fungo e a progressão da doença (DE OLIVEIRA et al., 2015).

A adesão e invasão são mediadas por adesinas, como a glicoproteína de 43 kDa (gp43) e enzimas glicolíticas enolase (ENO), frutose-bisfosfato aldolase (FBA), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e triose-fosfato isomerase (TPI), que facilitam a fixação do fungo às células do hospedeiro e induzem apoptose em células epiteliais, favorecendo sua disseminação (LOPES et al., 1994; MARCOS et al., 2014; MENDES-GIANNINI et al., 2000).

Para evadir o sistema imune, *Paracoccidioides* emplea varias estratégias como enmascaramiento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) estimulatórios e na forma patógena leveduriforme substitui β -(1,3)-glucano por α -(1,3)-glucano na parede celular, dificultando o reconhecimento pelos fagócitos (CAMACHO; NIÑO-VEGA, 2017). Além disso, a melanização das leveduras e a inibição da liberação de óxido nítrico (NO) por macrófagos reduzem a resposta inflamatória e aumentam a resistência ao estresse oxidativo (POPI; LOPES; MARIANO, 2002; SANTOS et al., 2020).

A adaptação ao hospedeiro é garantida pelo dimorfismo térmico, regulado por proteínas de choque térmico (HSPs), além da ação de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD) e catalase, que protegem o fungo contra espécies reativas de oxigênio (DE ARRUDA GROSSKLAUS et al., 2013). Outros fatores, como a glicoproteína de 70 kDa (gp70), hemolisinas e hemaglutininas, contribuem para a resistência fúngica, obtenção de ferro e persistência no organismo, tornando *Paracoccidioides* um patógeno altamente adaptado ao ambiente intracelular (CEZAR-DOS-SANTOS et al., 2018, 2020; MARICATO et al., 2010).

1.9 Paracoccidioidomicose no Paraguai

A PCM, é a principal micose sistêmica registrada no Paraguai (MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y BIENESTAR SOCIAL. PARAGUAY, 2016)(MUÑOZ et al., 2016b; RICHINI-PEREIRA et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2020)

Os primeiros registros da PCM no país datam em 1920, quando a doença foi mencionada em uma revisão publicada em uma revista médica paraguaia, sendo referida como “blastomicose sul-americana” (ESCOMEL et al., 1920).

Anos depois, em 1933, casos de PCM foram descritos em prisioneiros de guerra bolivianos no território paraguaio, embora não tenham sido considerados autóctones (BOGGINO et al., 1934; BOGGINO et al., 1935). O primeiro caso autóctone de PCM no Paraguai foi documentado em 1935 por Juan Boggino, que diagnosticou a infecção em um soldado paraguaio. Ele se referiu à doença como "granuloma coccidióidico" e descreveu estruturas compatíveis com *Paracoccidioides* spp. (BOGGINO et al., 1935). Desde então, a doença tem sido objeto de estudo no país. Posteriormente, Boggino também foi responsável pela publicação dos primeiros relatos de casos confirmados no Paraguai (Figura 7) (INSAULRRALDE et al., 1938; GONZALEZ et al., 1944).

Em uma revisão sistemática, Araújo e colaboradores compilaram os casos de PCM adquiridos no Paraguai entre 1934 e 2023, identificando um total de 479 casos. Quanto ao perfil clínico, relataram que a PCM no Paraguai afeta principalmente homens adultos, com uma idade média de 45,78 anos, que trabalham na agricultura. A forma clínica predominante é a crônica, com acometimento pulmonar e sintomas semelhantes aos da tuberculose. A distribuição geográfica da doença é ampla, com a maioria dos casos concentrando-se na Região Oriental do Paraguai, mas com relatos em quase todos os estados do país. A coexistência com outras doenças, especialmente a tuberculose, representa um desafio diagnóstico e terapêutico. Além disso, a PCM frequentemente afeta indivíduos em condições socioeconômicas desfavorecidas, refletindo as desigualdades em saúde no Paraguai (Figura 7) (ARAÚJO et al., 2016).

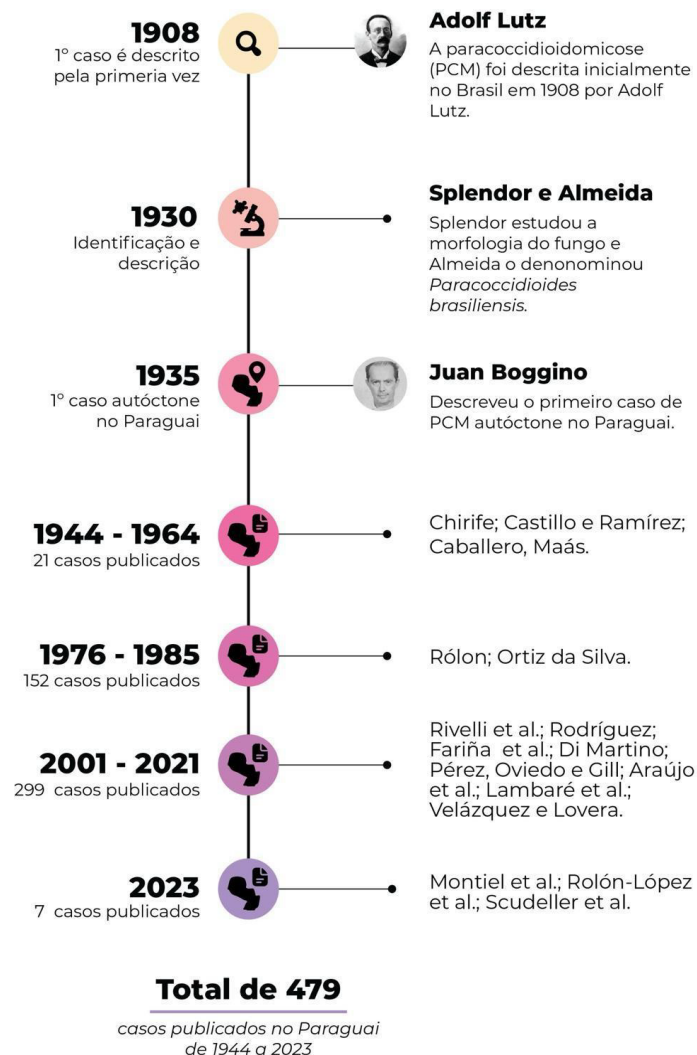


Figura 7. Histórico da paracoccidioidomicose (PCM) e casos no Paraguai.

Fonte: Autoria própria utilizando recursos visuais do Google Imagens.

1.10 Organização geográfica do Paraguay

Em termos político-administrativos Paraguai esta dividido em 17 estados como ilustrado na Figura 8: I *Concepción*, II *San Pedro*, III *Cordillera*, IV *Guairá*, V *Caaguazú*, VI *Caazapá*, VII *Itapúa*, VIII *Misiones*, IX *Paraguari*, X *Alto Paraná*, XI *Central*, XII *Ñeembucú*, XIII *Amambay*, XIV *Canindeyú*, XV *Presidente Hayes*, XVI *Boquerón*, XVII *Alto Paraguay* e o Distrito Capital: Assunção (“Ordenamiento Territorial de la República del Paraguay : Repertorio Normativo de la División Política y Administrativa.”)



Figura 8. Mapa do Paraguai: Divisão político-administrativa

Fonte: Adaptado do site ABC digital

O Paraguai possui duas regiões naturais diferenciadas pelo rio Paraguai. À direita do rio localiza-se a região Ocidental ou Chaco, com um clima que varia desde o tipo "úmido" (próximo ao rio), semiárido até árido, à medida que se avança em direção à fronteira com a Bolívia. As chuvas são escassas e sazonais, as temperaturas são elevadas, os solos são salinos

e quase não há água subterrânea. Esses fatores impõem limitações à produção agropecuária e ao estabelecimento populacional, ambos escassos e dispersos (TORRES et al., 2018).

À esquerda do rio Paraguai localiza-se a região Oriental, com uma área de 159.827 km². Apresenta relativa homogeneidade em termos de fatores climáticos, com chuvas bem distribuídas ao longo do ano, temperatura média de 23,3 °C, solos profundos e aptos para a agricultura; não possui zonas montanhosas. A flora e a fauna são muito variadas, com florestas e pradarias naturais, além de uma diversificada rede de recursos hídricos (TORRES et al., 2018)

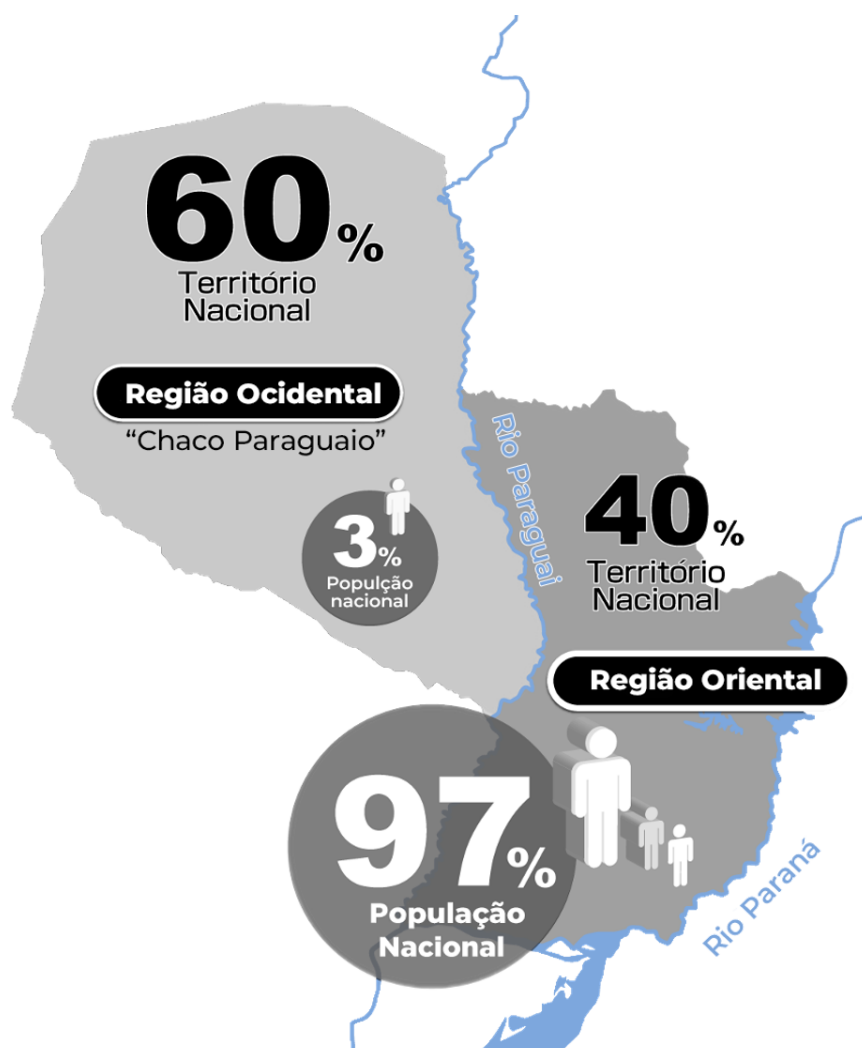


Figura 9. Mapa do Paraguai, regiões naturais.

Fonte: Adaptado do site da Embaixada do Paraguai no Japão.

1.11 Epidemiologia molecular

A epidemiologia molecular e a modelagem de nicho ecológico (MNE) são ferramentas fundamentais no estudo de doenças infecciosas. O avanço das técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS) permitiu uma caracterização genética mais precisa das espécies do gênero

Paracoccidioides, enquanto a modelagem ecológica pode contribuir para a compreensão dos fatores ambientais que influenciam sua distribuição geográfica.

Esses métodos podem ser aplicados para esclarecer padrões epidemiológicos da PCM, principalmente em áreas pouco exploradas e de difícil acesso. A epidemiologia molecular da PCM avançou significativamente com a genômica comparativa e o sequenciamento de linhagens isoladas de pacientes e do meio ambiente (MUÑOZ et al., 2016; RICHINI-PEREIRA et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2020).

Esses avanços têm permitido monitorar a evolução genética das espécies de *Paracoccidioides* em diferentes regiões geográficas, identificar *clusters* epidemiológicos que possam indicar surtos localizados ou novas variantes emergentes, analisar a variabilidade genética intraespecífica, diferenciando *P. brasiliensis* de *P. lutzii* e outras variantes genéticas, além de avaliar a relação entre isolados clínicos e ambientais, determinando possíveis rotas de transmissão e fatores que influenciam a infecção.

O uso de NGS em isolados de *Paracoccidioides* permite a identificação de elementos transponíveis, mutações em genes relacionados à virulência e adaptação ao ambiente, além da compreensão da diversidade genética entre diferentes regiões endêmicas (Muñoz et al., 2016). Além disso, a epidemiologia molecular tem sido essencial para compreender a distribuição geográfica das espécies do complexo *P. brasiliensis*, que inclui diferentes genótipos, e a diferenciação com *P. lutzii*, cuja epidemiologia é distinta e concentra-se principalmente no Centro-Oeste do Brasil (Teixeira et al., 2020).

A modelagem de nicho ecológico (MNE) é uma ferramenta essencial para prever a distribuição geográfica potencial de *Paracoccidioides*, especialmente em regiões pouco exploradas. Métodos como Máxima Entropia (*MaxEnt*) e *Random Forest* são amplamente utilizados para correlacionar dados de ocorrência de espécies com variáveis ambientais, incluindo clima, tipo de solo, vegetação e altitude (ESCOBAR; CRAFT, 2016; STEVENS; PFEIFFER, 2011). Enquanto o *MaxEnt* estima a distribuição potencial do patógeno com base na maximização da entropia (YANG et al., 2025), o *Random Forest*, um modelo de aprendizado de máquina, combina múltiplas árvores de decisão para identificar padrões ambientais que favorecem a presença do fungo e sua transmissão (AAWAR; SRIVASTAVA, 2022). A aplicação desses métodos possibilita uma análise mais robusta, contribuindo para a identificação de áreas de risco e para o aprimoramento das estratégias de vigilância epidemiológica.

Os estudos prévios, sugerem que a presença de *Paracoccidioides* está altamente correlacionada com fatores ambientais específicos, tais como temperatura e umidade do solo, já que regiões com temperaturas médias entre 18-26°C e alta umidade favorecem o crescimento do fungo no ambiente. Além disso, o uso do solo e o desmatamento são fatores determinantes para a disseminação da PCM, pois a doença é frequentemente associada a atividades como agricultura, pecuária e construção civil, que expõem o solo contaminado com conídios do fungo (Queiroz-Telles et al., 2017). A altitude e a vegetação também influenciam a ocorrência da PCM, sendo mais prevalente em áreas de Mata Atlântica e Cerrado, geralmente entre 500 e 1.500 metros de altitude, onde as condições são favoráveis para o desenvolvimento do fungo no ambiente.

Estudos recentes demonstram que a aplicação da Modelagem de Nicho Ecológico (MNE), associada à análise genômica, pode prever novos focos de doenças fúngicas, incluindo regiões anteriormente consideradas de baixa endemicidade. Recentemente, nosso grupo identificou áreas de expansão de micoses endêmicas, como coccidioidomicose e histoplasrose, bem como diferentes padrões de endemicidade dessas doenças em diversas regiões, evidenciando a necessidade de estratégias aprimoradas de vigilância epidemiológica e controle (EULÁLIO et al., 2024).

Modelos baseados em dados climáticos de longo prazo indicam que mudanças ambientais podem expandir a área de ocorrência do fungo, aumentando o risco de infecção para populações expostas. Além disso, estudos usando dados de sensoriamento remoto têm permitido uma maior precisão na estimativa de áreas de risco. Isso é particularmente útil para prever o impacto de mudanças climáticas na distribuição do fungo e antecipar futuras áreas endêmicas. A combinação de epidemiologia molecular e modelagem de nicho ecológico é uma abordagem promissora para aprofundar a compreensão da PCM.

Enquanto a genômica revela informações sobre a diversidade genética do patógeno e sua evolução, a modelagem ecológica fornece *insights* sobre os fatores ambientais que influenciam sua distribuição. Algumas das principais aplicações dessa abordagem integrada incluem a identificação de *hotspots* de transmissão da PCM em regiões pouco estudadas, a correlação entre genótipos de *Paracoccidioides* e fatores ambientais, ajudando a entender a ecologia do patógeno, além da vigilância epidemiológica direcionada, permitindo que medidas preventivas sejam implementadas em áreas de alto risco. Isso possibilita ainda o desenvolvimento de políticas de saúde pública baseadas em dados ambientais e genéticos, melhorando a detecção precoce e a resposta a surtos.

O avanço das técnicas de epidemiologia molecular e modelagem de nicho ecológico tem revolucionado o estudo da PCM, permitindo uma compreensão mais detalhada da sua distribuição, fatores de risco e diversidade genética. O uso dessas ferramentas fornece informações críticas para a prevenção e controle da doença. À medida que novas tecnologias continuam a evoluir, espera-se que a integração dessas abordagens possibilite um monitoramento mais eficiente da PCM, especialmente em áreas pouco exploradas.

2. JUSTIFICATIVA

Apesar de a PCM ter sido descrita há mais de 100 anos (LUTZ, 1908), ela ainda é pouco conhecida, tanto pela população em geral quanto por muitos profissionais de saúde. Essa falta de conhecimento dificulta o diagnóstico precoce, atrasando o tratamento e prejudicando o prognóstico dos pacientes. No Paraguai, a ausência de estudos detalhados sobre as regiões endêmicas da PCM comprometia o entendimento de sua distribuição geográfica e de seu impacto na saúde pública.

Recentemente incluída na lista de doenças tropicais negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde, a relevância da PCM para a saúde pública permanece subestimada devido à falta de dados epidemiológicos consistentes. Essa lacuna de informações esteve associada, em parte, à ausência de notificação obrigatória da doença no Paraguai e em outros países da América Latina com áreas endêmicas. Como consequência, a prevalência da PCM foi frequentemente subestimada, contribuindo para sua baixa visibilidade como problema de saúde pública.

Apesar de existirem relatos de casos de PCM no Paraguai, ainda não haviam sido realizados estudos abrangentes que explorassem múltiplos isolados do agente etiológico, investigassem suas espécies, analisassem suas relações genéticas com isolados de outros países, bem como características clínicas e epidemiológicas. Além disso, sabia-se pouco sobre a relação entre os isolados paraguaios e os de outras regiões, bem como sobre a ocorrência da doença em animais, como os tatus, reconhecidos como possíveis reservatórios naturais do fungo.

Nesse contexto, a implementação de técnicas moleculares para a identificação das espécies do gênero *Paracoccidioides* e a realização de análises de epidemiologia molecular mostraram-se fundamentais. Essas ferramentas possibilitaram a obtenção de informações inovadoras, ampliando o conhecimento sobre a PCM, contribuindo de forma significativa para

o campo da micologia clínica e fornecendo subsídios relevantes para o desenvolvimento de estratégias de saúde pública.

Este estudo buscou preencher essas lacunas de conhecimento existentes por meio da identificação molecular das espécies que circulam no Paraguai. A pesquisa realizada não apenas representou um avanço científico no país, como também constituiu uma contribuição importante para a compreensão da PCM na América Latina.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

-Descrever os aspectos epidemiológicos e moleculares da PCM com base nos casos registrados no Centro de Especialidades Dermatológicas do Paraguai.

3.2 Objetivos específicos

-Identificar as características clínicas e epidemiológicas dos casos diagnosticados de PCM no Centro de Especialidades Dermatológicas.

-Analisar a distribuição geográfica e prevalência da PCM no Paraguai mediante o georreferenciamento das localidades de residência dos casos registrados no Centro de Especialidades Dermatológicas e no Laboratório Central de Saúde Pública.

- Realizar a modelagem de nicho ecológico (MNE) para prever a distribuição geográfica potencial de *Paracoccidioides* no Paraguai, utilizando o método de *Random Forest Modeling*.

-Conhecer a diversidade genômica sobre as espécies de *Paracoccidioides* no Paraguai através de sequenciamento completo do genoma, análises filogenéticas e genéticas de populações e caracterização morfológica.

-Comparar os genótipos observados no Paraguai com os observados em outros países da América Latina, principalmente os que fazem fronteira com o Paraguai como Brasil, Argentina e Bolívia.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Laboratório Central de Saúde Pública do Paraguai (código de dictamen Nro. 255-2024), seguindo as diretrizes éticas nacionais e internacionais, incluindo a Declaração de Helsinque e as recomendações da

Organização Pan-Americana da Saúde (OPS) e da Organização Mundial da Saúde (OMS) (Mundial, A. M. 2013 ; CIOMS, 2016). Os dados foram anonimizados para realização dos estudos, garantindo a confidencialidade e seu uso exclusivo para fins científicos.

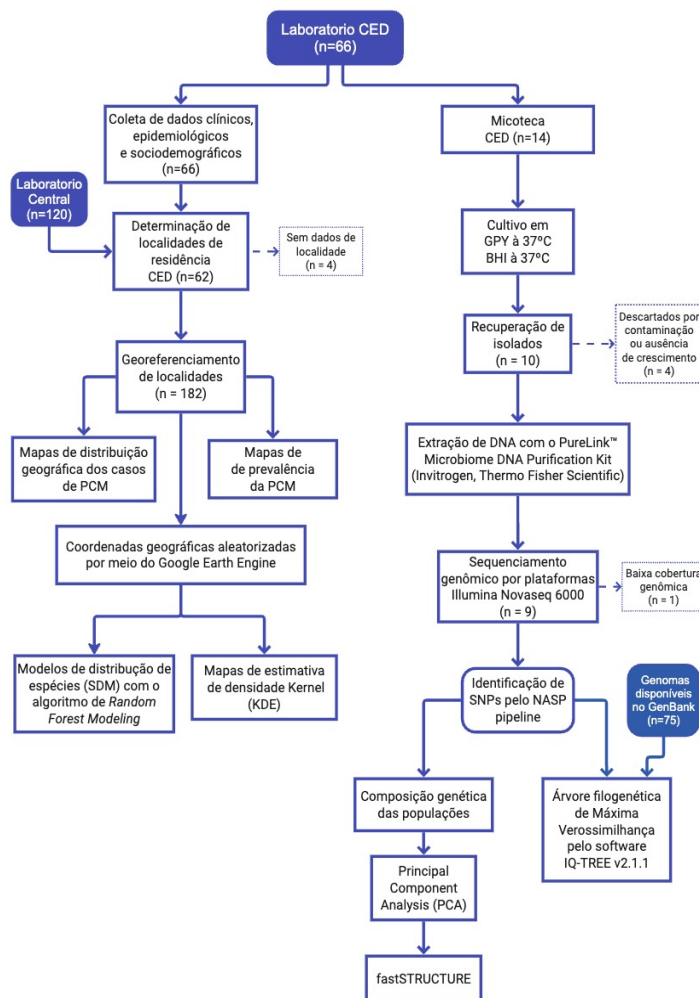


Figura 10. Fluxograma do processo de trabalho: Extração de Dados, Elaboração de Mapas, Recuperação, Extração e Análises Genéticas de Isolados de *Paracoccidioides* sp. O fluxograma descreve o processo de trabalho realizado, iniciando com a extração de dados dos prontuários, seguido pela recuperação de isolados, extração de DNA e análises filogenéticas e de genética populacional de 9 genomas de *Paracoccidioides* sp. provenientes da micoteca do CED San Lorenzo-Central. A recuperação dos isolados foi conduzida em meios de cultura GPY e BHI, totalizando 14 amostras. Destas, 10 amostras viáveis foram submetidas à extração de DNA, com subsequente sequenciamento genômico de 9 amostras. Para as análises de bioinformática, os genomas dos isolados do CED foram comparados com outros 75 genomas de *Paracoccidioides* sp. disponíveis em estudos publicados, incluindo a identificação de SNPs (Polimorfismos de Nucleotídeo Único) e a inferência filogenética. O processo também abrangeu etapas de georeferenciamento, modelagem de distribuição de espécies e análises da composição genética das populações, proporcionando uma visão abrangente da diversidade e distribuição genética dos isolados estudados.

4.2 Coleta de dados clínicos e sociodemográficos de pacientes com paracoccidioidomicose no CED.

O estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Centro de Especialidades Dermatológicas (CED), que atua como centro de referência em micologia para diagnóstico de PCM no sistema público de saúde do Paraguai. Esta etapa foi desenvolvida como um estudo

retrospectivo, utilizando dados extraídos de prontuários médicos, tanto físicos quanto eletrônicos, de pacientes diagnosticados com PCM entre 2014 e 2024.

Os casos clínicos foram diagnosticados seguindo as diretrizes brasileiras para o manejo da PCM. As biópsias foram primeiramente pré-tratadas com gentamicina, antes de prosseguir para os testes microbiológicos, que incluíram a observação microscópica e o cultivo fúngico. O exame direto das biópsias ou biofluidos envolveu a visualização de células leveduriformes com múltiplos brotamentos sob microscópio de luz, utilizando KOH a 10%, identificando células de levedura (4–40 µm) com parede espessa e refringente e formações características de brotamento, lembrando uma "roda de piloto" ou a aparência de "Mickey Mouse". O cultivo fúngico foi realizado em ágar Infusão Cérebro-Coração (BHI) suplementado com 10% de sangue de ovelha, incubado a 37°C de 10 a 20 dias, resultando em colônias de levedura do tipo cerebriforme. Além disso, o material foi semeado em ágar Sabouraud (SAB) a 28°C e 37°C por 15 a 30 dias.

As informações clínicas, epidemiológicas e sociodemográficas foram organizadas em uma planilha do programa Microsoft Excel, versão 16.94. Os dados registrados incluíram o hospital de origem do caso, o ano do diagnóstico, idade, sexo biológico, ocupação, distrito de residência, forma clínica da doença, órgão afetado, presença de envolvimento pulmonar, localização e tempo de evolução da lesão, histórico de tabagismo, consumo de álcool, coinfeções, comorbidades e detalhes do tratamento, incluindo dose e duração.

4.3 Georreferenciamento

Os dados referentes ao local de residência dos casos de PCM, obtidos a partir dos registros do CED, foram complementados com a inclusão de casos de PCM diagnosticados entre 2004 a 2014 no Laboratório Central de Saúde Pública do Paraguai (LCSP). Esse conjunto de dados foi utilizado para a elaboração de três tipos de mapas: **a)** Mapas de distribuição geográfica dos casos de PCM no Paraguai, representados por município e estado, gerados por meio do *software* QGIS versão 3.36.3 **b)** Mapas de prevalência da PCM no Paraguai, gerados no QGIS versão 3.36.3. A prevalência foi calculada como a razão entre o número de casos por estado e a população total, multiplicada por 100.000 habitantes **c)** Mapas de estimativa de densidade Kernel (KDE) foram desenvolvidos no QGIS versão 3.36, com o objetivo de identificar áreas de maior concentração da doença. Esses mapas estão relacionados com as ecorregiões do Paraguai, cujos arquivos no formato shapefile foram solicitados através do Portal Unificado de Acesso à Informação Pública do Paraguai

(<https://informacionpublica.paraguay.gov.py/#!/>), sob o número de solicitação Solicitud Nro.: 89337. A solicitação foi respondida pelo Ministério do Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável (MADES), por meio da Direção de Geomática, que emitiu um memorando com a referência Prov. Geo N° 15/2025 e disponibilizou os arquivos via e-mail. As coordenadas geográficas correspondes ao local de residência, seja em nível distrital ou estadual, foram aleatorizadas dentro do estado correspondente por meio da função *randomPoints* do Google Earth Engine (GORELICK et al., 2017). Amostras sem informações geográficas foram excluídas da análise.

4.4 Recuperação dos isolados clínicos de *Paracoccidioides* sp. da micoteca do CED

Da micoteca do CED, tivemos acesso a 14 isolados. Esta etapa foi realizada no laboratório de Nível de Biossegurança 2 (BSL2). Para recuperar esses isolados, utilizamos alças de inoculação estéreis para transferir uma porção das colônias para dois meios de cultura, tanto líquidos quanto sólidos: Infusão Cérebro-Coração (BHI) e Extrato de Glicose-Peptonas-Extrato de Levedura (GPY). As placas contendo o meio sólido foram incubadas a 37°C por 20 dias, enquanto os tubos com o meio líquido foram mantidos em um agitador a 37°C por 20 dias, ajustados para uma rotação de 150 rotações por minuto (RPM).

O controle de crescimento e contaminação foi realizado por meio de observação microscópica, utilizando lâminas coradas com azul de lactofenol, permitindo a visualização das estruturas morfológicas características, conforme previamente descrito. Esse procedimento garantiu que as colônias isoladas fossem identificadas corretamente, sem contaminação. Quatro isolados foram descartados devido à ausência de crescimento ou à presença de contaminação.

As colônias foram repicadas até o isolamento de uma colônia com biomassa suficiente de *Paracoccidioides* sp. para uma extração eficaz de ácido desoxirribonucleico (ADN), seguida de sequenciamento genômico, identificação de SNPs e análises filogenéticas e genéticas de populações.

4.5 Extração de DNA dos isolados clínicos de *Paracoccidioides* spp.

O procedimento de purificação do DNA teve início com uma etapa de pré-tratamento da amostra devido à espessa parede celular do fungo, o que exigiu a aplicação de ruptura mecânica para garantir uma lise celular eficiente. A amostra foi manipulada sob condições assépticas, em uma cabine de segurança biológica Classe II, onde aproximadamente 500 mg de material leveduriforme fúngico foram cuidadosamente transferidos, utilizando uma alça de

inoculação estéril, para um pilão e almofariz pré-resfriados. A amostra foi então submetida à ruptura mecânica e, em seguida, à maceração criogênica com nitrogênio líquido, promovendo a quebra celular eficaz e resultando em um pó homogêneo e finamente triturado. O material fúngico processado foi transferido para um tubo microcentrífugo estéril de 1,5 mL, dando continuidade à extração do DNA genômico.

A purificação do DNA foi realizada utilizando o kit PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), seguindo as especificações do fabricante, porém com uma modificação na etapa de eluição, reduzindo o volume de 100 µL para 50 µL, a fim de obter uma maior concentração de material genético do fungo.

Ao final do processo, 50 µL de DNA puro de cada isolado foram devidamente rotulados e armazenados a -20°C para análises moleculares posteriores.

4.6 Sequenciamento genômico e genotipagem dos isolados clínicos de *Paracoccidioides* spp.

A concentração e pureza do DNA foram avaliadas utilizando um espectrofotômetro NanoDrop® 1000 (Thermo Fisher Scientific), por meio da medição da absorbância a 260/280 nm, garantindo a integridade ideal dos ácidos nucleicos. A integridade dos DNAs extraídos foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1%. Para a confirmação molecular da presença de *Paracoccidioides* spp., foi realizada uma reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), direcionada ao gene *Pb27*, que possui um tamanho de 157 pares de base (pb) e é exclusivamente expresso por espécimes do gênero *Paracoccidioides*. A amplificação foi conduzida utilizando os seguintes oligonucleotídeos: *Primer forward* (Pb255): 5'-GCACACCATTCCTCGCATACA-3', *Primer reverse* (Pb411): 5'-TTTGACCTTCTGACCGTTGA-3' e *Sonda Para-FAM*: 5'-TGACTACCAAAGCTGGCCGCA-3' (fluoróforo FAM com *quencher* não fluorescente). O protocolo seguiu as diretrizes validadas descritas por Rocha Silva et al. (2017) e as reações foram conduzidas em um termociclador BIO-RAD CFX-96 *Touch Real-Time PCR Detection System*.

O sequenciamento do genoma completo (WGS) foi realizado para avaliar a variação genômica entre as cepas de *Paracoccidioides*. As bibliotecas de sequenciamento de nove cepas do Paraguai foram preparadas utilizando 1 µg de DNA genômico de alta qualidade, seguindo o protocolo do KAPA HyperPrep Library Preparation Kit (Roche, Basel, Suíça) para plataformas de sequenciamento Illumina®. Cada biblioteca foi indexada com códigos de barras

nucleotídicos exclusivos de 8 pb, e a concentração final das bibliotecas foi quantificada utilizando o KAPA Library Quantification Kit (Kapa Biosystems) em um sistema de PCR em tempo real 7900HT (Life Technologies). As bibliotecas foram então submetidas ao sequenciamento *paired-end* com um comprimento de leitura de 250 pb, utilizando a química v3 ou v4 no sistema Illumina NovaSeq 6000 (Illumina, San Diego, CA), garantindo alta profundidade de sequenciamento e precisão.

Para caracterizar a variabilidade genética das cepas circulantes no Paraguai e regiões vizinhas, os nove genomas recém-sequenciados de *Paracoccidioides* foram comparados com 75 genomas disponíveis publicamente (MUÑOZ et al., 2016a; TEIXEIRA et al., 2020). Utilizamos a cepa *Paracoccidioides lutzii* Pb01 como genoma de referência (GenBank ABKH000000000.1). A identificação de polimorfismos de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs) foi realizada utilizando o *Northern Arizona SNP Pipeline* (NASP) (SAHL et al., 2016), garantindo um rigoroso processamento dos dados e detecção de variantes. Inicialmente, as sequências de adaptadores e bases de baixa qualidade foram removidas utilizando Trimmomatic v0.36. As leituras filtradas foram alinhadas ao genoma de referência Pb01 utilizando o *Burrows-Wheeler Aligner* (BWA) v0.7.7, garantindo um mapeamento de alta fidelidade. Para refinar a detecção de variantes, o realinhamento de indels foi realizado utilizando os módulos *RealignerTargetCreator* e *IndelRealigner* do Genome Analysis Toolkit (GATK) v3.3-0. A chamada de SNPs foi conduzida utilizando o GATK *UnifiedGenotyper*, empregando parâmetros de filtragem rigorosos estabelecidos para espécies de *Paracoccidioides* (TEIXEIRA et al., 2020) $QD \geq 2.0$, $FS \leq 60.0$, $MQ \geq 30.0$, $MQ_Rank_Sum \geq -12.5$ e $Read_Pos_Rank_Sum \geq -8.0$. Para minimizar variantes falso-positivas, os sítios de SNP com cobertura inferior a $10\times$ em todas as amostras ou que excediam o percentil 99 da distribuição de cobertura genômica foram excluídos, eliminando possíveis artefatos de duplicação.

Para inferir as relações evolutivas entre as cepas de *Paracoccidioides*, uma árvore filogenética de máxima verossimilhança (*Maximum Likelihood*, ML) foi construída utilizando IQ-TREE2 (Nguyen et al., 2015) com SNPs de alta confiança. O modelo de substituição ideal foi selecionado automaticamente pelo *ModelFinder* (-m TEST), que avalia múltiplos modelos e os classifica de acordo com o Critério de Informação Bayesiano (BIC). O suporte dos ramos foi avaliado por meio da aproximação de *bootstrap* ultrarrápida (*UFBoot*) com 1.000 réplicas (-B 1000) e do teste de razão de verossimilhança aproximada (*aLRT*) com 1.000 réplicas (-alrt 1000) para fornecer robustez estatística. A transformação Bayesiana do teste SH-aLRT (*aBayes*) foi adicionalmente aplicada para melhorar a estimativa da confiança dos ramos. O

cálculo paralelo foi realizado utilizando a versão *multi-threaded* (MPI) do IQ-TREE2 com otimização automática de CPU (-T AUTO) para aumentar a eficiência computacional. A árvore filogenética resultante foi visualizada e anotada utilizando FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Para melhor caracterizar a estrutura populacional de *P. brasiliensis*, analisamos um subconjunto de SNPs de alta confiança específicos para essa espécie. Uma Análise de Coordenadas Principais (*Principal Coordinate Analysis*, PCA) foi realizada utilizando o pacote *Adegenet* (JOMBART; BATEMAN, 2008) no R, permitindo a visualização da variação genética entre os isolados com base em distâncias genéticas euclidianas. Para delinear ainda mais a subestrutura populacional, aplicamos o *fastSTRUCTURE* (RAJ; STEPHENS; PRITCHARD, 2014), um algoritmo Bayesiano de agrupamento que estima probabilidades de atribuição populacional e proporções de mistura. O número ótimo de grupos genéticos (K) foi determinado utilizando a função *chooseK.py*, que identifica a complexidade do modelo que melhor explica a estrutura populacional.

4.7 Comparação das áreas das células

As imagens microscópicas das lâminas preparadas para cada isolado foram obtidas utilizando o microscópio *Zeiss Primo Star* Trinocular acoplado à câmera AxioCAM ERc5s. Subsequentemente, as imagens foram processadas no *software* Zen ZEISS, onde foi inserida uma escala de 50 μm (Figura 11) para a posterior quantificação da área celular por meio do *software* ImageJ. Os dados obtidos foram analisados no GraphPad Prism (versão 10.3.1) para a construção do gráfico de pontos (Dot Plot) com barra de erros.

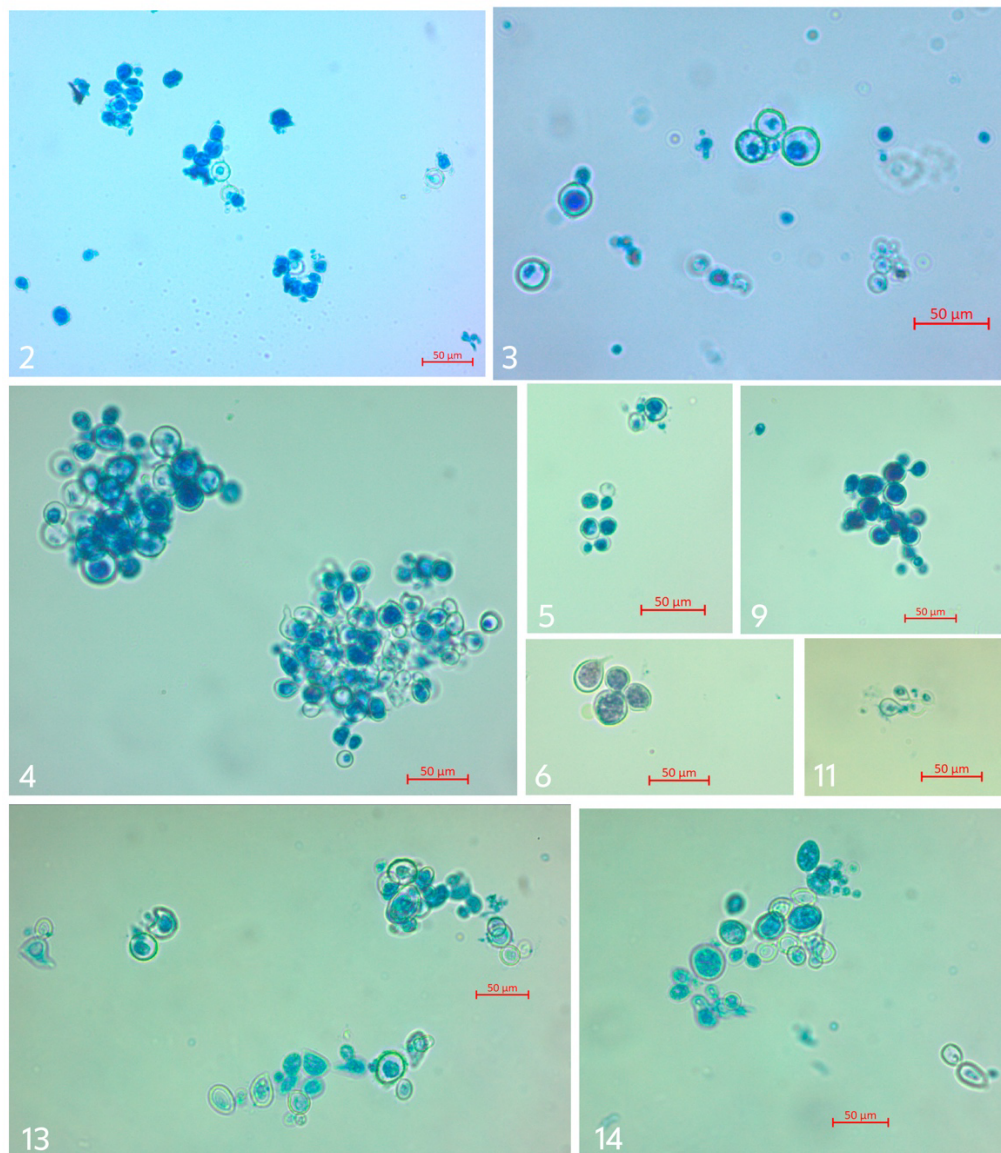


Figura 11. Mosaico de imagens representativas obtidas por microscopia para cada isolado fúngico analisado.

Fonte: O autor.

4.8 Modelamento de nicho ecológico de *Paracoccidioides*

As coordenadas geográficas dos distritos e estados das amostras clínicas, disponíveis nos registros do CED e LCSP, foram obtidas por meio do *Google Earth* totalizando 182 entradas. Amostras com metadados detalhados, contendo a localização exata do hospital, foram classificadas como de alta confiança e inseridas no *raster* do perímetro urbano com suas coordenadas precisas. O *raster* é um formato geoespacial que representa informações do terreno em uma estrutura matricial, onde cada célula contém valores associados a características ambientais, como elevação ou temperatura.

Para amostras com dados (n= 182), os pontos foram aleatorizados dentro dos respectivos estados utilizando o *Google Earth Engine* (GORELICK et al., 2017) e a função *randomPoints*. Já as amostras sem qualquer informação geográfica foram excluídas da análise de Kernel e do modelamento de distribuição de espécies. As informações de presença geográfica foram obtidas a partir do centro médico onde cada caso foi identificado.

A modelagem da distribuição potencial de *Paracoccidioides* foi realizada utilizando o algoritmo *Random Forest*, um método de aprendizado de máquina baseado em múltiplas árvores de decisão. O modelo foi treinado com variáveis ambientais (como temperatura, precipitação, tipo de solo e vegetação) e dados de presença confirmada do patógeno. A probabilidade de ocorrência foi estimada em uma escala contínua de 0 a 1, onde valores próximos a 1 indicam áreas com condições ambientais altamente favoráveis à presença do fungo. Para a construção dos mapas preditivos, os dados foram divididos em conjunto de treino e teste, e a acurácia do modelo foi avaliada por métricas como erro fora da amostra (*out-of-bag error*) e AUC (*area under the curve*). Os resultados finais foram representados em mapas rasterizados, destacando as áreas de maior risco para a presença do fungo.

5. RESULTADOS

5.1 Estudo retrospectivo da paracoccidioidomicose no CED

O estudo retrospectivo identificou 66 casos de PCM no CED. O diagnóstico foi realizado por microscopia direta e cultivo, com confirmação documentada no período de 2014 a 2024. Os dados resumidos do estudo retrospectivo encontram-se na Tabela 1. A análise dos prontuários médicos revelou que os casos foram encaminhados por diferentes instituições de saúde. Do total, 19,7% (13/66) dos pacientes foram atendidos diretamente no CED, enquanto 43,9% (29/66) foram encaminhados pelo Hospital de Clínicas.

Os demais casos tiveram origem nas seguintes instituições: Hospital Nacional de Itauguá (HNI) (10,6%; 7/66), Instituto de Medicina Tropical (IMT) (6,1%; 4/66), Hospital Menonita Km 81 (1,5%; 1/66), Hospital Pediátrico "Niños de Acosta Ñu" (1,5%; 1/66), Hospital Regional de Encarnación (1,5%; 1/66), Hospital Regional de Coronel Oviedo (1,5%; 1/66), Instituto Nacional do Câncer (INCAN) (1,5%; 1/66), Instituto de Previsão Social (IPS) (1,5%; 1/66), Instituto Nacional de Doenças Respiratórias e do Meio Ambiente Juan Max Boettner (INERAM) (1,5%; 1/66), Laboratório Central de Saúde Pública (LCSP) (1,5%; 1/66), Hospital de Lambaré (1,5%; 1/66) e Serviço Nacional de Erradicação da Malária (SENEPA)

(1,5%; 1/66). Em contrapartida, em 4,5% (3/66) dos casos, a instituição de origem não foi informada.

Todos os pacientes tiveram o sexo biológico registrado, observando-se uma predominância de homens, com 64 casos masculinos (97,0%) e apenas 2 femininos (3,0%). Entre 2020 e 2022, foi observado um aumento significativo na detecção de casos, principalmente no sexo masculino, enquanto os casos no sexo femininos permaneceram escassos, com apenas dois registrados: um em 2021 e outro em 2024, conforme ilustrado na Figura 12.

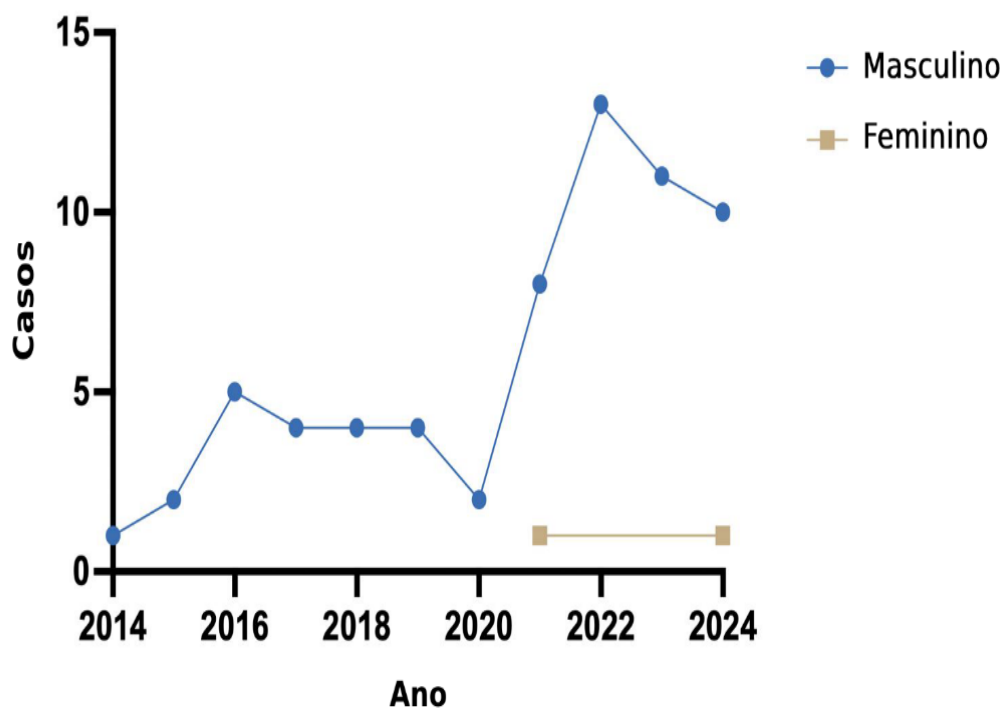


Figura 12. Número de casos de paracoccidioidomicose (PCM) por ano e sexo biológico no CED (2014–2024). A linha azul representa os casos do sexo masculino, enquanto a linha laranja indica os casos do sexo feminino.

Quanto à ocupação dos pacientes, as informações estavam disponíveis para 95,5% (63/66) dos casos de PCM. Em 4,5% (3/66) dos casos, a informação foi classificada como não informado (N/I). Os trabalhadores do setor agrícola representaram 69,7% (46/66) dos casos, sendo o grupo mais afetado. O segundo grupo mais atingido foi o dos trabalhadores da construção civil, correspondendo a 10,6% (7/66). Outras ocupações, incluindo carpinteiros, domésticas, vendedores, nutricionistas, aposentados, motoristas e estudantes, representaram coletivamente 15,2% (10/66) (Figura 13).

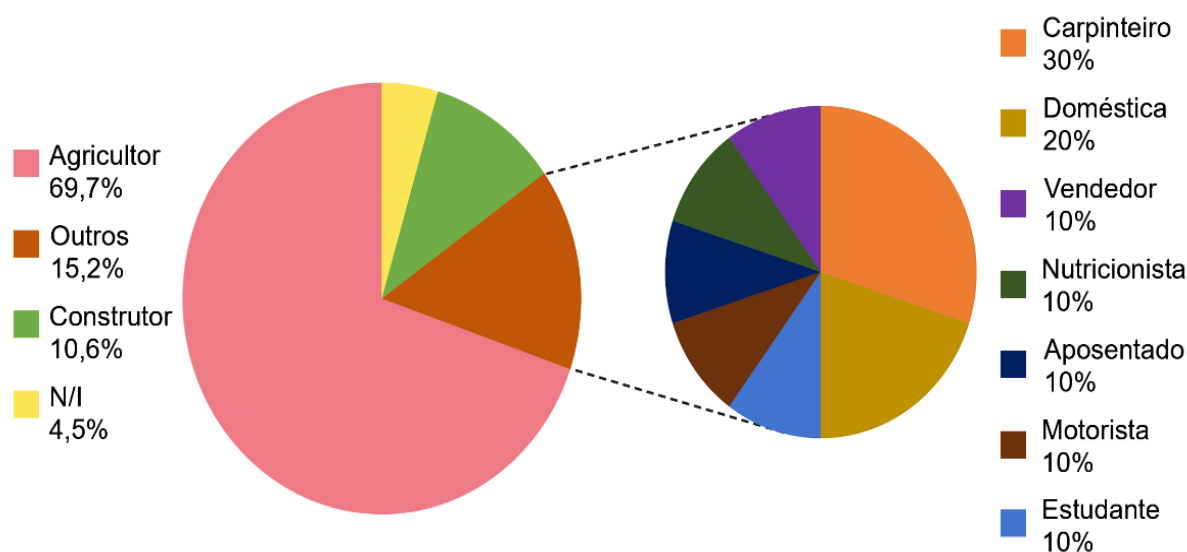


Figura 13. Perfil ocupacional dos pacientes com paracoccidioomicose atendidos entre 2014 e 2024, no CED. O gráfico apresenta as ocupações mais frequentes entre os pacientes, com destaque para a agricultura, que representa 70% dos casos. Em menor porção, estão dispostas as demais ocupações, englobando atividades variadas, como carpintaria, serviços domésticos, vendas e outras profissões.

A idade média no momento do diagnóstico de PCM foi de 56 anos, sendo 15 anos a menor idade registrada e 78 anos a maior. Três pacientes não apresentavam dados de idade registrados. A maioria dos pacientes se encontraram da faixa etária 40 de 79 anos (Tabela 2).

No que se refere aos órgãos afetados, os pulmões foram os mais frequentemente envolvidos (54 casos), seguidos pelas mucosas (36 casos) e pela pele (23 casos). No contexto das lesões cutâneas, localizações pouco frequentes, como lesões no pé, foram relatadas em 11 casos. Além disso, no grupo de outros órgãos afetados (7 casos), foram documentadas manifestações atípicas, incluindo abscessos cerebrais (2 casos), infecção ganglionar (2 casos), envolvimento renal (1 caso), doença gastrointestinal (1 caso), hipertrofia adrenal (1 caso) e insuficiência adrenal (1 caso). Cinco pacientes não tiveram informações registradas sobre os órgãos afetados (Tabela 2).

Tabela 2. Dados sociodemográficos dos casos de paracoccidioidomicose (n=66), diagnosticados no CED de 2014 a 2024.

Idade	Sexo biológico			Formas Clínicas			Órgãos Afetados				
	Feminino	Masculino	N/I	Aguda	Crônica	N/I	Pulmões	Mucosas	Pele	Outros órgãos	N/I
Faixa etária (anos)											
0-19	-	1	-	1	-	-	-	-	1	1	-
20-39	-	4	-	-	4	-	4	-	3	-	-
40-59	-	30	-	-	30	-	24	19	11	3	2
60-79	2	26	-	-	28	-	26	17	8	3	-
N/I	-	3	-	-	-	3	-	-	-	-	3
*Total	2 (3,0%)	64 (97,0%)	-	1 (1,5%)	62 (94,0%)	3 (4,4%)	54 (82%)	36 (55%)	23 (35%)	7 (11%)	5 (8%)

N/I = Não informado

Fonte: prontuários médicos do CED.

* As porcentagens estão calculadas com respeito ao número total de casos n=66.

Os medicamentos empregados no tratamento incluíram itraconazol, anfotericina B (nas formulações lipossomal e desoxicolato) e sulfametoxazol-trimetoprim (TMP-SMX), com variações nas doses e durações dos regimes terapêuticos. O itraconazol foi administrado predominantemente na dose de 200 mg/dia, com durações que variaram entre 6 e 12 meses. Em 60% dos casos, a duração do tratamento foi de até 6 meses, enquanto em 40%, o tratamento estendeu-se por até 12 meses. Em um caso, observou-se o uso de doses mais elevadas (400 mg/dia) por um período inicial de um mês, seguido de redução para 200 mg/dia por 11 meses como terapia de manutenção. Em outro caso de dose inicial de 400 mg/dia por 2 meses, houve redução progressiva da dose, iniciando com 200 mg/dia por 6 meses e, posteriormente, 100 mg/dia por 4 meses.

A anfotericina B, foi utilizada em uma dose acumulada de 1,5 g, seguida de consolidação com itraconazol 200 mg/dia por períodos que variaram entre 6 e 12 meses. Em um caso, registrou-se a combinação de anfotericina B lipossomal, itraconazol 200 mg/dia por 6 meses e TMP-SMX (160/800 mg/dia) também por 6 meses. No entanto, em 9 casos, não houve descrição detalhada do tipo de tratamento administrado.

5.2 Georreferenciamento

Os dados sobre o local de residência dos casos de PCM foram inicialmente obtidos a partir dos registros do CED, abrangendo o período de 2014 a 2024 (N=66). No entanto, quatro casos foram excluídos devido à ausência de informações sobre a localidade, resultando em um total de 62 casos (N=62). Posteriormente, esses dados foram complementados com 120 casos

adicionais diagnosticados entre 2004 e 2014 no Laboratório Central de Saúde Pública do Paraguai (LCSP) (N=120). Assim, o conjunto total de dados sobre a localidade dos casos foi de 182 (N=182), referentes ao período de 2004 a 2024.

Em termos político-administrativos, o Paraguai está dividido em 17 estados e o Distrito Capital, Assunção. Dos 17 estados que compõem o Paraguai, os pacientes analisados eram provenientes de 16 estados, com exceção de *Ñeembucú*, onde não foram registrados casos. O maior número de casos foi identificado no estado de Central (31 casos), seguido por *San Pedro* (28 casos) e *Caaguazú* (25 casos).

Entre os estados com prevalência intermediária, destacam-se *Cordillera* (16 casos), seguido por *Alto Paraná* (11 casos), *Caazapá* (10 casos) e *Paraguarí* (10 casos). *Canindeyú* apresentou (9 casos), enquanto Assunção, *Concepción* e *Guairá* registraram oito casos cada.

Por outro lado, os estados com menor número de casos foram *Amambay* e *Itapúa* com (4 casos) cada, seguidos por *Misiones* (2 casos). O menor registro de casos foi observado nos estados de *Alto Paraguay* e *Boquerón*, com apenas (1 caso) cada.

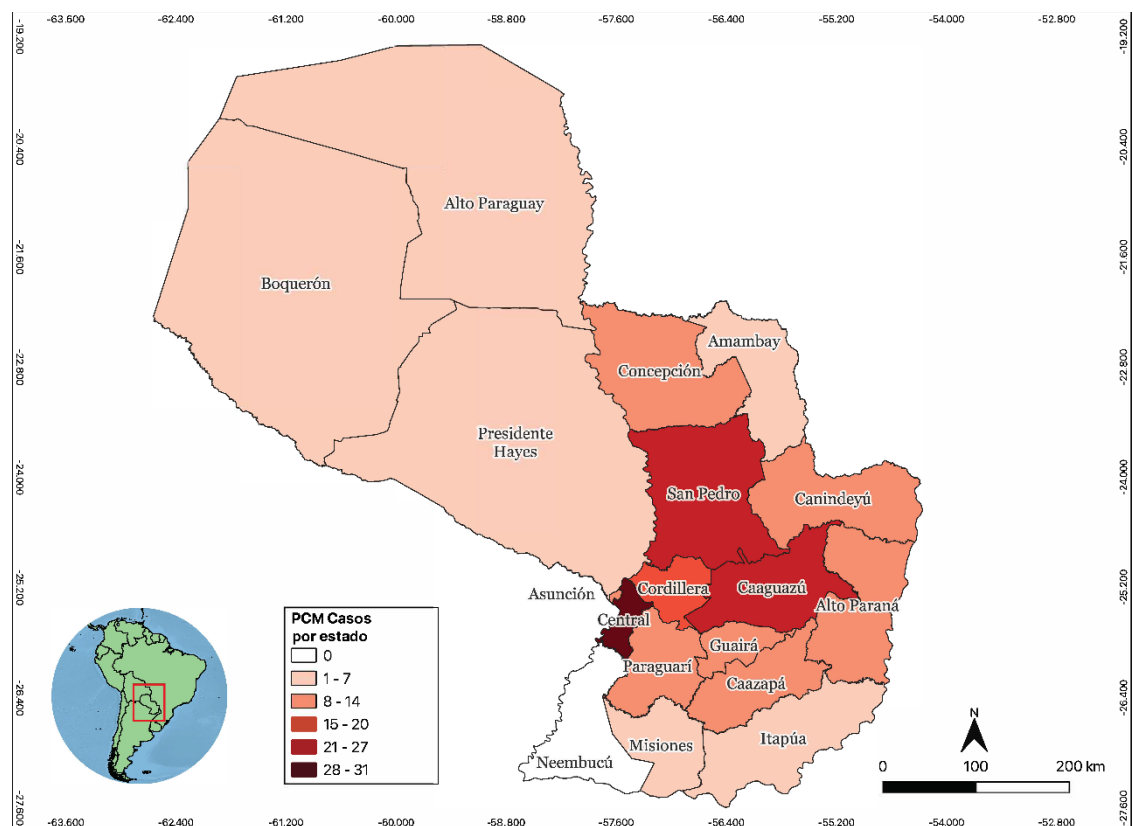


Figura 14. Distribuição geográfica dos casos de paracoccidiodomicose (PCM) por estado no Paraguai. A quantidade de casos varia de 0 a 31, representada por uma escala de cores que vai do branco (zero casos) ao vermelho escuro (máximo de casos registrados).

A prevalência da PCM no Paraguai, representada na Figura 15, variou entre 0,1 e 6,81 casos por 100.000 habitantes. As maiores prevalências foram registradas em *San Pedro* (6,81 casos/100.000 hab), seguido por *Alto Paraguay* (5,38 casos/100.000 hab, *Caazapá* (5,14 casos/100.000 hab), *Cordillera* (5,07 casos/100.000 hab), *Presidente Hayes* (4,61 casos/100.000 hab), *Caaguazú* (4,56 casos/100.000 hab) e *Paraguarí* (4,34 casos/100.000 hab), evidenciando uma elevada concentração de casos nessas regiões.

Os estados de *Canindeyú* (3,76 casos/100.000 hab), *Guairá* (3,48 casos/100.000 hab) e *Concepción* (3,09 casos/100.000 hab) apresentaram prevalências intermediárias, superiores às observadas em grande parte do país.

As menores prevalências foram observadas em *Amambay* (2,29 casos/100.000 hab, *Misiones* (1,54 casos/100.000 hab), *Assunção* (1,53 casos/100.000 hab), *Boquerón* (1,47 casos/100.000 hab) e *Central* (1,38 casos/100.000 hab). Os valores mais baixos ocorreram em *Alto Paraná* (1,31 casos/100.000 hab) e *Itapúa* (0,64 casos/100.000 hab), conforme ilustrado no mapa.

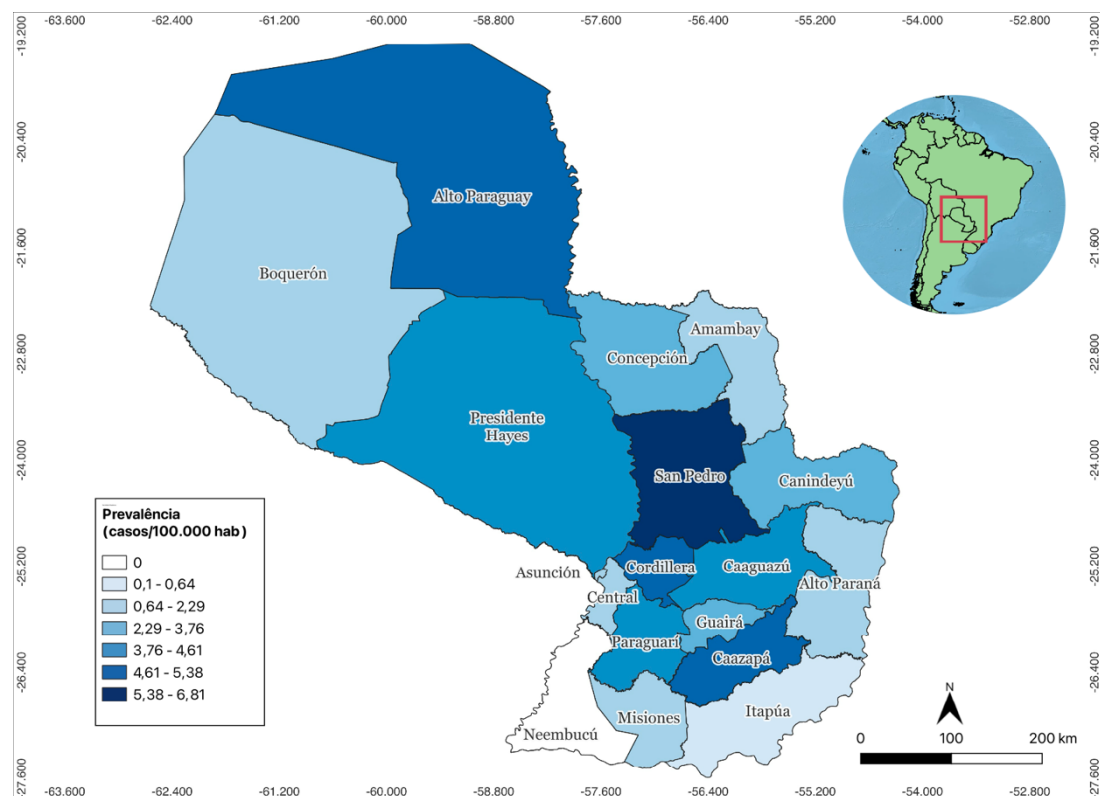


Figura 15. Mapa de prevalência da paracoccidiodomicose (PCM) no Paraguai. As áreas em tons mais escuros de azul indicam uma maior prevalência da doença, enquanto as áreas mais claras representam uma menor prevalência

A análise de densidade estimativa de Kernel revelou distintos padrões espaciais de concentração de casos de PCM no Paraguai, os quais foram associados às ecorregiões do país.

As áreas de alta densidade de casos foram identificadas predominantemente na ecorregião Litoral Central, com uma extensão secundária na região do Chaco Úmido. Regiões de concentração intermediária foram observadas na Selva Central, *Aquidabán*, em uma porção do *Alto Paraná* e em uma área reduzida de *Ñeembucú*.

Por outro lado, as menores densidades de PCM foram registradas nos biomas Chaco Seco, Chaco Úmido e Pantanal, além de pequenas áreas no *Alto Paraná*, *Ñeembucú* e *Amambay*. Não foram observados casos nos biomas Cerrado e *Médanos*.

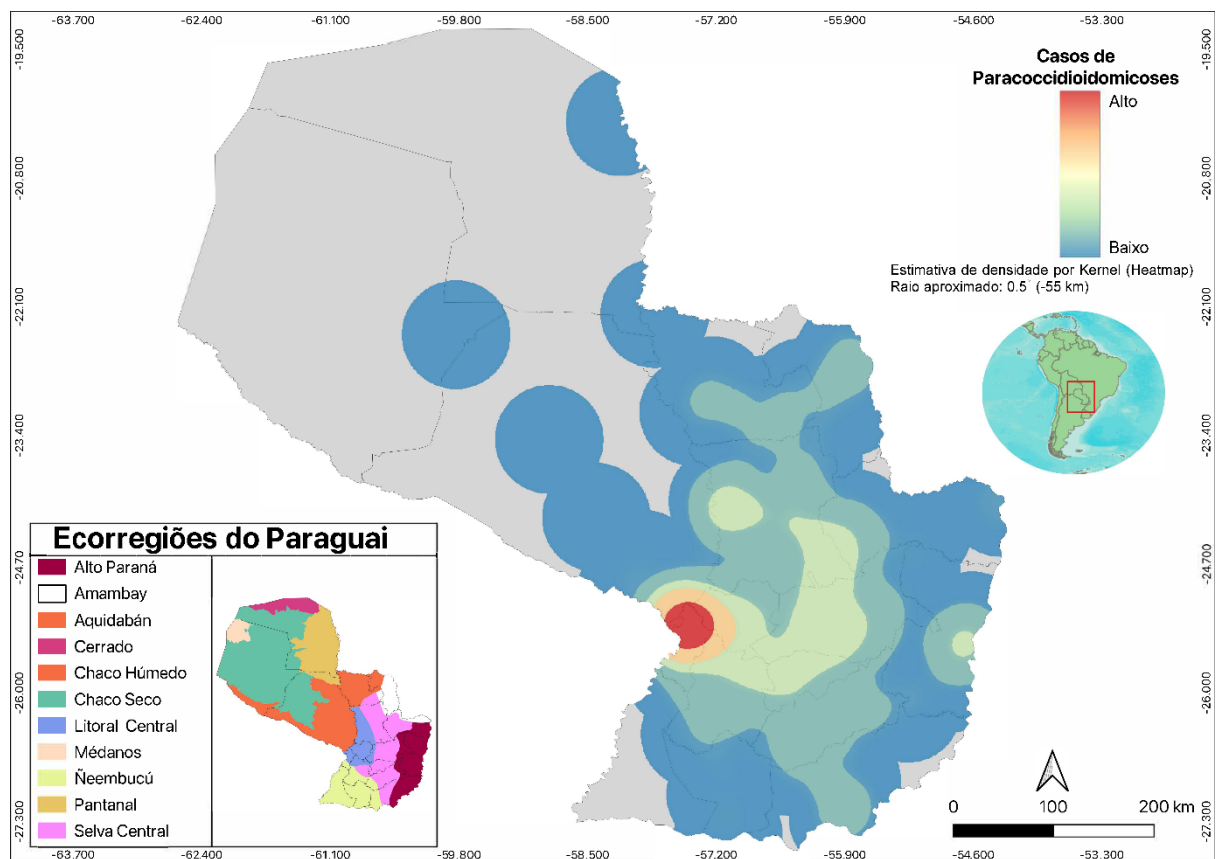


Figura 16. O mapa ilustra a distribuição espacial dos casos de paracoccidiodomicose (PCM) no Paraguai, utilizando a técnica de Estimativa de Densidade de Kernel (KDE). A técnica foi aplicada com um raio de suavização de 0,5° (aproximadamente 55 km), o que permite uma visualização detalhada dos padrões de distribuição da doença. As áreas em tons de vermelho e laranja indicam uma alta concentração de casos, enquanto as áreas em verde e azul representam regiões com menor densidade de ocorrência. No canto inferior esquerdo, é apresentado um mapa complementar das ecorregiões do Paraguai.

A modelagem de nicho ecológico sugere uma distribuição espacial heterogênea da PCM no Paraguai. A maior probabilidade de ocorrência concentra-se na Região *Oriental* do país, com destaque para os estados de *San Pedro*, *Caaguazú*, *Cordillera*, *Central*, *Caazapá*, *Canindeyú* e *Guairá*, enquanto os estados de *Alto Paraná*, *Itapúa*, *Misiones*, *Ñeembucú* e *Concepción* apresentam uma probabilidade intermediária. Em contrapartida, a Região *Occidental*, correspondente ao Chaco Paraguaio e abrangendo os estados de *Boquerón*, *Alto*

2 apresenta os resultados da quantificação e pureza do DNA extraído dos isolados de *Paracoccidioides*, obtidos por meio de qPCR e espectrofotometria. As amostras foram avaliadas quanto à concentração de DNA (ng/μL), aos índices de pureza (A260/280 e A260/230) e aos valores de Ct (Ciclo Limiar, do inglês *Threshold Cycle*), obtidos na qPCR.

Todos os isolados apresentaram curva de amplificação na PCR, com valores de Ct variando entre 16 (isolados 4, 6 e 11) e 33 (isolado 12). A concentração de DNA variou entre 11,0 ng/μL (isolado 9) e 104,9 ng/μL (isolado 2), indicando uma ampla variação na quantidade de DNA extraído entre os isolados. Os índices de pureza A260/280 variaram de 1,35 (isolado 5) a 1,83 (isolado 9). O intervalo ideal para este índice é de 1,8 a 2,0, e a maioria das amostras apresentou valores próximos ao ideal, com exceção do isolado 5, que apresentou um valor significativamente abaixo do esperado. Os índices A260/230 variaram de 0,54 (isolado 5) a 7,68 (isolado 9), sendo o intervalo ideal de 2,0 a 2,2. Todos os isolados apresentaram valores fora desse intervalo, indicando a possível presença de contaminantes orgânicos. Além disso, a integridade do DNA extraído foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose. A maioria das amostras apresentou integridade adequada, com exceção do isolado 12, que demonstrou baixa cobertura genômica e, por isso, foi excluído das análises subsequentes.

Tabela 3. Quantificação e pureza do DNA extraído de isolados de *Paracoccidioides* por qPCR e Espectrofotometria.

Isolado	qPCR		Quantificação	
	Ct	ng/ uL	A260/280	A260/230
2	18	104,9	1,45	0,55
3	18	35,8	1,66	1,85
4	16	88,2	1,73	1,27
5	25	35,8	1,35	0,54
6	16	79,3	1,73	1,19
9	20	11,0	1,83	7,68
11	16	78,0	1,73	1,22
12	33	28,8	1,76	2,59
13	20	17,6	1,68	0,87
14	18	42,5	1,64	0,99

Ct= Ciclo Limiar (*Threshold Cycle*), ng/uL= nanogramas por microlitro.

Dos genomas incluídos na árvore filogenética, nove correspondem a isolados clínicos do Paraguai, analisados neste estudo e denominados como PbPy11, PbPy13, PbPy2, PbPy3, PbPy9, PbPy5, PbPy4, PbPy14 e PbPy6, destacados em vermelho na Figura 18. Os demais genomas utilizados para a construção da árvore filogenética correspondem a dados previamente publicados em outros estudos e disponíveis no *GenBank*.

A análise filogenética revelou que, dos nove genomas de isolados clínicos paraguaios, seis agruparam-se ao genótipo S1B (PbPy3, PbPy9, PbPy5, PbPy4, PbPy14, PbPy6), dois ao genótipo S1A (PbPy11, PbPy13), enquanto o genoma PbPy2 posicionou-se de forma intermediária entre os genótipos S1A e S1B. Além disso, foi possível identificar a formação de subgrupos dentro do genótipo S1B, nos quais os genomas paraguaios agruparam-se distintamente dos genomas argentinos, que formaram um subgrupo separado. Essa distinção evidencia um forte isolamento filogeográfico entre as populações analisadas.



Figura 18. Árvore filogenética de nove isolados de *Paracoccidioides* do Paraguai. A árvore filogenética foi construída pelo método de máxima verossimilhança, considerando a relação evolutiva entre os genomas analisados. Os ramos são proporcionais ao número de mutações, os nós da árvore filogenética representam os ancestrais comuns, enquanto os pontos de ramificação indicam eventos de especiação e divergência entre as linhagens. As extremidades das ramificações correspondem aos isolados de *Paracoccidioides*, cuja origem geográfica foi identificada e destacada em diferentes cores, refletindo os agrupamentos genéticos observados. As denominações dos genomas do Paraguai estão destacados em vermelho.

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada para verificar a composição populacional dos genomas de *P. brasiliensis* a partir da variação genética. A composição populacional foi calculada por meio da Análise de Coordenadas Principais (PCA) a fim de

avaliar a distribuição populacional dos mesmos conjuntos de dados com base na variação genética distribuída entre duas coordenadas, PC1 e PC2.

O gráfico resultante é composto por dois eixos principais: o eixo X, que representa o primeiro componente principal (PC1), e o eixo Y, correspondente ao segundo componente principal (PC2). A maior parte da variação genética observada é explicada pelo primeiro componente principal (PC1), que representa 67% da variação total e separa os isolados dos grupos S1A e S1B. O segundo componente principal (PC2) contribui com 5,8% da variação observada, relativa a variação intra populacional. Os pontos no gráfico representam os genomas analisados. A partir destes, é possível observar a formação de dois agrupamentos principais, que correspondem aos genótipos S1A e S1B. Entretanto, os genomas ao centro, destacados com um asterisco vermelho (T19F291, T20B131, Pb113 e PbPy2), apresentam características genotípicas diferenciadas em comparação aos demais genomas, com mistura de genótipos S1A e S1B. Logo, a nomenclatura S1A/S1B foi atribuída à esses isolados (Figura 19).

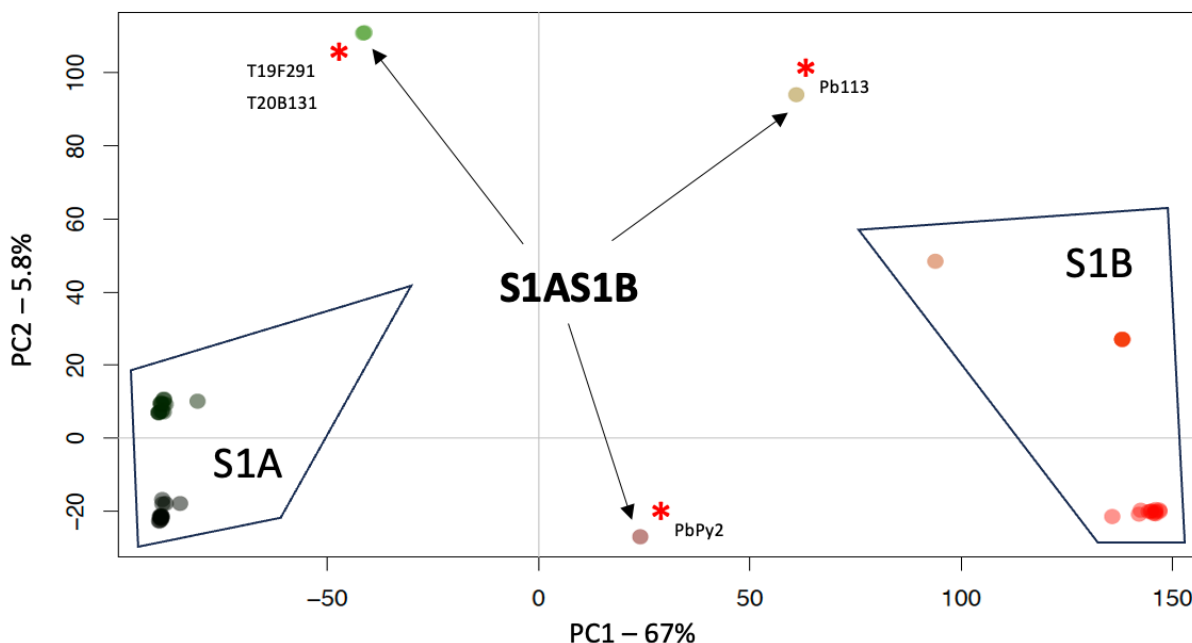


Figura 19. Análise de componentes principais (PCA) da distribuição dos genótipos S1A, S1B e S1A/S1B. O eixo X (PC1) explica 67% da variação genética entre as populações, enquanto o eixo Y (PC2) explica apenas 5,8% dessa variação. Os agrupamentos principais são destacados por áreas delimitadas, permitindo uma visualização clara da separação entre os genótipos. Além disso, isolados de transição ou atípicos aparecem dispersos entre os grupos principais, indicando variações genômicas que não se ajustam perfeitamente a nenhum dos grupos definidos.

Para validar os agrupamentos previamente observados nas análises filogenéticas e de PCA, e investigar a possível existência de populações crípticas dentro dos genótipos S1A e S1B, realizamos uma inferência da estrutura populacional utilizando o *software*

fastSTRUCTURE. O gráfico resultante é composto por dois eixos: o eixo X, que representa os genomas analisados, e o eixo Y, que indica a proporção de ancestralidade genética. A análise revela a presença de dois genótipos principais: S1A (representado pela cor cinza) e S1B (representado pela cor vermelha). Cada barra no gráfico corresponde a um genoma, com a proporção de cores refletindo o grau de ancestralidade genética associada a cada grupo. Os isolados T20B131, T19F29, PbPy2 e Pb113 destacados com asteriscos, apresentam padrões genéticos distintos, caracterizados por uma mistura dos dois genótipos (Figura 20).

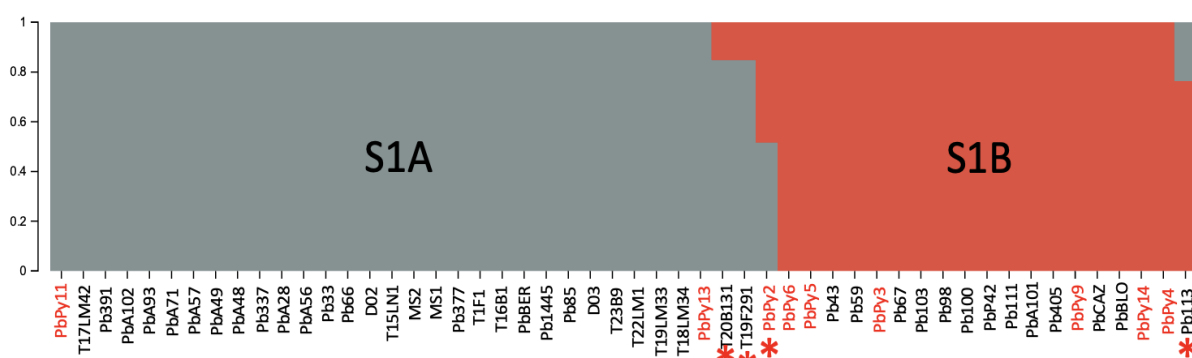


Figura 20. Análise da estrutura populacional dos genomas de *Paracoccidioides* spp. utilizando o *software* *FASTSTRUCTURE*. A figura, gerada pelo *software* *FASTSTRUCTURE*, foi construída com base em variantes genéticas do tipo SNPs (Polimorfismos de Nucleotídeo Único). No eixo X, os genomas analisados são representados, com destaque em vermelho para os genomas de origem paraguaia e com asteriscos para aqueles que apresentaram padrões genéticos distintos. No eixo Y, as barras coloridas ilustram a distribuição da ancestralidade genética, sendo cinza para o genótipo S1A e vermelho para o genótipo S1B.

Além da distribuição dos casos, foi realizada uma correlação entre os isolados clínicos e suas respectivas localidades, uma vez que esses isolados são provenientes dos casos incluídos no estudo retrospectivo. Permitindo estabelecer uma relação entre a ocorrência da doença e a diversidade genética de *Paracoccidioides*. A análise da distribuição geográfica dos casos de PCM revelou que, dos 261 distritos do Paraguai, 86 registraram casos da doença. Nesta ocasião, observou-se que a maior concentração de casos ocorre nas regiões central e *Oriental* do país, com destaque para os seguintes distritos: Assunção (oito casos), *San Pedro del Ycuamandiyú* (sete casos), Cidade del Este (seis casos), *Luque* (seis casos), *Caaguazú* (cinco casos), *Curuguaty* (cinco casos) e *San Estanislao* (cinco casos).

Entre os distritos com quatro casos cada, destacam-se: *Capiatá*, *Lambaré* e *Pedro Juan Caballero*. Seguem-se, com três casos cada, os distritos de *Encarnación*, *Limpio*, *San Lorenzo*, *Villarrica*, *Villeta* e *Yuty*. Com dois casos cada, foram registrados: *Altos*, *Benjamín Aceval*, *Caacupé*, *Caapucú*, *Caazapá*, *Capiibary*, *Carayaó*, *Choré*, *Fernando de la Mora*, *Hernandarias*, *Horqueta*, *Itá*, *Jasy Kañy*, *Paso Barreto*, *Repatriación*, *Salto del Guairá*, *San*

Juan Nepomuceno, Santa Rosa del Aguaray, Santa Rosa del Mbutuy, Valenzuela, Villa Hayes e Yby Yaú.

Por fim, os distritos com 1 caso cada incluem: *Antequera, Arroyos y Esteros, Atyrá, Ayolas, Bahía Negra, Caragatatay, Coronel Martínez, Coronel Oviedo, Cruce Liberación, Doctor Raúl Peña, Emboscada, Escobar, Eusebio Ayala, General Isidro Resquín, Hohenau, Independencia, Itacurubí de la Cordillera, Itakyry, Itapé, Itauguá, Iturbe, Juan de Mena, La Colmena, Liberación, Loma Plata, Ñemby, Piribebuy, Puerto Falcón, Quiindy, Raúl A. Oviedo, Río Verde, San Ignacio, San José Obrero, San Lázaro, San Roque González, Sapucaí, Simón Bolívar, Tacuatí, Tavaí, Tembiaporã, Vaquería, Villa del Rosario, Ybycuí, Yhu, Ypacaraí, Ypané e Yrybucú.*

A tipagem dos genomas revelou a seguinte distribuição geográfica nos diferentes distritos: o isolado 2, correspondente ao genótipo híbrido S1A/S1B, foi detectado em *Santa Rosa del Mbutuy*; enquanto os isolados 9, 5, 14 e 4, pertencentes ao genótipo S1B, foram identificados nos distritos de *San Pedro del Ycuamandiyú, General Isidro Resquín, San Estanislao e Villa del Rosario*, respectivamente. Esses distritos estão localizados em áreas próximas à região noroeste da Argentina, sugerindo uma possível conexão geográfica e influência genética entre essas zonas.

Por outro lado, o isolado 13, classificado como S1A, foi encontrado em *Pedro Juan Caballero*, próximo ao estado de Mato Grosso do Sul (Brasil), o que está em conformidade com a filogeografia proposta para esse genótipo. Esses resultados evidenciam a circulação de diferentes variantes genéticas em áreas geograficamente próximas, sugerindo a coexistência de múltiplos genótipos em uma mesma região (Figura 21).

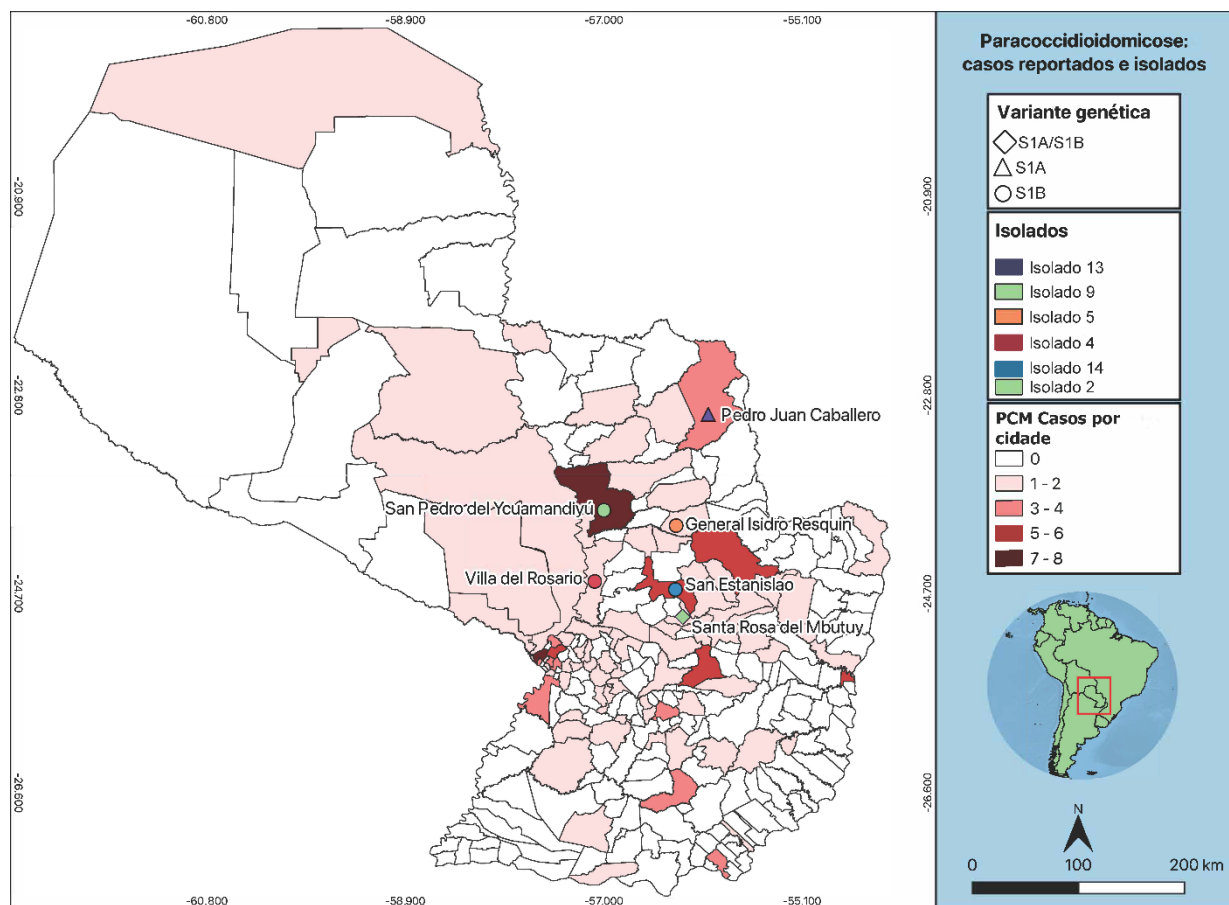


Figura 21. Distribuição geográfica por distrito dos casos de paracoccidioidomicose (PCM) e dos isolados genotipados no Paraguai. A intensidade da coloração vermelha indica o número de casos por distrito, variando de 1 a ≥ 8 que permite identificar as áreas com maiores números de casos reportados da doença. Além disso, os isolados genotipados são representados por círculos coloridos, de acordo com seu genótipo: Isolados 9, 5, 14 e 4: Genótipo S1B. Isolado 2: Genótipo S1A/S1B. Isolado 13: Genótipo S1A.

5.4 Comparação da área de células leveduriformes

A Figura 22 apresenta as áreas médias das células leveduriformes dos isolados analisados, expressas em micrômetros quadrados (μm^2). No eixo vertical, os valores das áreas são representados em uma escala que se estende até $1000 \mu\text{m}^2$, enquanto, no eixo horizontal, os números “11, 13, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 14” correspondem aos isolados, classificados conforme os genótipos: S1A (isolados 11 e 13), S1A/S1B (isolado 2) e S1B (isolados 3, 4, 5, 6, 9 e 14), com cada genótipo identificado por uma cor distinta.

Os valores médios das áreas celulares obtidos foram os seguintes: o isolado 11 apresentou $312,077 \mu\text{m}^2$; o isolado 13, $427,416 \mu\text{m}^2$; o isolado 2, $258,4275 \mu\text{m}^2$; o isolado 3, $381,298 \mu\text{m}^2$; o isolado 4, $408,252 \mu\text{m}^2$; o isolado 5, $197,774 \mu\text{m}^2$; o isolado 6, $567,0705 \mu\text{m}^2$; o isolado 9, $491,002 \mu\text{m}^2$; e o isolado 14, $501,924 \mu\text{m}^2$. A comparação entre as médias das áreas celulares dos genótipos foi realizada por meio do teste Nested One-Way ANOVA, e os valores de $p > 0,05$, indicaram a ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os isolados.

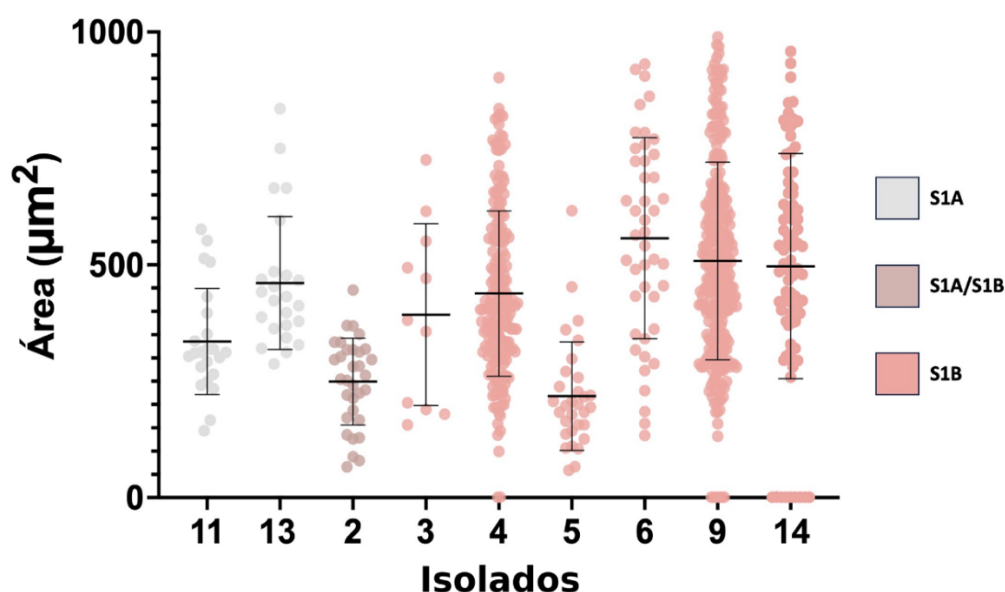


Figura 22. Variação das áreas das células leveduriformes em genótipos de *Paracoccidioides brasiliensis*. O gráfico foi gerado através do programa GraphPad Prism v. 10.3.1. Os genótipos estão destacados por cores distintas, sendo cinza para S1A, marrom para S1A/S1B e vermelho para S1B.

6. DISCUSSÃO

A PCM foi descrita pela primeira vez no Paraguai em 1935, sob a denominação de *granuloma coccidióidico* (BOGGINO et al., 1935). Desde então, até 2023, um total de 479 casos foram documentados na literatura científica do país, conforme revisão sistemática (ARAÚJO et al., 2024). Neste estudo, ampliamos o número total de casos registrados, detectando 66 casos no CED, e analisamos as principais características clínico-epidemiológicas da PCM no Paraguai. Complementarmente, elaboramos mapas da distribuição geográfica dos casos, mapas de estimativa de densidade de Kernel, estimamos a densidade de prevalência da doença e aplicamos modelagem de nicho ecológico por meio do algoritmo *Random Forest* para avaliar potenciais áreas de ocorrência. Além disso, realizamos a primeira investigação de epidemiologia molecular no país, baseada na caracterização genética de nove isolados clínicos.

O estudo retrospectivo realizado no CED identificou 66 casos de PCM ao longo de um período de 10 anos (2014-2024). Observou-se que a maioria dos casos foi registrado em homens (97,0%), com idade entre 40 e 70 anos. Em contrapartida, o número de casos em mulheres foi significativamente menor, com apenas dois casos observados (3,0%) (Figura 12), um padrão amplamente descrito na literatura e consistente com a epidemiologia da PCM em países de alta prevalência, como Brasil, Venezuela, Colômbia e Argentina. (ALVARADO et al., 2021; GIUSIANO et al., 2023; KRAKHECKE-TEIXEIRA et al., 2022; SANABRIA PEÑA et al.,

2018). Os dois casos reportados no sexo feminino corresponderam a mulheres em idade pós-menopáusia (acima de 60 anos). Esse achado está alinhado com uma das possíveis razões para o menor número de casos em mulheres, conforme indicado por estudos prévios, os quais sugerem que os estrogênios exercem um efeito protetor durante o período reprodutivo, inibindo a transição fúngica do *Paracoccidioides* para sua forma patogênica (ARISTIZABAL et al., 1998; RESTREPO et al., 1984; SALAZAR; RESTREPO; STEVENS, 1988; SHANKAR et al., 2011). Em apoio a essa hipótese, estudos sugerem que, em mulheres pós-menopáusicas, a redução nos níveis de estrogênio pode elevar a suscetibilidade à PCM (ALMEIDA; JACKS; SCULLY, 2003; KOEHLER et al., 2022).

Outro aspecto relevante observado na Figura 12 foi a diminuição na detecção de casos de PCM em 2020, coincidindo com o período da pandemia de COVID-19. Nesse contexto, o Paraguai declarou quarentena total em março de 2020, conforme estabelecido no Decreto N° 3442 (“Ministerio de Trabajo, Empleo y Seguridad Social :: Decreto N° 3442/2020”) o que limitou o acesso da população aos serviços de saúde para diagnósticos de rotina ou investigação de doenças não relacionadas à COVID-19. Além disso, os recursos hospitalares e laboratoriais foram redirecionados prioritariamente para o enfrentamento da pandemia, resultando em uma possível subnotificação de outras doenças. Outro fator importante é que os sintomas da PCM, , podem ter sido confundidos com as manifestações pulmonares da COVID-19, levando a um atraso ou ausência de diagnóstico específico (GIUSIANO et al., 2024; MESSINA; GIUSIANO; SANTISO, 2022).

Além disso o aumento do número de casos de PCM depois do 2020, A partir desse ano, observou-se um crescimento na detecção de casos de PCM no CED, fato que pode estar associado à estruturação de uma unidade de biologia molecular no laboratório do CED (“*Diario HOY | Habilitan nuevo laboratorio de biología molecular que ayudará a procesar más pruebas de COVID-19*”, [s.d.]). Essa implementação foi impulsionada pelas demandas da pandemia, resultando na ampliação do número de profissionais e no incremento de amostras recebidas de outros centros de saúde.

Além disso, o dano pulmonar associado à COVID-19, combinado com o uso de terapias imunossupressoras no tratamento de suas complicações, pode ter favorecido a manifestação clínica da PCM em indivíduos com infecções fúngicas latentes, conforme relatado em outras micoses endêmicas, como a Histoplasmose (DE MACEDO et al., 2021, 2023).

A maior parte dos casos de PCM incluídos no estudo retrospectivo (43,9%; 29/66) foi encaminhada pelo *Hospital de Clínicas*, enquanto 19,7% (13/66) receberam atendimento diretamente no CED. Os demais casos foram provenientes de outras instituições, como o HNI (10,6%; 7/66), o IMT (6,1%; 4/66) e outras unidades de saúde, cada uma representando 1,5% (1/66) dos casos. Todas essas instituições estão localizadas no estado Central, o que pode explicar a maior concentração de casos registrados nessa região, conforme ilustrado na Figura 14.

Em relação à análise geográfica dos casos por estado, como evidenciado na Figura 14, observou-se a maior concentração de casos no estado Central (31 casos). Embora essa região apresente condições ambientais favoráveis à endemicidade da PCM, não é uma área predominantemente agrícola. No entanto, devido à natureza crônica da doença, é possível que muitos pacientes tenham adquirido a infecção em zonas rurais e migrado posteriormente para áreas urbanas, o que pode retardar a manifestação dos sintomas (MARTINEZ, 2017). A migração interna é um fenômeno comum no Paraguai, impulsionado por fatores como oportunidades de trabalho, melhores condições de vida e acesso a serviços de saúde, o que pode explicar o maior número de casos registrados nesse estado (GALEANO, 2020; GALEANO et al., 2017).

Em segundo e terceiro lugares, os estados de *San Pedro* (28 casos) e *Caaguazú* (25 casos) apresentaram os maiores números de casos. Diferentemente do estado Central, essas regiões correspondem predominantemente a áreas rurais. Entre os estados com prevalência intermediária, destacam-se *Cordillera* (16 casos), seguido por *Alto Paraná* (11 casos), *Caazapá* (10 casos) e *Paraguarí* (10 casos). *Canindeyú* apresentou 9 casos, enquanto Assunção, *Concepción* e *Guairá* registraram oito casos cada, que também são áreas rurais com exceção do distrito capital Assunção. Por outro lado, os estados com menor número de casos foram *Amambay* e *Itapúa*, com 4 casos cada, seguidos por *Misiones* (2 casos). Essas regiões possuem características ambientais e ocupacionais propícias à transmissão da PCM, incluindo um clima favorável e o predomínio de atividades agrícolas (TORRES, 2005).

O menor registro de casos foi observado nos departamentos de Alto Paraguai e *Boquerón*, com apenas um caso cada, os quais correspondem à região ocidental, também conhecida como Chaco. O Chaco caracteriza-se por precipitações escassas e sazonais, temperaturas elevadas, solos salinos e uma disponibilidade quase nula de água subterrânea. Esses fatores impõem limitações significativas à produção agropecuária e ao estabelecimento

populacional, resultando em uma ocupação humana reduzida na região, devido às restrições naturais e à escassez de infraestrutura (TORRES, 2005).

Consistente com o fato de as regiões de populações agrícolas apresentarem o maior número de casos reportados, a ocupação predominante dos pacientes foi a de agricultor (69,7%), seguida pela de construtor (10,6%). As demais ocupações representaram, no total, 15,2% dos casos. Esses dados evidenciam que a exposição ocupacional permanece um fator de risco significativo como já esta bem estabelecido na literatura (BARROZO et al., 2009). Como as atividades agrícolas incluem a movimentação do solo, elas propiciam a dispersão de conídios infecciosos que, quando inalados, podem resultar em infecção por *Paracoccidioides* (CHAVES et al., 2021).

No Paraguai, a corroboração da associação entre a doença e fatores ocupacionais de risco é de suma importância, uma vez que a agricultura, principal atividade econômica do setor primário no país, representa aproximadamente 7,7% do Produto Interno Bruto (PIB) (“Anexo Estadístico del Informe Económico - BCP - Banco Central del Paraguay”).

Outra possível explicação para a diferença na prevalência da PCM entre os sexos é que as atividades agrícolas, são majoritariamente desempenhadas por homens, com uma participação significativamente menor de mulheres. Esse é um fator comportamental e ambiental a ser considerado, uma vez que estudos sugerem que o papel protetor do estrogênio não deve ser considerado como único fator explicativo, pois não é suficiente para justificar completamente a menor prevalência da doença em mulheres (DE BRITO et al., 2021).

A forma clínica crônica foi a mais frequentemente relatada, representando (82%) dos casos. Apenas um caso da forma aguda foi identificado, em um paciente de 15 anos. O comprometimento pulmonar foi a manifestação clínica mais comum, seguido pelo envolvimento de mucosas (55%) e pele (35%), em concordância com a literatura, que descreve o envolvimento pulmonar como a principal característica da PCM (QUEIROZ-TELLES; ESCUISSATO, 2011). No caso agudo, não houve envolvimento pulmonar, mas o paciente apresentou lesões cutâneas e acometimento renal e gastrointestinal. Esses achados são compatíveis com a literatura, que indica que a forma aguda raramente compromete os pulmões, enquanto pode envolver outros órgãos (HAHN et al., 2022).

Na forma crônica, observaram-se dois casos com abscessos cerebrais, um caso de hipertrofia renal e um caso de insuficiência da glândula adrenal. Dentre as lesões cutâneas, destaca-se o envolvimento dos pés em sete pacientes. Esses achados ressaltam o amplo espectro

clínico da PCM e a importância de reconhecer formas atípicas para um diagnóstico e tratamento precoces (BELLISSIMO-RODRIGUES et al., 2013).

Quanto ao regime de antifúngicos empregado, o itraconazol, predominantemente na dose de 200 mg/dia, constitui a principal opção terapêutica, com duração variável entre 6 e 12 meses, dependendo da gravidade do quadro clínico e da resposta ao tratamento. O uso de doses mais elevadas (400 mg/dia) por curtos períodos, seguido de redução para a dose de manutenção, foi a segunda estratégia terapêutica mais adotada concordante com o regimen adotado em outros estudos (AQUINO., 2006).

Por sua vez, a anfotericina B foi empregada em casos de maior gravidade, sendo administrada em uma dose acumulada de 1,5 g. Após essa fase inicial, o tratamento foi complementado com itraconazol na etapa de consolidação. Essa abordagem difere de outros estudos, nos quais foi utilizada uma dose acumulada de 2 g de anfotericina B, evidenciando variações nos protocolos terapêuticos conforme o contexto clínico e as diretrizes adotadas (ROLÓN-LOPEZ et al., 2023). Adicionalmente, a associação com trimetoprima-sulfametoxazol (TMP-SMX) foi descrita como uma terceira alternativa terapêutica, um regime que está em concordância com os protocolos adotados em outros estudos (PEÇANHA et al., 2016).

A análise da prevalência da paracoccidioidomicose (PCM) no Paraguai evidenciou uma distribuição espacial heterogênea entre os estados do país, conforme ilustrado na Figura 15. As maiores taxas de prevalência foram registradas em regiões com intensa atividade agrícola, como San Pedro (6,81 casos/100.000 habitantes), Caazapá (5,14), Cordillera (5,07), Caaguazú (4,56) e Paraguarí (4,34). Essas foram seguidas por Canindeyú (3,76) e Guairá (3,48 casos/100.000 habitantes).

Destaca-se que os estados de San Pedro, Caaguazú, Caazapá, Guairá, Canindeyú, Itapúa e Alto Paraná estão entre as principais regiões de produção agrícola do país, com ênfase no cultivo de soja, milho, arroz, trigo e cana-de-açúcar, de acordo com dados oficiais do portal de estatísticas agrícolas do Paraguai (*“Superficie y producción por año agrícola, según cultivo. Periodo 2020 al 2021 | Datos.gov.py”*). A concentração de casos nessas áreas predominantemente rurais reforça a hipótese da associação da PCM a fatores ocupacionais, particularmente ao trabalho agrícola.

No que se refere aos valores de prevalência observados nos estados de Alto Paraguay e Presidente Hayes, é necessário esclarecer que essas regiões concentram apenas cerca de 3% da população total do país. Devido à baixa densidade populacional, mesmo um número absoluto reduzido de casos pode resultar em taxas de prevalência aparentemente elevadas ou intermediárias, como efeito direto da fórmula utilizada (razão entre número de casos e população total). Portanto, tais valores não indicam necessariamente uma alta endemicidade, mas sim um artefato estatístico decorrente da baixa base populacional.

Os resultados da análise de densidade estimativa de Kernel na distribuição de casos de PCM no Paraguai, apresentaram uma clara associação com as ecorregiões do país. A identificação de áreas de alta densidade de casos, concentradas principalmente na ecorregião do Litoral Central e secundariamente no Chaco Úmido, sugere que fatores ambientais e ecológicos específicos dessas regiões podem estar influenciando a ocorrência da doença.

O Litoral Central, caracterizado por sua topografia plana, solos saturados, lagoas, pântanos e florestas úmidas, proporciona um ambiente ideal para a proliferação do fungo *Paracoccidioides*. Já o Chaco Úmido, com suas florestas semidecíduas e solos alagados, também apresenta condições propícias para a dispersão do fungo, embora em menor intensidade.

As regiões com concentração intermediária de casos, como a Selva Central, *Aquidabán*, parte do *Alto Paraná* e uma área reduzida de *Ñeembucú*, reforçam a hipótese de que a PCM está associada a ecorregiões com condições climáticas e geográficas específicas. A Selva Central, com seu relevo acidentado, florestas subtropicais e solos vermelho-amarelados, oferece habitats úmidos e sombreados que podem favorecer a presença do fungo. A *Aquidabán*, com solos arenosos, argilosos e calcários, e vegetação de transição entre florestas e campos, apresenta microambientes úmidos que podem sustentar a ocorrência de *Paracoccidioides*. O *Alto Paraná*, com sua floresta subtropical pluvial e solos basálticos, também possui condições favoráveis, embora a densidade de casos seja menor devido à heterogeneidade do ecossistema. Já *Ñeembucú*, com suas savanas arborizadas e solos hidromórficos, representa uma zona de transição com menor exposição ao patógeno.

Por outro lado, as baixas densidades de casos observadas nos biomas do Chaco Seco, Chaco Úmido, *Pantanal*, *Alto Paraná*, *Ñeembucú* e *Amambay* sugerem que condições ambientais menos favoráveis podem limitar a presença e a dispersão de *Paracoccidioides*. O Chaco Seco, com sua aridez e vegetação aberta, e o Pantanal, com sua sazonalidade e solos

alagados, não oferecem condições ideais para o fungo. O *Amambay*, apesar de sua rica biodiversidade e florestas altas, possui solos arenosos e áreas alagadas que podem não ser propícias para a persistência do patógeno. A ausência de casos nos biomas do Cerrado e Médanos pode ser explicada por fatores como a baixa umidade, a vegetação aberta e a menor atividade agrícola, que reduzem a exposição humana ao fungo.

A modelagem de nicho ecológico realizada para a PCM no Paraguai revelou uma distribuição espacial heterogênea da doença, com padrões que corroboram as observações apresentadas no mapa de densidade de kernel. A maior probabilidade de ocorrência concentra-se na Região Oriental do país, abrangendo estados como *San Pedro*, *Caaguazú*, *Cordillera*, *Central*, *Caazapá*, *Canindeyú* e *Guairá*. Essa distribuição está alinhada com as características ecológicas e ambientais dessa região, que incluem florestas subtropicais úmidas, solos férteis e alta biodiversidade, condições propícias para a proliferação do fungo *Paracoccidioides*.

Os estados de *Alto Paraná*, *Itapúa*, *Misiones*, *Ñeembucú* e *Concepción* apresentam uma probabilidade intermediária de ocorrência da doença. Essas áreas, embora compartilhem algumas características com a Região Oriental, como a presença de florestas úmidas e solos basálticos, podem apresentar menor densidade de casos devido à heterogeneidade de seus ecossistemas. Por exemplo, a ecorregião de *Ñeembucú*, com suas savanas arborizadas e solos hidromórficos, pode não oferecer condições tão favoráveis para o fungo quanto as florestas densas do Litoral Central.

Por outro lado, a Região Occidental, correspondente ao Chaco Paraguaio e abrangendo os estados de *Boquerón*, *Alto Paraguay* e *Presidente Hayes*, demonstra uma probabilidade extremamente baixa de ocorrência da doença. Essa região é caracterizada por climas áridos e semiáridos, vegetação aberta e solos menos férteis, condições que limitam a sobrevivência e dispersão de *Paracoccidioides*. A imagem reflete essa distribuição, mostrando uma clara divisão entre a Região Oriental, com alta probabilidade de ocorrência, e a Região Occidental, com probabilidade próxima a zero.

Esses resultados estão em consonância com as observações da imagem, que destaca a concentração de casos na Região Oriental e a ausência significativa na Região Occidental. A modelagem de nicho ecológico, portanto, não apenas valida os padrões espaciais observados, mas também reforça a importância das características ambientais na distribuição da PCM. A distribuição observada no mapa de Kernel concorda com o *random forest modeling* apresentando uma distribuição muito parecida.

A análise filogenética realizada com nove genomas de isolados clínicos de *Paracoccidioides* do Paraguai, em conjunto com dados previamente publicados e disponíveis no GenBank, revelou padrões relevantes sobre a diversidade genética e a distribuição geográfica do fungo. Dos nove genomas paraguaios analisados, seis agruparam-se ao genótipo S1b (PbPy3, PbPy9, PbPy5, PbPy4, PbPy14, PbPy6), corroborando os achados reportados por (TEIXEIRA et al., 2020) que identificaram a presença do genótipo S1B no Paraguai. Este estudo confirma que o S1B é o genótipo predominante em circulação no país.

Adicionalmente, observou-se a formação de subgrupos dentro do genótipo S1B, nos quais os genomas paraguaios agruparam-se de forma distinta dos genomas argentinos, que constituíram um subgrupo separado. Essa segregação evidencia uma estruturação populacional marcante, sugerindo a existência de um isolamento filogeográfico significativo entre as populações analisadas.

Esse isolamento pode ser interpretado como uma consequência de processos evolutivos que ocorreram ao longo do tempo, nos quais populações inicialmente conectadas tornaram-se isoladas devido a mudanças no ambiente físico, resultando em uma diferenciação genética mais acentuada. Fatores como barreiras geográficas, diferenças ecológicas e climáticas entre as regiões, ou mesmo a adaptação do fungo a condições ambientais específicas de cada área, podem explicar esse padrão. Esses mecanismos reforçam a ideia de que essas populações evoluíram de forma independente, possivelmente impulsionadas por condições ambientais distintas ou eventos históricos que limitaram sua dispersão (THEODORO et al., 2012).

A identificação de subgrupos geneticamente distintos pode ter implicações para a epidemiologia e o manejo da PCM, já que diferentes linhagens podem variar em virulência, patogenicidade ou resposta a tratamentos como e visto com outros fungos como *cândida* spp. (KURAKADO; MATSUMOTO; SUGITA, 2023).

Continuando com as observações da Figura 18, os genomas pertenciam ao genótipo S1A (PbPy11, PbPy13), representando a primeira vez que esse genótipo é reportado no Paraguai. Além disso, o genoma PbPy2 apresentou uma posição intermediária entre os genótipos S1A e S1B. Essa posição sugere que se trata de um genótipo híbrido, conforme reportado por Bagali e colaboradores, onde, na figura, esse isolado agrupou-se com isolados de tatus previamente descritos como híbridos (BAGAGLI et al., 2021). Esse padrão indica uma possível variação genética dentro da espécie, reforçando a complexidade e a diversidade genética de *Paracoccidioides*.

A análise de Componentes Principais (PCA) evidenciou a estrutura populacional de *Paracoccidioides*, destacando a clara separação entre os genótipos S1A e S1B, bem como a presença de genomas com características intermediárias. A formação desses dois agrupamentos principais reflete uma distinção genética significativa entre os genótipos S1A e S1B.

Além disso, destaca a presença dos genomas (T19F291, T20B131, Pb113 e PbPy2), distribuídos de forma intermediária. Esses genomas exibem características genóticas diferenciadas em comparação aos demais, sugerindo uma possível transição ou variação genética entre os genótipos S1A e S1B. Em particular, a posição intermediária de PbPy2 reforça a hipótese de uma linhagem híbrida entre os dois genótipos.

A inferência da estrutura populacional, realizada por meio do *software fastSTRUCTURE*, validou os agrupamentos previamente observados nas análises filogenéticas e de PCA, confirmando a distinção clara entre os genótipos S1A e S1B. Esses resultados corroboram os achados das análises anteriores, reforçando a existência de duas linhagens genéticas principais. No entanto, os isolados T20B131, T19F291, PbPy2 e Pb113, apresentaram padrões genéticos distintos, caracterizados por uma mistura das duas cores. Essas análises permitem inferir que *P. brasiliensis sensu stricto* apresenta genótipos híbridos. Esse fenômeno pode ser resultado de fluxo gênico entre as populações e de adaptação a diferentes condições ambientais.

Estudos morfométricos da fase leveduriforme foram conduzidos para testar a hipótese de que os genótipos de *P. brasiliensis* apresentam diferenças significativas na área das células de levedura, o que permitiria distingui-los. Em um estudo, foram observadas diferenças morfológicas entre as espécies *P. lutzi* e *P. brasiliensis* (TEIXEIRA et al., 2009). No entanto, ao aplicar o mesmo teste em outra ocasião, não foram identificadas diferenças significativas (THEODORO et al., 2012). O gráfico apresenta as áreas médias das células leveduriformes dos isolados analisados, destacando a distribuição das áreas celulares e sua classificação por genótipos. A comparação entre as médias das áreas celulares dos genótipos foi realizada por meio do teste Nested One-Way ANOVA, e valores de $p > 0,05$ indicaram a ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os isolados. A falta de diferenças relevantes sugere que o tamanho das células leveduriformes não é um fator determinante para a distinção entre os genótipos S1A e S1B. Esse achado indica que outras características morfológicas, fisiológicas ou genéticas podem desempenhar um papel mais relevante na diferenciação entre esses genótipos (THEODORO et al., 2012).

A tipagem dos genomas revelou uma distribuição geográfica distinta nos diferentes distritos do Paraguai, destacando a circulação de variantes genéticas de *Paracoccidioides* em áreas próximas. O isolado 2, correspondente ao genótipo híbrido S1A/S1B, foi detectado em *Santa Rosa del Mbutuy*, enquanto os isolados 9, 5, 14 e 4, pertencentes ao genótipo S1B, foram identificados nos distritos de *San Pedro del Ycuamandiyú*, *General Isidro Resquín*, *San Estanislao* e *Villa del Rosario*, respectivamente. Esses distritos estão localizados em áreas próximas à região noroeste da Argentina, sugerindo uma possível conexão geográfica e influência genética entre essas zonas.

Por outro lado, o isolado 13, classificado como S1A, foi encontrado em Pedro Juan Caballero, próximo ao estado de Mato Grosso do Sul (Brasil), o que está em conformidade com a filogeografia proposta para esse genótipo. Esses resultados evidenciam a circulação de diferentes variantes genéticas em áreas geograficamente próximas, sugerindo a coexistência de múltiplos genótipos em uma mesma região, conforme ilustrado na Figura 21.

As limitações deste estudo incluem o delineamento retrospectivo, baseado em prontuários médicos não padronizados, frequentemente manuscritos com caligrafia de difícil leitura ou tinta desbotada, o que compromete a consistência e a completude das informações clínicas. Soma-se a isso a análise de cepas antigas, o número reduzido de amostras disponíveis e a ausência de uma coleta sistemática de isolados em todos os estados, o que dificulta uma representação abrangente da distribuição geográfica do fungo. Além disso, a localização utilizada na elaboração dos mapas baseou-se em pontos aleatórios dentro da cidade ou estado reportado, não necessariamente correspondendo ao local exato de exposição ao fungo, o que resulta em lacunas importantes na interpretação espacial dos dados.

Apesar das limitações, este estudo representa uma abordagem multifacetada, que integra características clínicas, epidemiológicas e demográficas, além do sequenciamento completo do genoma, análises filogenéticas e modelos de distribuição de espécies, para compreender a distribuição de *Paracoccidioides* e caracterizar a doença no Paraguai. Além disso, possibilitou uma compreensão mais abrangente do cenário epidemiológico atual e da diversidade das espécies causadoras da PCM e no América latina.

7. CONCLUSÕES

Neste trabalho, realizamos contribuições relevantes para o entendimento da epidemiologia molecular da paracoccidioidomicose (PCM) no Paraguai, um país historicamente negligenciado nos estudos sobre micoses endêmicas, apesar de sua proximidade com regiões altamente endêmicas da América do Sul. Por meio da análise retrospectiva de prontuários médicos no Centro de Especialidades Dermatológicas (CED), identificamos 66 casos confirmados de PCM entre 2014 e 2024, com predominância em homens adultos, especialmente trabalhadores rurais, evidenciando o forte componente ocupacional da doença. A forma crônica foi a mais prevalente, com frequente comprometimento pulmonar e mucoso.

Utilizando ferramentas de georreferenciamento e análise de densidade de Kernel, mapeamos a distribuição espacial dos casos, revelando áreas com maior concentração na Região Oriental do país, especialmente nos departamentos de San Pedro e Caaguazú, bem como no Chaco Úmido. A modelagem de nicho ecológico (MNE), por meio do algoritmo *Random Forest*, indicou regiões com alta probabilidade de ocorrência do fungo *Paracoccidioides*, corroborando os dados clínico-epidemiológicos e apontando zonas ambientais propícias para a agente etiológico.

Do ponto de vista molecular, realizamos o sequenciamento completo do genoma de nove isolados clínicos, seguido da análise de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e da construção de uma árvore filogenética utilizando o método de Máxima Verossimilhança. Os resultados indicaram a predominância de *Paracoccidioides brasiliensis* S1B no país, além da primeira detecção de *P. brasiliensis* S1A e de um isolado com perfil genético misto S1A/S1B, evidenciando uma diversidade genômica inédita até então no Paraguai. A comparação com genótipos provenientes de países vizinhos, como Brasil e Argentina, permitiu identificar conexões evolutivas e delinear padrões regionais de circulação do patógeno.

Esses achados reforçam a necessidade urgente de fortalecer a vigilância epidemiológica da PCM no Paraguai, implementar estratégias de diagnóstico precoce, capacitar profissionais da saúde e promover a integração de ações regionais para o controle efetivo da doença. Este estudo representa o primeiro esforço sistemático de caracterização epidemiológica e molecular da PCM no país e estabelece uma base sólida para futuras investigações, contribuindo significativamente para o avanço do conhecimento sobre as micoses endêmicas na América do Sul.

8. PERSPECTIVAS

As micoses endêmicas no Paraguai representam um desafio significativo para a saúde pública, exigindo abordagens integradas que considerem os determinantes ambientais, sociais e econômicos envolvidos na sua epidemiologia. A cooperação regional e internacional, bem como a realização de estudos epidemiológicos e clínicos, são essenciais para aprimorar as estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento dessas infecções no país.

A vigilância epidemiológica ativa da paracoccidioidomicose no Paraguai é essencial para a implementação eficaz de estratégias de prevenção e controle. A delimitação de áreas endêmicas, associada a programas de educação em saúde direcionados às populações em situação de risco, pode contribuir significativamente para a redução da prevalência dessas infecções. Ademais, a capacitação contínua de profissionais da saúde para o diagnóstico precoce e o manejo clínico adequado é crucial para minimizar as complicações associadas a essas doenças.

Além dessas ações, destacam-se a publicação de artigos científicos, a apresentação de resultados em congressos e o desenvolvimento de projetos complementares em andamento, voltados ao aprofundamento do conhecimento sobre as micoses endêmicas no Paraguai.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAWAR, M. AL; SRIVASTAVA, A. Random Forest of Epidemiological Models for Influenza Forecasting, 2022.

AJELLO, L.; POLONELLI, L. Imported paracoccidioidomycosis: a public health problem in non-endemic areas. *European journal of epidemiology*, v. 1, n. 3, p. 160–165, set. 1985.

DE ALMEIDA, F. Estudo comparativo do granuloma coccidioidico nos Estados Unidos e no Brasil. *Ann. Fac. med. São Paulo*, 1929, vol. 4, p. 91.

ALMEIDA, O. P.; JACKS, J.; SCULLY, C. Erratum: Paracoccidioidomycosis of the mouth: An emerging deep mycosis (*Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 14, 4, (268-274)). *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, v. 14, n. 5, p. 377–383, 1 set. 2003.

ALMEIDA-PAES, R. et al. Immunologic Diagnosis of Endemic Mycoses. *Journal of Fungi* 2022, Vol. 8, Page 993, v. 8, n. 10, p. 993, 22 set. 2022.

ALVARADO, P. et al. Epidemiology of paracoccidioidomycosis in Venezuela: a retrospective study from 1954 to 2019. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 116, p. e210203, 8 nov. 2021.

ALVES, L. R.; BORGES, C. L.; ALMEIDA, F. Editorial: Global excellence in fungal pathogenesis: Central and South America. 2024.

AMEEN, M.; TALHARI, C.; TALHARI, S. Advances in paracoccidioidomycosis. *Clinical and Experimental Dermatology*, v. 35, n. 6, p. 576–580, 1 ago. 2010.

Anexo Estadístico del Informe Económico - BCP - Banco Central del Paraguay. Disponível em: <<https://www.bcp.gov.py/anexo-estadistico-del-informe-economico-i365>>. Acesso em: 7 mar. 2025.

ARANTES, T. D. et al. Environmental Mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil Reveals New Clues into Genetic Diversity, Biogeography and Wild Host Association. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 4, p. e0004606, 5 abr. 2016.

ARAÚJO, P. et al. Paracoccidioidomicosis detectados en el período 2004-2013 en el Laboratorio Central de Salud Pública de Asunción - Paraguay. *Rev. Nac. (Itaiguá)*, v. 8, n. 2, p. 62–71, 10 dez. 2016.

ASHRAF, N. et al. Re-drawing the Maps for Endemic Mycoses. *Mycopathologia*, v. 185, n. 5, p. 843–865, 1 out. 2020.

BAGAGLI, E. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* Isolated from Nine-Banded Armadillos (*Dasypus novemcinctus*) Reveal Population Structure and Admixture in the Amazon Basin. *Journal of Fungi*, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2021.

BARROZO, L. V. et al. Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil. *International journal of epidemiology*, v. 38, n. 6, p. 1642–1649, 11 maio 2009.

BELLISSIMO-RODRIGUES, F. et al. Endemic paracoccidioidomycosis: relationship between clinical presentation and patients' demographic features. *Medical Mycology*, v. 51, n. 3, p. 313–318, 1 abr. 2013.

BENARD, G. et al. Pathogenesis and Classification of Paracoccidioidomycosis: New Insights From Old Good Stuff. *Open Forum Infectious Diseases*, v. 8, n. 3, p. 1–7, 1 mar. 2021.

BOCCA, A. L. et al. Paracoccidioidomycosis: Eco-Epidemiology, Taxonomy and Clinical and Therapeutic Issues. *Future Microbiology*, v. 8, n. 9, p. 1177–1191, set. 2013.

BONIFAZ TRUJILLO, J. A. Mucormicosis y entomoforomicosis (zigomicosis). *Micología Médica Básica*, p. 399–426, 2012.

BURGER, E. et al. Paracoccidioidomycosis Protective Immunity. *Journal of Fungi* 2021, Vol. 7, Page 137, v. 7, n. 2, p. 137, 13 fev. 2021.

CALICH, V. L. G. et al. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathologia*, v. 165, n. 4–5, p. 223–236, 24 abr. 2008.

CAMACHO, E.; NIÑO-VEGA, G. A. *Paracoccidioides* Spp.: Virulence Factors and Immune-Evasion Strategies. *Mediators of Inflammation*, v. 2017, n. 1, p. 5313691, 1 jan. 2017.

CAMARGO, Z. DE; DE, M. DE F.-R. IBEROAMERICANA; 2000, UNDEFINED. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *reviberoammicol.com*, [s.d.].

CANO, L. E.; RESTREPO, A. Predictive value of serologic tests in the diagnosis and follow-up of patients with paracoccidioidomycosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 29, n. 5, p. 276–283, 1987.

CAPELLA MACHADO, G. et al. Cryptic species of *Paracoccidioides brasiliensis*: impact on paracoccidioidomycosis immunodiagnosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 5, p. 637–643, ago. 2013.

CARRERO, L. L. et al. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal Genetics and Biology*, v. 45, n. 5, p. 605–612, 1 maio 2008.

CAVALCANTE, R. DE S. et al. Comparison between Itraconazole and Cotrimoxazole in the Treatment of Paracoccidioidomycosis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 4, p. e2793, 2014.

CAVALLO, M. et al. Estudio epidemiológico de la paracoccidioidomicosis en la comunidad de Guapa, municipio Andrés Bello, estado Lara, Venezuela, octubre 2001-febrero 2002. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, v. 22, n. 2, p. 158–163, 2002.

CEZAR-DOS-SANTOS, F. et al. *Paracoccidioides restrepiensis* B339 (PS3) and *P. lutzii* LDR2 yeast cells and soluble components display in vitro hemolytic and hemagglutinating activities on human erythrocytes. *Microbiology and Immunology*, v. 62, n. 7, p. 436–443, 1 jul. 2018.

CEZAR-DOS-SANTOS, F. et al. Unraveling the susceptibility of paracoccidioidomycosis: Insights towards the pathogen-immune interplay and immunogenetics. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 86, p. 104586, 1 dez. 2020.

CHAVES, A. F. A. et al. Updates in *Paracoccidioides* Biology and Genetic Advances in Fungus Manipulation. *Journal of Fungi* 2021, Vol. 7, Page 116, v. 7, n. 2, p. 116, 4 fev. 2021.

COCIO, T. A. et al. Characterization of a *Paracoccidioides* spp. strain from southeastern Brazil genotyped as *Paracoccidioides restrepiensis* (PS3) and review of this phylogenetic species. *Genetics and molecular biology*, v. 43, n. 2, p. 1–9, 2020.

COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Medical Mycology*, v. 49, n. 8, p. 785–798, 1 nov. 2011.

CORRESPONDIENTE, A. et al. Paracoccidioidomicosis: tratamento com itraconazol Paracoccidioidomycosis: treatment with itraconazol. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*, v. 4, n. 2, 2006.

CIOMS, C. D. (2016). Pautas éticas internacionales para la investigación relacionada con la salud con seres humanos. Pautas éticas internacionales para la investigación biomédica en seres humanos, 1-136

DA SILVA, J. DE F. et al. 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, 1 jan. 2016.

DAMASCENO, L. S. et al. Trends and patterns of mortality arising from fungal infections in Brazil in a period of 11 years. *Journal of Health & Biological Sciences*, v. 9, n. 1, p. 1–9, 22 nov. 2021.

DE ALMEDIA, S. M. et al. Central nervous system paracoccidioidomycosis: clinical features and laboratorial findings. *Journal of Infection*, v. 48, n. 2, p. 193–198, 1 fev. 2004.

DE ALMEIDA, S. M. et al. Geographical evaluation of Neuroparacoccidioidomycosis and Paracoccidioidomycosis in Southern Brazil. *Mycoses*, v. 61, n. 8, p. 587–593, 1 ago. 2018.

DE ARRUDA GROSSKLAUS, D. et al. Response to oxidative stress in *Paracoccidioides* yeast cells as determined by proteomic analysis. *Microbes and Infection*, v. 15, n. 5, p. 347–364, 1 maio 2013.

DE BRITO, T. G. N. et al. A Case-Control Study of Paracoccidioidomycosis in Women: The Hormonal Protection Revisited. *Journal of Fungi* 2021, Vol. 7, Page 655, v. 7, n. 8, p. 655, 13 ago. 2021.

DE CAMARGO, Z. P. Serology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*, v. 165, n. 4–5, p. 289–302, 24 abr. 2008.

DE MACEDO, P. M. et al. 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, 29 mar. 2017.

DE MACEDO, P. M. et al. Clinical features and genetic background of the sympatric species *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides americana*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 13, n. 4, p. e0007309, 2019.

DE MACEDO, P. M. et al. Acute Pulmonary Histoplasmosis Following COVID-19: Novel Laboratorial Methods Aiding Diagnosis. *Journal of Fungi* 2021, Vol. 7, Page 346, v. 7, n. 5, p. 346, 28 abr. 2021.

DE MACEDO, P. M. et al. COVID-19 in patients with paracoccidioidomycosis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 17, n. 5, p. e0011322, 1 maio 2023.

DE MATOS, W. B. et al. Paracoccidioidomycosis in the state of Maranhão, Brazil: geographical and clinical aspects. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 45, n. 3, p. 385–389, maio 2012.

DE MELO TEIXEIRA, M. et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: Biological and clinical implications. *Medical Mycology*, v. 52, n. 1, p. 19–28, 1 jan. 2014.

DE OLIVEIRA, H. C. et al. *Paracoccidioides*-host interaction: An overview on recent advances in the paracoccidioidomycosis. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, n. NOV, p. 167392, 25 nov. 2015.

DE SOUZA VIANNA, L. M. I. et al. Cytological diagnosis of paracoccidioidomycosis: A report of four cases. *Diagnostic Cytopathology*, v. 41, n. 4, p. 374–376, 1 abr. 2013.

DECLARAÇÃO DE HELSINQUE Associação Médica Mundial - Google Acadêmico. [s.d.].

DEL NEGRO, G. M. B. et al. Lack of reactivity of paracoccidioidomycosis sera in the double immunodiffusion test with the gp43 antigen: report of two cases. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, v. 33, n. 2, p. 113–116, 1 mar. 1995.

Diário HOY | Habilitan nuevo laboratorio de biología molecular que ayudará a procesar más pruebas de COVID-19. Disponível em: <<https://www.hoy.com.py/nacionales/habilitan-nuevo-laboratorio-de-biologia-molecular-que-ayudara-a-procesar-mas-pruebas-de-covid-19/amp>>. Acesso em: 7 mar. 2025.

ENDO, S. et al. Detection of gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *FEMS Microbiology Letters*, v. 234, n. 1, p. 93–97, 1 maio 2004.

ESCOBAR, L. E.; CRAFT, M. E. Advances and limitations of disease biogeography using ecological niche modeling. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, n. AUG, p. 188208, 5 ago. 2016.

EULÁLIO, K. D. et al. Epidemiological, clinical, and genomic landscape of coccidioidomycosis in northeastern Brazil. *Nature Communications* 2024 15:1, v. 15, n. 1, p. 1–11, 12 abr. 2024.

FALCÃO, E. M. M. et al. Rising rates of paracoccidioidomycosis-related hospitalizations and in-hospital deaths, Rio de Janeiro, Brazil (2010–2019). *Medical Mycology*, v. 62, n. 5, 3 maio 2024.

FALCI, D. R.; PASQUALOTTO, A. C. Clinical mycology in Latin America and the Caribbean: A snapshot of diagnostic and therapeutic capabilities. *Mycoses*, v. 62, n. 4, p. 368–373, 1 abr. 2019.

FERNANDEZ, N. B. et al. Proceedings of the second international meeting on endemic mycoses of the Americas (IMEMA) and first international symposium on implantation mycoses (ISIM). *Medical Mycology*, v. 62, n. 7, p. 23, 4 jul. 2024.

FRANCISCO COUTINHO, Z. et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil Palavras-chave Paracoccidioidomicose; Mortalidade; Epidemiologia; Micose Endêmica. v. 18, n. 5, p. 1441–1454, 2002.

FRANCO, M. et al. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Medical Mycology*, v. 38, n. 3, p. 185–191, 2000.

GAVIRIA, M. et al. 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, 1 jul. 2015.

GIUSIANO, G. et al. The Southern Endemic Zone of Paracoccidioidomycosis: Epidemiological Approach in Northeast Argentina. *Current Fungal Infection Reports*, v. 12, n. 4, p. 138–143, 1 dez. 2018.

GIUSIANO, G. et al. Clinical and Demographic Features of Paracoccidioidomycosis in Argentina: A Multicenter Study Analysis of 466 Cases. *Journal of Fungi* 2023, Vol. 9, Page 482, v. 9, n. 4, p. 482, 17 abr. 2023.

GIUSIANO, G. et al. Impact of COVID-19 on paracoccidioidomycosis. Which was the most influential: The pandemic or the virus? *Mycoses*, v. 67, n. 7, p. e13761, 1 jul. 2024.

GÓES, A. M. DE et al. Paracoccidioidomicose (doença de Lutz-Splendore-Almeida): etiologia, epidemiologia e patogênese. *Rev. méd. Minas Gerais*, 2014.

GOMES, G. M. et al. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 9, p. 3478–3480, 2000.

GÓMEZ, B. L.; TOBÓN, Á. M.; GONZÁLEZ, Á. Paracoccidioidomycosis. p. 211–226, 2024.

GORELICK, N. et al. Google Earth Engine: Planetary-scale geospatial analysis for everyone. *Remote Sensing of Environment*, v. 202, p. 18–27, 1 dez. 2017.

HAHN, R. C. et al. Paracoccidioidomycosis: Current Status and Future Trends. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 35, n. 4, 1 dez. 2022.

HIGUITA-GUTIÉRREZ, L. F. et al. Meta-analysis of immunological tests for the diagnosis of Paracoccidioides infection, 1972-2017. *Infectio*, v. 23, n. 2, p. 167–174, 2019.

HUMANOS, S. Pautas éticas internacionales para la investigación relacionada con la salud. educacionysaludholistica.org S HUMANOS educacionysaludholistica.org, [s.d.].

IMAI, T. et al. A new PCR primer for the identification of Paracoccidioides brasiliensis based on rRNA sequences coding the internal transcribed spacers (ITS) and 5·8S regions. *Medical Mycology*, v. 38, n. 4, p. 323–326, 2000.

JENSEN, H. E. Histopathology in the Diagnosis of Invasive Fungal Diseases. *Current Fungal Infection Reports*, v. 15, n. 1, p. 23–31, 1 mar. 2021.

JOMBART, T.; BATEMAN, A. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, v. 24, n. 11, p. 1403–1405, 1 jun. 2008.

KAMEI, K. et al. The trend of imported mycoses in Japan. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, v. 9, n. 1, p. 16–20, 2003.

KOEHLER, A. et al. Head and neck manifestations of paracoccidioidomycosis: A retrospective study of histopathologically diagnosed cases in two medical centers in southern Brazil. *Journal of Medical Mycology*, v. 32, n. 3, p. 101292, 1 ago. 2022.

KOISHI, A. C. et al. A semi-nested PCR assay for molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 43, n. 6, p. 728–730, 2010.

KRAKHECKE-TEIXEIRA, A. G. et al. Clinical and Eco-Epidemiological Aspects of a Novel Hyperendemic Area of Paracoccidioidomycosis in the Tocantins-Araguaia Basin (Northern Brazil), Caused by *Paracoccidioides* sp. *Journal of Fungi* 2022, Vol. 8, Page 502, v. 8, n. 5, p. 502, 12 maio 2022.

KURAKADO, S.; MATSUMOTO, Y.; SUGITA, T. Comparing the virulence of four major clades of *Candida auris* strains using a silkworm infection model: Clade IV isolates had higher virulence than the other clades. *Medical Mycology*, v. 61, n. 11, 6 nov. 2023.

LACAZ, C. S. *Paracoccidioides brasiliensis*: Morphology; Evolutionary Cycle; Maintenance during Saprophytic Life; Biology, Virulence, Taxonomy. *Paracoccidioidomycosis*, p. 13–26, 31 jan. 2018.

LACAZ, C. S. Evolução dos conhecimentos sobre a paracoccidioidomicose. Um pouco de sua história. Del Negro G, Lacaz CS, Fiorillo AM. *Paracoccidioidomicose*. São Paulo: Sarvier, 1982, vol. 1, no 9.

LEITÃO, N. P. et al. *Paracoccidioides lutzii* Plp43 Is an Active Glucanase with Partial Antigenic Identity with *P. brasiliensis* gp43. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 8, p. e3111, 28 ago. 2014.

LOCKHART, S. R. et al. Endemic and Other Dimorphic Mycoses in The Americas. *Journal of Fungi* 2021, Vol. 7, Page 151, v. 7, n. 2, p. 151, 20 fev. 2021.

LONDERO, A. T. et al. “Reservarea” of paracoccidioidomycosis in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *revistas.usp.br* AT Londero, CD Ramos, JO Lopes, JP Benevenga *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 1972•*revistas.usp.br*, [s.d.].

LOPES, J. D. et al. Characterization of glycoprotein gp43, the major laminin-binding protein of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas*, v. 27, n. 9, p. 2309–2313, 1 set. 1994.

LUIS GALEANO et al. Tendencias recientes de la migración interna. FLACSO, 2017.

LUIS GALEANO. Migración interna en el Paraguay: cambios e impactos | Población y Desarrollo. Disponível em: <<https://revistascientificas.una.py/index.php/RE/article/view/1638>>. Acesso em: 7 mar. 2025.

MALDONADO LIRA, B. Respuesta inmune en paracoccidioidomicosis. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, v. 21, n. 2, p. 54–61, 2001.

MARCOS, C. M. et al. The multifaceted roles of metabolic enzymes in the *Paracoccidioides* species complex. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, n. DEC, p. 124227, 19 dez. 2014.

MARICATO, J. T. et al. The Paracoccidioides brasiliensis gp70 antigen is encoded by a putative member of the flavoproteins monooxygenase family. Fungal Genetics and Biology, v. 47, n. 2, p. 179–189, 1 fev. 2010.

MARQUES, S. A. et al. Paracoccidioidomicose: frequência, morfologia e patogênese de lesões tegumentares. Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 82, n. 5, p. 411–417, 2007.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical, diagnostic and treatment up-dating. Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 88, n. 5, p. 700–711, set. 2013.

MARTINEZ, R. EPIDEMIOLOGY OF PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 57, p. 11–20, 1 set. 2015.

MARTINEZ, R. New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. Journal of Fungi 2017, Vol. 3, Page 1, v. 3, n. 1, p. 1, 3 jan. 2017.

MATTOS, K. 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, v. 15, n. 4, p. e0009317, 1 abr. 2021.

MATUTE, D. R. et al. Cryptic Speciation and Recombination in the Fungus Paracoccidioides brasiliensis as Revealed by Gene Genealogies. Molecular Biology and Evolution, v. 23, n. 1, p. 65–73, 1 jan. 2006.

MAVENGERE, H. et al. Paracoccidioides genomes reflect high levels of species divergence and little interspecific gene flow. mBio, v. 11, n. 6, p. 1–18, 2020.

MED, A. L.-B.; 1908, UNDEFINED. Uma micose pseudocócica localizada na boca e observada no Brasil: contribuição ao conhecimento das hifoblastomicoses americanas. bvsalut.coc.fiocruz.brA LutzBrasil Med, 1908•bvsalut.coc.fiocruz.br, [s.d.].

MENDES, R. P. et al. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. The open microbiology journal, v. 11, n. 1, p. 224–282, 2 nov. 2017.

MENDES-GIANNINI, M. J. S. et al. Pathogenesis II: Fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. Medical Mycology, v. 38, n. s1, p. 113–123, jan. 2000.

MESSINA, F. A.; GIUSIANO, G.; SANTISO, G. Endemic Mycoses and COVID-19: a Review. Current Fungal Infection Reports, v. 16, n. 3, p. 98–106, 1 set. 2022.

MILLINGTON, M. A. et al. Paracoccidioidomicose: abordagem histórica e perspectivas de implantação da vigilância e controle. Epidemiologia e Serviços de Saúde, v. 27, n. spe, p. e0500002, 16 ago. 2018.

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y BIENESTAR SOCIAL. PARAGUAY. Manual de Diagnóstico de las micosis endémicas . [s.l: s.n.].

Ministerio de Trabajo, Empleo y Seguridad Social :: Decreto N° 3442/2020. Disponível em: <<https://www.mtess.gov.py/documentos/decreto-n-34422020>>. Acesso em: 7 mar. 2025.

MORAIS, F. V. et al. Polymorphism in the gene coding for the immunodominant antigen gp43 from the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 11, p. 3960–3966, 2000.

MUKHERJEE, P. K. et al. Combination treatment of invasive fungal infections. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 18, n. 1, p. 163–194, jan. 2005.

MUÑOZ, J. F. et al. Genome Diversity, Recombination, and Virulence across the Major Lineages of *Paracoccidioides*. *mSphere*, v. 1, n. 5, p. e00213-16, 6 out. 2016a.

MUÑOZ, J. F. et al. Genome Diversity, Recombination, and Virulence across the Major Lineages of *Paracoccidioides*. *mSphere*, v. 1, n. 5, p. 213–229, 26 out. 2016b.

MUNDIAL, Associação Médica. Declaração de Helsinque da Associação Médica Mundial: princípios éticos para pesquisa médica envolvendo seres humanos. Jorge MR, tradutor.[Internet].[sd][acesso 22 jun 2015]. Disponível: http://www.amb.org.br/_arquivos/_downloads/491535001395167888_DoHBrazilianPortugueseVersionRev.pdf, 2013.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L.; QUEIROZ-TELLES, F. *Paracoccidioidomycosis*. *Current Fungal Infection Reports*, v. 3, n. 1, p. 15–20, 1 mar. 2009.

NUNES, L. R. et al. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryotic Cell*, v. 4, n. 12, p. 2115–2128, dez. 2005.

Ordenamiento Territorial de la República del Paraguay : Repertorio Normativo de la División Política y Administrativa. Disponível em: <<https://www.bacn.gov.py/bibliografias-de-la-bacn/411/ordenamiento-territorial-de-la-republica-del-paraguay-repertorio-normativo-de-la-division-politica-y-administrativa>>. Acesso em: 16 abr. 2025.

ORGANIZATION, W. H. Ending the neglect to attain the sustainable development goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030. 2020.

PALHETA-NETO, F. et al. Estudo de 26 casos de *Paracoccidioidomicose* avaliados no Serviço de Otorrinolaringologia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). *SciELO Brasil*, [s.d.].

PANIAGO, A. M. M. et al. *Paracoccidioidomicose*: estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no Estado de Mato Grosso do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 4, p. 455–459, 2003.

PASQUALOTTO, A. C. Endemic Mycoses: Recent Advances in Epidemiology, Diagnosis and Treatment. *Endemic Mycoses: Recent Advances in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*, p. 196, 10 jul. 2024.

PEÇANHA, P. M. et al. Amphotericin B lipid complex in the treatment of severe *paracoccidioidomycosis*: a case series. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 48, n. 4, p. 428–430, 1 out. 2016.

PEÇANHA, P. M. et al. Paracoccidioidomycosis: What We Know and What Is New in Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Journal of Fungi* 2022, Vol. 8, Page 1098, v. 8, n. 10, p. 1098, 18 out. 2022.

PEÇANHA-PIETROBOM, P. M. et al. Diagnosis and Treatment of Pulmonary Coccidioidomycosis and Paracoccidioidomycosis. *Journal of Fungi* 2023, Vol. 9, Page 218, v. 9, n. 2, p. 218, 7 fev. 2023.

PINHEIRO, B. G. et al. Molecular Tools for Detection and Identification of Paracoccidioides Species: Current Status and Future Perspectives. *Journal of Fungi* 2020, Vol. 6, Page 293, v. 6, n. 4, p. 293, 18 nov. 2020.

PINHEIRO, B. G. et al. A New Duplex PCR-Assay for the Detection and Identification of Paracoccidioides Species. *Journal of Fungi* 2021, Vol. 7, Page 169, v. 7, n. 3, p. 169, 26 fev. 2021.

PINHEIRO, B. G. et al. Development of a Multiplex qPCR Assay for Fast Detection and Differentiation of Paracoccidioidomycosis Agents. *Journal of Fungi*, v. 9, n. 3, p. 358, 1 mar. 2023.

POPI, A. F.; LOPES, J. D.; MARIANO, M. GP43 from Paracoccidioides brasiliensis inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. *Cellular Immunology*, v. 218, n. 1–2, p. 87–94, 1 jul. 2002.

PRADO, M. et al. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 3, p. 513–521, 2009.

PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L. R. 43-kilodalton glycoprotein from Paracoccidioides brasiliensis: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 29, n. 8, p. 1610–1615, 1991.

QUEIROZ-TELLES, F. et al. Neglected endemic mycoses. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 17, n. 11, p. e367–e377, 1 nov. 2017.

QUEIROZ-TELLES, F.; ESCUISSATO, D. L. Pulmonary paracoccidioidomycosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 32, n. 6, p. 764–774, 2011.

RAJ, A.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. FastSTRUCTURE: Variational inference of population structure in large SNP data sets. *Genetics*, v. 197, n. 2, p. 573–589, 1 jun. 2014.

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

RESTREPO, A. et al. Clues to the presence of pathogenic fungi in certain environments. *Medical Mycology*, v. 38, n. Supplement_1, p. 67–77, 30 dez. 2000.

RESTREPO, A.; GÓMEZ, B. L.; TOBÓN, A. Paracoccidioidomycosis: Latin America's own fungal disorder. *Current Fungal Infection Reports*, v. 6, n. 4, p. 303–311, 1 dez. 2012.

RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G.; CASTAÑEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis* : how far from solving the riddle? . *Medical Mycology*, v. 39, n. 3, p. 233–241, jan. 2001.

RESTREPO A; TOBÓN AM; GONZALEZ A. Chapter 267: Paracoccidioidomycosis. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (eds) *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. Em: Elsevier, Philadelp ed. [s.l: s.n.]. v. 9thp. 3211–3221.

RESTREPO-MORENO, A. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Paracoccidioidomycosis*, p. 121–130, 31 jan. 2018.

RICHINI-PEREIRA, V. B. et al. Detecção de *Paracoccidioides brasiliensis* em tatus (*Dasypus novemcinctus*) provenientes de uma reserva de Cerrado do Instituto Lauro de Souza Lima (Bauru, SP. Bepa - Boletim Epidemiológico Paulista, p. 4–8, 2008.

ROCHA-SILVA, F. et al. Real Time Polymerase Chain Reaction (rt-PCR): A New Patent to Diagnostic Purposes for Paracoccidioidomycosis. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery*, v. 10, n. 2, p. 143–149, 22 maio 2017.

ROCHA-SILVA, F. et al. Paracoccidioidomycosis: Detection of *Paracoccidioides brasiliensis*' genome in biological samples by quantitative chain reaction polymerase (qPCR). *Microbial Pathogenesis*, v. 121, p. 359–362, 1 ago. 2018.

ROLÓN-LOPEZ, J. C. et al. Paracoccidioidomycosis: Reporte de 4 casos. *Revista del Instituto de Medicina Tropical*, v. 18, n. 2, p. 45–50, 28 dez. 2023.

ROMANELI, M. T. DAS N. et al. Acute-subacute paracoccidioidomycosis: A paediatric cohort of 141 patients, exploring clinical characteristics, laboratorial analysis and developing a non-survival predictor. *Mycoses*, v. 62, n. 11, p. 999–1005, 1 nov. 2019.

SAHL, J. W. et al. NASP: an accurate, rapid method for the identification of SNPs in WGS datasets that supports flexible input and output formats. *Microbial genomics*, v. 2, n. 8, p. e000074, 1 ago. 2016.

SALGADO-SALAZAR, C. et al. The human fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: phylogenetic evidence from five mitochondrial markers. *Cladistics*, v. 26, n. 6, p. 613–624, 1 dez. 2010.

SALZER, H. J. F. et al. Diagnosis and Management of Systemic Endemic Mycoses Causing Pulmonary Disease. *Respiration*, v. 96, n. 3, p. 283–301, 10 out. 2018.

SANABRIA PEÑA, C. L. et al. Paracoccidioidomycosis. Una enfermedad multisistémica. *Acta Medica Colombiana*, v. 43, n. 2, p. 111–114, 2018.

SANTOS, L. A. et al. Virulence factors of *Paracoccidioides brasiliensis* as therapeutic targets: a review. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 113, n. 5, p. 593–604, 1 maio 2020.

SHANKAR, J. et al. Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 24, n. 2, p. 296–313, abr. 2011.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 50, n. 5, p. 715–740, 1 set. 2017.

SIL, A.; ANDRIANOPOULOS, A. Thermally Dimorphic Human Fungal Pathogens—Polyphyletic Pathogens with a Convergent Pathogenicity Trait. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 5, n. 8, p. a019794, 1 ago. 2015.

SILVA VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R. Role of the armadillo *Dasypus novemcinctus* in the epidemiology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*, v. 144, n. 3, p. 131–133, 1998.

SIQUEIRA, I. M. et al. Distinct patterns of yeast cell morphology and host responses induced by representative strains of *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) and *Paracoccidioides lutzii* (Pb01). *Medical Mycology*, v. 54, n. 2, p. 177–188, 1 fev. 2016.

SIVIERI DE ARAÚJO, M.; SOUSA, S. C. O. M.; CORREIA, D. Avaliação do exame citopatológico como método para diagnosticar a paracoccidioidomicose crônica oral. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 3, p. 427–430, 2003.

SOUSA, C. et al. Chest Imaging in Systemic Endemic Mycoses. *Journal of Fungi* 2022, Vol. 8, Page 1132, v. 8, n. 11, p. 1132, 27 out. 2022.

STEVENS, K. B.; PFEIFFER, D. U. Spatial modelling of disease using data- and knowledge-driven approaches. *Spatial and Spatio-temporal Epidemiology*, v. 2, n. 3, p. 125–133, 1 set. 2011.

STURME, M. H. J. et al. Molecular biology of the dimorphic fungi *Paracoccidioides* spp. *Fungal Biology Reviews*, v. 25, n. 2, p. 89–97, 1 jul. 2011.

Superficie y producción por año agrícola, según cultivo. Periodo 2020 al 2021 | Datos.gov.py. Disponível em: <<https://www.datos.gov.py/dataset/superficie-y-produccion-por-a%C3%B1o-agr%C3%ADcola-seg%C3%BAn-cultivo-periodo-2020-al-2021>>. Acesso em: 8 mar. 2025.

TEIXEIRA, M. DE M. et al. Genomic diversity of the human pathogen *Paracoccidioides* across the South American continent. *Fungal Genetics and Biology*, v. 140, p. 103395, 1 jul. 2020.

TEIXEIRA, M. M. et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Molecular phylogenetics and evolution*, v. 52, n. 2, p. 273–283, ago. 2009.

TEIXEIRA, M. M. et al. *Paracoccidioides* Species Complex: Ecology, Phylogeny, Sexual Reproduction, and Virulence. *PLOS Pathogens*, v. 10, n. 10, p. e1004397, 1 out. 2014.

TELES, F. R. R.; MARTINS, M. L. Laboratorial diagnosis of paracoccidioidomycosis and new insights for the future of fungal diagnosis. *Talanta*, v. 85, n. 5, p. 2254–2264, 15 out. 2011.

THEODORO, R. C. et al. Genus *Paracoccidioides*: Species Recognition and Biogeographic Aspects. PLOS ONE, v. 7, n. 5, p. e37694, 30 maio 2012.

THEODORO, R. C.; BAGAGLI, E.; OLIVEIRA, C. Phylogenetic analysis of PRP8 intein in *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. Fungal Genetics and Biology, v. 45, n. 9, p. 1284–1291, 1 set. 2008.

THOMPSON, G. R.; PASQUALOTTO, A. C. Endemic mycoses: Expansion of traditional geographic ranges and pitfalls in management. Mycoses, v. 64, n. 9, p. 989–992, 1 set. 2021.

TIRADO-SÁNCHEZ, A.; GONZÁLEZ, G. M.; BONIFAZ, A. Endemic mycoses: epidemiology and diagnostic strategies. Expert Review of Anti-infective Therapy, 1 nov. 2020.

TOLEDO, M. S. et al. Effect of anti-glycosphingolipid monoclonal antibodies in pathogenic fungal growth and differentiation. Characterization of monoclonal antibody MEST-3 directed to Man α 1 $\rightarrow$ 3Man α 1 $\rightarrow$ 2IPC. BMC Microbiology, v. 10, n. 1, p. 1–12, 15 fev. 2010.

TORRES. Dinámica demográfica y agricultura en el Paraguay. Población y Desarrollo•revistascientificas.una.py, 2005.

TORRES, A. et al. Análisis Crítico de la Biogeografía del Paraguay. Reportes Científicos de la FACEN, v. 9, n. 1, p. 42–50, 2018.

Tratado de micologia médica. revistas.usp.brCS Lacaz, E Porto, JEC Martins, EM Heins-Vaccari, NT De MeloRevista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 2002•revistas.usp.br, [s.d.].

TURISSINI, D. A. et al. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. Fungal Genetics and Biology, v. 106, p. 9–25, 1 set. 2017.

VELDHOEN, M. Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity. Nature Immunology 2017 18:6, v. 18, n. 6, p. 612–621, 18 maio 2017.

VIEIRA, G. DE D. et al. *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.

VILELA, R. et al. Cutaneous Granulomas in Dolphins Caused by Novel Uncultivated *Paracoccidioides brasiliensis*. Emerging Infectious Diseases, v. 22, n. 12, p. 2063, 1 dez. 2016.

VILELA, R. et al. The taxonomy of two uncultivated fungal mammalian pathogens is revealed through phylogeny and population genetic analyses. Scientific Reports 2021 11:1, v. 11, n. 1, p. 1–13, 13 set. 2021.

VILELA, R.; MENDOZA, L. *Paracoccidioidomycosis ceti* (Lacaziosis/Lobomycosis) in Dolphins. Emerging and Epizootic Fungal Infections in Animals, p. 177–196, 11 jun. 2018.

VIOLETA ARAÚJO LÓPEZ, P. et al. Past and present of Paracoccidioidomycosis in Paraguay. *Revista del Nacional (Itaiguá)*, v. 16, n. 3, p. 167–196, 2024.

WAGNER, G. et al. Paracoccidioidomycosis Diagnosed in Europe—A Systematic Literature Review. *Journal of Fungi*, v. 7, n. 2, p. 157, 1 fev. 2021.

WICKES, B. L.; WIEDERHOLD, N. P. Molecular diagnostics in medical mycology. *Nature Communications* 2018 9:1, v. 9, n. 1, p. 1–13, 3 dez. 2018.

YANG, Z. et al. Based on the MaxEnt model the analysis of influencing factors and simulation of potential risk areas of human infection with avian influenza A (H7N9) in China. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 14, 2025.

ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. et al. Diagnostic Aspects of Paracoccidioidomycosis. *Current Tropical Medicine Reports*, v. 1, n. 2, p. 111–118, 1 jun. 2014.