



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

IGOR MASSAHIRO DE SOUZA SUGUIURA

**DETECÇÃO DE INFEÇÃO POR *Paracoccidioides*  
*brasiliensis* EM TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)**

---

Londrina  
2019

IGOR MASSAHIRO DE SOUZA SUGUIURA

**DETECÇÃO DE INFEÇÃO POR *Paracoccidioides*  
*brasiliensis* EM TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina para obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Mario Augusto Ono

Londrina  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Suguiura, Igor Massahiro de Souza Suguiura.

Detecção de infecção por *Paracoccidíoides brasiliensis* em tilápia-do-nylo  
*Oreochromis niloticus* / Igor Massahiro de Souza Suguiura Suguiura. - Londrina, 2019.  
48 f. : il.

Orientador: Mario Augusto Ono.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, , 2019.

Inclui bibliografia.

1. Paracoccidíoidomicose - Tese. 2. Infecção - Tese. 3. Peixes - Tese. I. Ono, Mario Augusto . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. . III. Título.

IGOR MASSAHIRO DE SOUZA SUGUIURA

**DETECÇÃO DE INFEÇÃO POR *Paracoccidioides brasiliensis* EM  
TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina para obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Mario Augusto Ono  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eiko Nakagawa Itano  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Laurival Antônio Vilas Bôas  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 25 de Julho de 2019.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por agir de forma sutil e surpreendente.

Ao povo do Estado do Paraná e do Brasil que com seus impostos permitem a manutenção das universidades, do ensino público e da pesquisa neste país.

À Universidade e a todos os seus funcionários, por proporcionam um ambiente propício à aprendizagem e, à superação de desafios.

Ao Professor Dr. Mario Augusto Ono pela sua orientação, que desde o meu primeiro ano da minha graduação que me incentivou e proporcionou meu amadurecimento profissional.

Ao Professor Laurival Antônio Vilas Boas, pela disponibilidade e colaboração neste trabalho.

A todos os professores do programa de Patologia Experimental, pela dedicação e ensinamento. Cada um, de forma especial contribuiu para a conclusão desta etapa acadêmica.

Aos professores da banca, pela contribuição, ensinamentos e disponibilidade.

Aos parceiros de laboratório Rafaela Macagnan, Aline Omori, Giovana Carvalho e Izabele Kazahaya Borges pelas diversas formas de contribuição, pelos papos, pelo empréstimo dos ouvidos, muito obrigado por tudo!

A Aline Omori e Rafaela Macagnan pelo auxílio nas coletas e análises dos meus experimentos, sem vocês este trabalho não seria possível. Muito obrigado pelo comprometimento, vocês foram extraordinárias!

À minha família, minha eterna gratidão pelas palavras de apoio e incentivo durante todo este tempo, que estiveram ao meu lado ou a distância, sempre com palavras de incentivo e total suporte as minhas escolhas.

A meus amigos do mestrado, pelos momentos de discussão e aprendizado, e também, pela descontração e boas risadas. Melhor turma de mestrado não há.

**“A ciência nunca resolve um problema sem  
criar, pelo menos, outros dez”**  
George Bernard Shaw

SUGUIURA, Igor Massahiro de Souza. **Detecção de infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2019. 48 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## RESUMO

Os fungos termodimórficos *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii* são os agentes etiológicos da paracoccidioidomicose, micose sistêmica com alta prevalência no Brasil e em outros países da América Latina. A detecção direta ou indireta de *P. brasiliensis* em amostras ambientais e em animais com próxima relação ao solo indica este substrato como seu habitat mais provável. No entanto, alguns pesquisadores sugeriram o meio aquático como um possível habitat de *Paracoccidioides* sp. Na literatura não há estudos sobre a infecção por *P. brasiliensis* em animais ectotérmicos aquáticos, como peixes. O objetivo deste estudo foi detectar a infecção natural por *P. brasiliensis* em tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivadas na região norte do estado do Paraná, Brasil. O estudo foi composto por três etapas distintas: avaliação da resposta imune de peixes imunizados com células mortas de *P. brasiliensis*, detecção da ocorrência da infecção natural em peixes de frigorífico e detecção de DNA fúngico em amostras obtidas de peixes de tanque rede. Inicialmente um grupo de três tilápias-do-nilo foram imunizadas com células mortas de *P. brasiliensis*, cepa B-339. Amostras de soro foram analisadas por ELISA indireto utilizando como antígeno gp43. Todos os peixes produziram anticorpos contra o fungo. A infecção natural foi analisada utilizando amostras de soro de dois grupos obtidas em frigorífico: soro de peixes de tanque escavado (n=105) e peixes de tanque rede (n=109). A soropositividade observada foi de 17,43% em peixes de tanque rede e 5,71% em peixes de tanque escavado ( $p < 0,05$ ). A partir da diferença observada em que peixes de tanque rede apresentaram maior positividade na sorologia contra gp43, amostras de DNA foram coletadas de outro grupo de tilápias de tanque rede. As amostras de fígado (n=33), encéfalo (n=32) e rim (n=35) foram analisadas por PCR (Pb-ITSR e Pb-ITSE). Três amostras (encéfalo, rim e fígado), obtidas de três peixes diferentes, foram consideradas positivas no PCR com resultado confirmado por sequenciamento. Os resultados demonstram que tilápias podem se infectar e desenvolver anticorpos contra *P. brasiliensis* e sugerem que *Paracoccidioides* sp. pode habitar o meio aquático. Este é o primeiro estudo mostrando evidência sorológica e molecular da infecção por *P. brasiliensis* em uma espécie de peixe e demonstrando a infecção natural em animais ectotérmicos.

**Palavras-chave:** Peixe. Eco-epidemiologia. Paracoccidioidomicose. Sorologia. PCR.

SUGUIURA, Igor Massahiro de Souza. **Detecção de infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2019. 48 p. Dissertation (Master's degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## ABSTRACT

The thermodynamorphic fungi *Paracoccidioides brasiliensis* and *P. lutzii* are the etiological agents of paracoccidioidomycosis, systemic mycosis with high prevalence in Brazil and other Latin American countries. Isolation of *P. brasiliensis* from soil samples and molecular detection as well as the presence of antibodies against its specific proteins in animals with close relation to soil indicates this substrate as its most probable habitat. However, some researchers have suggested the aquatic environment as a possible habitat for *Paracoccidioides* sp. In the literature there are no studies on *P. brasiliensis* infection in aquatic ectothermic animals, such as fish. The objective of this study was to detect the natural infection by *P. brasiliensis* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farmed in the northern region of the state of Paraná, Brazil. The study was composed of three distinct stages; evaluation of the immune response of fish immunized with dead cells of *P. brasiliensis*, detection of the occurrence of the natural infection in fish from slaughterhouse and detection of fungal DNA in samples obtained from fish raised in cages. Initially a group of three Nile tilapia was immunized with dead cells of *P. brasiliensis*, strain B-339. Serum samples were analyzed by indirect ELISA using as gp43 antigen. All fish produced antibodies against the fungus. The natural infection was analyzed using serum samples obtained in a fish slaughterhouse of two groups, serum of fish raised in ponds (n = 105) and fish from cages (n = 109). The seropositivity observed was 17.43% in fish from cages and 5.71% in fish from ponds (p <0.05). Based on the difference observed in which caged fish showed higher positivity in the gp43 serology, DNA samples were collected from another group of Nile tilapia from cage culture from the northern region of Paraná. Liver samples (n = 33), brain (n = 32) and kidney (n = 35) were analyzed by PCR (Pb-ITSR and Pb-ITSE). Three samples (brain, kidney and liver) obtained from three different fish were considered positive in the PCR and the result was confirmed by sequencing. The results demonstrate that tilapia can get infected and develop antibodies against *P. brasiliensis* and suggests that *Paracoccidioides* sp. can inhabit the aquatic environment. This is the first study showing serological and molecular evidence of *P. brasiliensis* infection in a fish species and demonstrating the natural infection in ectothermic animals.

**Keywords:** Fish. Eco-epidemiology. Paracoccidioidomycosis. Serology. PCR

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico ( <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
ELISA	Ensaio imunoenzimático ( <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> )
g	Gramma
gp	Glicoproteína
h	Horas
ITS	Espaçador Transcrito Interno ( <i>Internal Transcribed Spacer</i> )
m	Metros
min	Minuto
mm	Milímetros
n	Número de indivíduos na amostra
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramas
nm	Nanometros
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
pb	Pares de base
PCM	Paracoccidioidomicose
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
s	Segundos
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µL	Micro litro
µM	Micromol
µm	Micrômetro
%	Por cento

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	09
1.1	<i>Paracoccidioides spp.</i> .....	09
1.2	ECO-EPIDEMIOLOGIA .....	09
1.3	PARACOCCIDIOIDOMICOSE.....	12
1.4	TILÁPIA-DO-NILO .....	16
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	18
2.1	OBJETIVO GERAL .....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>2</b>	<b>ARTIGO</b> .....	19
	<b>First Report of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> infection in Fish</b> .....	20
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	39
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	40

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 PARACOCCIDIOIDES SPP.

*Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii* são os fungos causadores da paracoccidioidomicose. Os fungos do gênero *Paracoccidioides* são termodimórficos, com forma micelial ocorrendo entre 25°-30°C e forma leveduriforme entre 35°-37°C. Na fase miceliana, as colônias são irregulares, apresentam poucos micélios aéreos e hifas septadas. A coloração varia entre branco e amarelo, podendo apresentar pigmentação marrom difusa. As leveduras de *P. brasiliensis* apresentam dupla membrana, a interna rugosa e externa lisa, tamanho entre 4 e 30 µm formando colônias de aspecto cerebriforme, e de coloração clara. É observada a forma típica de “roda de leme” ou “Mickey mouse” devido aos brotamentos laterais da levedura. (BRUMMER et al., 1993; CAMPOS 2011). Matute e colaboradores (2006) propuseram a classificação de *P. brasiliensis* em três espécies crípticas diferentes: S1, PS2 e PS3, a partir de estudos de biologia molecular, sendo que um isolado com maior variabilidade genética foi classificado por Teixeira e colaboradores (2009) como uma nova espécie, denominada *P. lutzii*. Posteriormente, Teixeira e colaboradores (2013, 2014) identificaram a espécie PS4 como sendo restrita à Venezuela. Apesar da proposta de diferenciação, há discordância entre a comunidade científica sobre a diferenciação das espécies crípticas, como por parte de Salgado-salazar e colaboradores (2010), que descrevem as diferenças genéticas como variantes geográficas da mesma espécie. No entanto, através de análise molecular a partir da análise de loci nuclear e mitocondrial, Turissini e colaboradores (2017) propuseram a classificação de *P. brasiliensis* como um complexo composto por quatro espécies: *P. brasiliensis* sensu stricto (S1), *P. americana* (PS2), *P. restrepiensis* (PS3) e *P. venezuelensis* (PS4).

### 1.2 ECO-EPIDEMIOLOGIA

A determinação do habitat do fungo é ainda motivo de estudo, porém há evidências de que seja o solo. Corroboram esta hipótese os isolados de *P. brasiliensis* obtidos a partir de amostras de solo por Shome e Batista no Recife (1963), por Negroni (1966) na Argentina, por Albornoz (1971) na Venezuela, e por

Silva-Vergara e colaboradores (1998) em Minas Gerais. No entanto, novas tentativas de isolamento do fungo nos mesmos locais foram infrutíferas.

Conti-diaz (1989) propôs um papel do meio aquático na eco-epidemiologia de *P. brasiliensis*, em que o ciclo ocorreria com a participação de organismos aquáticos que quando predados por mamíferos transmitiriam a estes a infecção. No entanto os estudos de isolamento de *P. brasiliensis* a partir do solo direcionaram a pesquisa deste nicho como o provável habitat do fungo. Porém, estudos de Restrepo (1985, 2001) indicam a ocorrência do fungo em locais com abundância de cursos d'água e pluviosidade considerável, (PEDROSA, 1976, RIOS-GONÇALES et al., 1998) correlacionando a presença do fungo com a água. Períodos de chuva poderiam auxiliar o desenvolvimento fúngico e a dispersão de conídios (ARANTES et al., 2016). Estudo retrospectivo realizado por Barrozo e colaboradores (2010) e por Blota e colaboradores (1999) demonstraram uma correlação positiva entre o aumento da precipitação e a elevação de casos de PCM através de registros no estado de São Paulo. Em um primeiro momento, os pesquisadores descreveram o aumento dos casos de PCM causados pelo fenômeno climático El Niño no período de 1982 e 1983, o qual elevou os índices pluviométricos, propiciando uma maior umidade no solo e no ar, que contribuiria para o desenvolvimento do fungo e a dispersão de conídios.

Diversos fatores levam à dificuldade no isolamento do fungo a partir de amostras ambientais. *Paracoccidioides* sp. apresenta crescimento lento e poderia ser inibido por microorganismos saprófitas de crescimento rápido (THEODORO et al. 2005). Em relação aos fatores ambientais que influenciam o desenvolvimento do fungo, podemos citar as alterações climáticas, que podem diminuir a esporulação, a profundidade do solo no momento das coletas (THEODORO et al., 2005; ARANTES et al., 2013), a presença das hifas em áreas com baixa concentração de oxigênio, levando a uma baixa viabilidade do fungo (RESTREPO et al., 1981), e a presença de agrotóxicos que poderiam interferir no desenvolvimento do *P. brasiliensis*, como observado em testes *in vitro* (ONO et al., 2002).

Devido às dificuldades para realizar o isolamento direto de *Paracoccidioides* sp. de amostras ambientais, a maior parte das tentativas de isolamento do fungo tem sido realizada de forma indireta, por meio da inoculação das amostras em animais. O modelo animal mais frequentemente utilizado é o camundongo (SCORZONI et al., 2015). As linhagens naturalmente susceptíveis são variadas, porém a susceptibilidade pode ser induzida através de protocolos de imunossupressão com

radiação ou através da administração de ciclofosfamida (KERR et al., 1982). A susceptibilidade também é afetada pela via de inoculação, sendo a via intratraqueal a que apresenta a maior letalidade (MACKINNON, 1959). Apesar de utilizado em alguns casos, o isolamento indireto em animais experimentais a partir de amostras ambientais apresenta baixa sensibilidade como observado no trabalho de Vergara e colaboradores (1988), que a partir de mais de 700 amostras de solo, conseguiram apenas um único isolado de *P. brasiliensis*. Estudos recentes indicam a possibilidade de utilização de modelos alternativos, como o invertebrado *Galleria mellonella*, que se mostrou susceptível à infecção tanto por *P. brasiliensis* como por *P. lutzii* (SCORZONI et al., 2015).

Além de verificar as espécies sensíveis à infecção pelo microrganismo, a detecção de anticorpos anti-*P. brasiliensis* é uma alternativa para mapear a presença do fungo por meio de animais sentinela presentes nestas áreas.

Para a identificação dos potenciais hospedeiros do fungo, inicialmente era utilizado o antígeno polissacarídico de *P. brasiliensis* na realização dos testes imunológicos (FAVA-NETTO, 1961; CONTI-DIAS et al., 1972; COSTA et al., 1995). Com a busca de formas mais eficientes de diagnóstico, foram implementados testes utilizando antígenos glicoprotéicos (exoantígeno) (BRUMMER et al., 1984; PUCCIA et al., 1986; CAMARGO et al., 1988; MENDES-GIANNINI et al., 1990; BOTTEON et al., 2002; FAGUNDES et al., 2002; PETRONI et al., 2017). Sendo que, atualmente, os inquéritos sorológicos da PCM em diferentes espécies animais são realizados por meio de ELISA, utilizando como antígeno a proteína gp43, considerada o principal antígeno de *P. brasiliensis* (ONO et al., 2001; CORTE et al., 2007; SILVEIRA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011, 2013; BELITARDO et al., 2014, SBEGHEN et al., 2015).

A cronicidade da PCM e a migração dos indivíduos dificulta a identificação de casos autóctones em humanos (RESTREPO, 1985). No entanto, a geolocalização do fungo através da pesquisa de anticorpos em animais sentinela é uma boa alternativa tendo em vista o hábito gregário da maioria dessas espécies.

### 1.3 PARACOCCIDIOIDOMICOSE

*P. brasiliensis* e *P. lutzii* são os agentes etiológicos da paracoccidiodomicose (PCM). A PCM é classificada como PCM doença e PCM infecção. A PCM doença é

caracterizada pela manifestação dos sinais clínicos e achados patológicos compatíveis com a doença. A PCM infecção, por outro lado, é caracterizada pelo contato do indivíduo com o fungo e desenvolvimento de resposta imune contra o microorganismo, não havendo o desenvolvimento da doença. A PCM doença configura-se pela manifestação granulomatosa, sistêmica e de evolução crônica, com relevância para a saúde pública pelo seu grande potencial incapacitante. Acredita-se que a forma de infecção ocorra pela inalação de conídios do fungo provenientes do solo (BAGAGLI et al., 2008; BELLÍSSIMO-RODRIGUES et al., 2011, 2013; ARANTES et al., 2013; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). Até a puberdade, a doença afeta igualmente indivíduos de ambos os sexos, entretanto, em idade adulta, acomete principalmente homens, em sua maioria agricultores, com predominância da faixa etária entre 30 e 50 anos de idade. Acredita-se que o principal fator relacionado à alta incidência nesta faixa da população é o preparo do solo para fins agrícolas. A menor frequência da doença em mulheres é explicada pela ação do estrógeno, que inibe a transformação da forma infectante (miceliana) para a forma patogênica (leveduriforme) (RESTREPO et al., 1984; PINZAN et al., 2010; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Em animais, a PCM doença foi identificada em cães (*Canis familiaris*), tatus (*Dasypus novemcinctus*) e em um gato (*Felis catus*), um macaco-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) e um bicho-preguiça (*Choloepus didactylus*) (RICCI et al., 2004; DE FARIAS et al., 2011; HEADLEY et al., 2017, NAIFF et al., 1986; BAGAGLI et al., 1998, 2003, 2006, GONZALEZ et al., 2010, JOHNSON, et al., 1997, TREJO-CHÁVEZ, et al., 2011). Foram descritos na literatura três casos de PCM doença em cães, sendo dois animais provenientes do Paraná e um de São Paulo. Os sinais clínicos mais comuns apresentados pelos cães foram a linfadenopatia generalizada podendo estar associada à hepatoesplenomegalia e dermatopatia (RICCI et al., 2004; DE FARIAS et al., 2011; HEADLEY et al., 2017). Ono e colaboradores (2003) realizaram infecção experimental em cães filhotes e observaram alto índice de letalidade, uma das justificativas foi a dose utilizada para a infecção e a via de aplicação intravenosa, sendo observadas lesões disseminadas em fígado, baço e pulmão.

Os tatus são animais de hábito terrícola com íntimo contato com o solo, onde escavam seus abrigos e procuram alimento. Diversos estudos correlacionam o tatu com a PCM, sendo frequente o isolamento do fungo a partir de amostras de fígado,

baço e linfonodos mesentéricos. Desde os primeiros isolamentos em tatus sem evidências clínicas contundentes da PCM sugeriu-se a sua participação no ciclo natural do fungo. (PURTILO et al., 1975; NAIFF et al., 1986; BAGAGLI et al., 1998, 2003, 2006; CORREDOR et al., 1999, 2005; SILVA-VERGARA et al., 2001; RESTREPO et al., 2001; PEREIRA et al., 2003; ARANTES et al., 2013).

O único caso descrito na literatura sobre PCM natural em felinos foi em um gato doméstico no Chile que apresentou síndrome neurológica e infecção urinária micótica causada por *P. brasiliensis*. O animal foi diagnosticado através do exame direto de células leveduriformes no líquor e urina, vindo a ser eutanasiado devido à severa síndrome urêmica e neurológica. (GONZALEZ et al., 2010).

Uma preguiça-real (*Choloepus didactylus*) capturada na Guiana francesa e enviada ao México como animal de estimação, veio a óbito, e no exame post-mortem, foram identificados granulomas causados por células leveduriformes compatíveis com *P. brasiliensis* em pulmão, fígado, baço e rim (TREJO-CHÁVEZ, et al., 2011).

Semelhantemente ao caso descrito do bicho-preguiça, um macaco-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) importado da Bolívia para os EUA apresentou sinais clínicos inespecíficos e foi submetido à eutanásia. Nos achados post-mortem foram identificados múltiplos granulomas em fígado e intestino grosso, contendo leveduras identificadas como *P. brasiliensis* (JOHNSON, et al., 1997).

Estudos recentes relacionam o *P. brasiliensis* a quadros de lacaziose em golfinhos. A lacaziose, doença fúngica causada pelo fungo *Lacazia loboi*, é de importância para algumas espécies de cetáceos marinhos. Minakawa e colaboradores (2016) identificaram leveduras com brotamentos múltiplos e similaridade de 99% com a sequência parcial codificadora da proteína gp43 de *P. brasiliensis* em um golfinho no Japão com lesões compatíveis com lacaziose. Vilela e colaboradores (2016) identificaram resultados semelhantes em amostras provenientes de 6 golfinhos nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) na Flórida, EUA. Apesar dos achados histopatológicos e moleculares, o fungo causador da doença não foi isolado, diferentemente dos casos comuns de PCM, nos quais o fungo é facilmente isolado a partir de amostras provenientes de lesões. Na tentativa de explicar a infecção destes animais, Vilela e colaboradores indicam que esta poderia ser uma nova espécie de *Paracoccidioides*, denominada *P. ceti* (VILELA e

MENDOZA, 2018), no entanto, tais considerações necessitam de maior investigação, pois os resultados ainda são incipientes.

A infecção por *P. brasiliensis* foi demonstrada por meio de estudos epidemiológicos em diferentes espécies de animais domésticos e silvestres. Amostras de 38 mamíferos de pequeno porte, dentre roedores e marsupiais silvestres, foram analisadas através de *Nested-PCR* e ELISA por Sbeghen e colaboradores (2015) em uma reserva de proteção ambiental no norte do Paraná, sendo observada uma positividade de 7,3% no ELISA. Neste mesmo estudo, um dos roedores foi identificado como positivo através do ensaio de biologia molecular. Inquéritos sorológicos realizados em rebanhos de animais domésticos verificaram a presença de anticorpos anti-gp43 em equinos; n=100 e positividade de 30% (CORTE et. al, 2007), ovinos; n=262 e positividade de 37% (OLIVEIRA et. al, 2012), suínos; n=106 e positividade de 37,7% (BELITARDO et al., 2014a), caprinos; n=202 positividade de 26,2% (FERREIRA et al.,2013) e bovinos; n=400 e positividade de 17,5%. Outros estudos, utilizando a reação intradérmica de paracoccidiodina, verificaram a positividade de 23% em 195 equinos no Uruguai (CONTI-DIAS et al., 1972) e Gutierrez e colaboradores (1974), também no Uruguai, observaram 2% de positividade em bovinos leiteiros. Num estudo semelhante em bovinos realizado em São Paulo por Costa e Fava-Netto (1978), foi observado 44% de positividade.

Estudos comparando animais com acesso restrito ao solo e animais de vida livre encontraram diferenças na sorologia utilizando gp43 de *P. brasiliensis* como antígeno. Oliveira e colaboradores (2011) observaram uma positividade de 55% e 16% em galinhas de vida livre nos estados do Mato grosso do Sul e Paraná, respectivamente, enquanto que galinhas criadas em gaiolas sem contato com o solo foram negativas no ELISA. Belitardo e colaboradores (2014), em estudo semelhante, detectaram que coelhos com contato com solo apresentaram positividade de mais de 40%, em comparação aos 11,1% dos mantidos em gaiolas. A diferença da positividade observada na sorologia de gatos da região urbana e rural também apresentou diferença no ELISA. Oliveira et al. (2013) verificaram que gatos oriundos da região rural apresentaram reação de 48,8% à gp43 em comparação com 2% dos gatos da área urbana.

A identificação da PCM doença e infecção em cães também demonstra a correlação de animais soropositivos com a exposição ao solo. Em inquérito sorológico na região norte do Paraná foram observadas positivities diferentes

contra gp43 em cães oriundos de diferentes regiões. Cães da área urbana apresentaram 14,8% de positividade em contraste com 48,8% de animais da periferia e 89,5% de cães da área rural (ONO et al.,2001). Em estudo semelhante realizado no estado de Minas gerais foi observada positividade de 53% em animais urbanos de 80% nos mantidos na zona rural (FONTANA et al., 2010).

Costa e colaboradores (1995) analisaram por meio de reação intradérmica com paracoccidiodina, animais silvestres (n=47) mantidos em cativeiro. Os animais de hábito terrestre apresentaram positividade maior (82,98%) frente aos primatas de hábito semi arborícola (22,45%), sugerindo o solo como possível habitat de *P. brasiliensis*. Corte e colaboradores (2007), obtiveram 44,5% de positividade na sorologia de amostras obtidas de 25 bugios (*Alouatta caraya*), e 68 macacos-prego (*Cebus* sp), capturados no Estado do Paraná, através de ELISA e gp43 como antígeno.

Outro estudo com animais silvestres também foi realizado no Rio Grande do Sul por Albano e colaboradores (2014), que detectaram 20% de positividade em 128 amostras. Os animais deste estudo foram estratificados por áreas de captura, sendo que os animais capturados na área rural apresentaram 57% de positividade, em comparação aos 42% observados nos animais capturados em área urbana. No mesmo estudo verificaram também uma menor positividade nos animais de hábitos arborícolas (11%) quando comparado aos terrestres (50%).

#### 1.4 TILÁPIA-DO-NILO

A tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) é um ciclídeo africano disseminado globalmente para controle de plantas aquáticas em reservatórios artificiais, alimento para peixes carnívoros e, mais comumente, como fonte proteica para consumo humano. A grande adaptabilidade deste peixe se deve a fatores como sua excepcional tolerância a diversos ambientes, diferentes graus de salinidade, hipoxia, superpovoamento, a resistência a uma ampla faixa de temperatura e, além disso, sua alta prolificidade (COWARD & LITTLE, 2001, HENSON et al., 2018). Por outro lado, estas características tornaram a tilápia-do-nilo uma espécie exótica invasora em quase todas as nações que foi introduzida (CANONICO et al., 2005). No Brasil, a espécie possui grande importância econômica. O desenvolvimento da aquicultura no

Brasil aliada à adaptabilidade da tilápia-do-nilo, assim como ao desenvolvimento zootécnico de linhagens de corte, tornaram a tilápia uma das espécies mais representativas na aquicultura brasileira, com produção aproximada de 283 mil toneladas no ano de 2017 (IBGE 2017). O estado do Paraná é líder nacional na criação do peixe, com uma produção estimada em 2017 de mais de 90 mil toneladas (IBGE, 2017).

A tilápia-do-nilo apesar de adaptar-se a uma ampla faixa de temperatura possui condições ótimas de desenvolvimento e ganho de peso que se concentram entre 26° C e 30°C (EL-SAYED et al.,2008, AZAZA et al., 2008), sendo a morte observada quando em temperaturas inferiores a 8°C (HENSON et al., 2018). Tendo em vista a capacidade de troca térmica com o ambiente, Stevens e Fry (1970) verificaram que a tilapia-mossambica (*Oreochromis mossambicus*) apresentava temperatura média de 0,44°C acima da temperatura da água quando a aferição era realizada na musculatura e 0,45°C quando realizada no encéfalo. Baixas temperaturas reduzem a resposta imune da tilápia e propiciam a infecção por patógenos. Temperaturas abaixo de 25°C provocam queda na contagem de linfócitos totais, como demonstrado por Atwood e colaboradores (2003). Além disso diversos outros componentes do sistema imune inato e adaptativo sofrem a ação da temperatura, como: proteínas do sistema complemento, apresentação de antígenos, fagocitose, produção de imunoglobulina, entre outros, que são observados em teleósteos de forma geral (ABRAM et al., 2017, NDONG et al., 2007).

As formas de cultivo utilizadas na cultura da tilápia são diversas, no entanto, as mais utilizadas no Paraná são o método de cultivo em tanques rede e em tanques escavados (HESS, 2015). A utilização de tanques escavados se caracteriza pela formação de uma cavidade seguida da preparação do solo para ser preenchida com água e receber os peixes. A manutenção deste substrato é realizada por meio da desinfecção utilizando a luz solar e a aplicação de cal (CaO) como forma de controlar a presença de patógenos e melhorar a qualidade da água (ARAÚJO-SILVA et al., 2014). A criação em tanques redes veio como uma forma de tecnologia para aumentar a densidade da criação de tilápias e intensificar o manejo dos animais. Os tanques rede consistem em gaiolas de plástico ou metal que podem ser mantidas suspensas por meio de boias na superfície do corpo d'água (ROJAS e WADSWORTH, 2007). As gaiolas contendo os peixes são bastante utilizadas em represas artificiais ou corpos d'água naturais e, no caso de espécies marinhas,

próxima à costa (ROJAS e WADSWORTH, 2007). Os peixes mantidos em tanque rede apresentam uma prediposição maior a interferir no meio onde estão inseridos, tanto pela possibilidade de contaminação da fauna nativa por agentes infecciosos e parasitários, quanto pela eutrofização local causada pelas excretas e sobras alimentares da criação (BEVERIDGE, 1984). Este contato com o ambiente externo também favorece a fuga e a inserção da tilápia no meio ambiente quando as gaiolas não recebem manutenção adequada, e também por despesca, quando é realizada de forma incorreta (AZEVEDO-SANTOS et al., 2011).

A ampla distribuição da tilápia-do-nilo numa região endêmica para a PCM torna esta espécie uma potencial candidata para a detecção indireta do fungo no meio aquático. Apesar do isolamento de *P.brasiliensis* do solo são necessárias maiores investigações para a identificação dos possíveis habitats e interações eco-epidemiológicas deste microorganismo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Detectar a infecção natural por *Paracoccidioides sp.* em tilápias-do-nilo.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar a presença de anticorpos para *Paracoccidioides sp.* em tilápias por meio de ELISA utilizando gp43 como antígeno.
- Detectar a infecção por *Paracoccidioides sp.* em tilápias por meio de PCR.
- Determinar a identidade do material amplificado a partir da região ITS de amostras obtidas de rim, fígado e encéfalo de tilápias-do-nilo com isolados de *Paracoccidioides sp.* e fungos filogeneticamente próximos.

### **3 ARTIGO I PARA PUBLICAÇÃO (MEDICAL MYCOLOGY)**

O presente manuscrito está formatado segundo as normas do periódico *Mycoses*.

Os resultados obtidos estão descritos no artigo intitulado "*First report of Infection by Paracoccidioides brasiliensis in Fish*".

## First Report of *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Fish

Igor Massahiro de Souza Suguiura<sup>1</sup>, Rafaela Macagnan<sup>1</sup>, Aline Myuki Omori<sup>1</sup>, Elder Luis Buck<sup>2</sup>, Josiane Aniele Scarpassa<sup>3</sup>, Lucienne Garcia Pretto-Giordano<sup>4</sup>, Laurival Antônio Vilas-Boas<sup>3</sup>, Zoilo Pires de Camargo<sup>5</sup>, Eiko Nakagawa Itano<sup>1</sup>, Mario Augusto Ono<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, PR 445 Km 380, Londrina, Paraná, Brazil

<sup>2</sup> Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, PR 445 Km 380, Londrina, Paraná, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, PR 445 Km 380, Londrina, Paraná, Brazil

<sup>4</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, PR 445 Km 380, Londrina, Paraná, Brazil

<sup>5</sup> Disciplina de Biologia Celular, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

Short Title: Paracoccidioidomycosis in Fish

Corresponding author: Mario Augusto Ono Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, PR 445 Km 380, Londrina, Paraná, Brazil.

Phone: +55-43-33714982 E-mail: [marioono@uel.br](mailto:marioono@uel.br).

### Summary

The thermo-dimorphic fungus *P. brasiliensis* is the etiological agent of paracoccidioidomycosis (PCM), a deep mycosis endemic in Latin American countries that affects mainly male rural workers. Infection by *P. brasiliensis* has also been reported in several species of terrestrial animals, however, the capacity of the fungus to infect aquatic organisms is poorly known. Therefore, the objective of this study was to evaluate infection by *P. brasiliensis* in a fish species. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) was the species chosen for this study because it is the most farmed and widely distributed fish in endemic areas for human PCM. As a first step, the humoral immune response against the fungus was evaluated. A group of three fish were immunized with inactivated *P. brasiliensis* yeast cells and all the fish produced antibodies against the fungus. Serum samples of Nile tilapia collected from a fish slaughterhouse were evaluated by ELISA using gp43 as antigen for detection of antibodies against *P. brasiliensis*. Nile tilapia raised in cages (n=109) and in ponds (n=105) showed 17.4 and 5.7% positivity, respectively. Due to the higher seropositivity observed in caged fish, 100 tissue samples (encephalon, liver and kidney), from another group of tilapia raised in cages, were analyzed by PCR (Pb-ITSR and Pb-ITSE). Three samples (liver n=1, kidney n=1 and encephalon n=1) from three different fish were positive. This is the first report to show serological and molecular evidence of *P. brasiliensis* infection in a fish species.

Key words: Paracoccidioidomycosis, fish, Nile tilapia, infection, eco-epidemiology

## Introduction

*P. brasiliensis* is a thermally dimorphic fungal pathogen that causes

paracoccidioidomycosis (PCM), the most prevalent human systemic mycosis in Latin American countries, mainly in Brazil.<sup>1</sup>

Infection by *P. brasiliensis* has been described in a wide variety of warm-blooded species such as dogs<sup>2</sup>, cats<sup>3</sup>, rabbits<sup>4</sup>, chickens<sup>5</sup>, livestock<sup>6,7,8,9,10</sup>, wild small mammals<sup>11</sup>, monkeys<sup>12</sup>, and armadillos<sup>13</sup>. Although the soil has been suggested as the fungus habitat based on the few reports of *P. brasiliensis* isolation from this source in Brazil<sup>14,15</sup>, Argentina<sup>16</sup> and Venezuela<sup>17</sup>, an aquatic habitat was suggested by Restrepo<sup>18</sup> and Conti-Diaz<sup>19</sup>.

Epidemiological studies indicate the presence of *P. brasiliensis* in very humid areas such as close to water courses and regions with significant rainfall<sup>20</sup>. In addition, the optimal *in vitro* growth in high humid conditions suggests a very humid microniche for *P. brasiliensis*<sup>20</sup>. In this way, the study of aquatic species and their possible role in the *P. brasiliensis* eco-epidemiology could contribute to the clarification of the fungus habitat.

Nile tilapia (*O. niloticus*), an African species, is the most farmed fish in Paraná, Brazil<sup>21</sup>. The wide spread of this cichlid in an endemic area for paracoccidioidomycosis, such as the state of Paraná, could make the tilapia a good indicator for the presence of *P. brasiliensis* in the aquatic environment.

Cage and pond farming are the main systems used for tilapia culture in Paraná state. Earthen ponds are still widely used for tilapia farming, although cage culture is expanding under intensive systems<sup>22</sup>. Fish cages are placed in water bodies such as rivers, lakes and ponds to raise and harvest fish in a small area. Therefore, the objective of this study was to detect infection by *P. brasiliensis* in Nile tilapia (*O. niloticus*) raised in ponds and cages from the northern region of Paraná state, Brazil.

## Materials and methods

### Serum Samples

Serum samples were collected from apparently healthy adult Nile tilapia (n=214) by gill section after ice desensitization in a commercial fish slaughterhouse. The fish came from fish farms, ponds (n=105) and cages (n=108), from the northern region of Paraná state. The blood was collected and centrifuged and the serum stored at -20° C. This study was approved by the Animal Ethics Committee of the State University of Londrina (CEUA N° 31899.2013.48).

### Fish Immunization

Three female tilapia (*O. niloticus*), weighing 120 to 200g, were kept in a 400 L plastic tank and fed daily to satiation with commercial tilapia feed. The fish were anesthetized with eugenol 75 mg L<sup>-1</sup> by immersion and inoculated by intraperitoneal route with *P. brasiliensis* B-339 (1x10<sup>7</sup> inactivated yeast cells) in Incomplete Freund Adjuvant (Sigma, St Louis, USA) on days 0, 7 and 14. Blood samples were collected by caudal vein puncture on days 0, 7, 14 and 21. The statistical analysis was performed with IBM SPSS Statistics 20 program and the data were analyzed by the Student's *t*-test. The values of  $P \leq 0.05$  were considered statistically significant.

### Indirect ELISA with gp43

Polystyrene flat-bottom microtiter plates (Costar Corporation, NY, USA) were coated with Immunoaffinity purified gp43 in 0.1 M carbonate buffer, pH 9.6 (250 ng well<sup>-1</sup>) at 4 °C overnight. The plates were washed with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1 % Tween (PBS-T) and blocked with PBS-T 5 % skim milk (PBS-T-M). After washing with PBS-T, the serum samples were diluted 1:100 in PBS 1 %

skim milk (PBS-T-M) and incubated at 25 °C for 1 h. The plates were washed and incubated at 25 °C for 1 h with rabbit IgG anti-tilapia antibody, then washed again and incubated at 25 °C for 1 hour with anti-rabbit IgG peroxidase conjugate (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). After washing with PBS-T, a solution of substrate/chromogen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/tetramethylbenzidine) was added. The reaction was stopped with 4 NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and absorbance was measured at 450 nm. The serum samples were considered positive with two and half times the absorbance of the well without serum. The positive control used in the study was the serum from a tilapia immunized with *P. brasiliensis*. The statistical analysis was performed with IBM SPSS Statistics 20 program and the data were analyzed by the Pearson chi-square test. The values of  $P \leq 0.05$  were considered statistically significant.

### **DNA Samples**

DNA samples (n=100) were extracted from tissues (liver n=33, encephalon n=32, kidney=35) of Tilapia raised in cages from the Paranapanema river basin, Paraná, Brazil (371 m mean altitude, 22°C mean annual temperature and 1263 mm mean annual rainfall). The samples were processed according to Corredor et al.<sup>23</sup> with modifications, using phenol and proteinase K (Sigma-Aldrich, St Louis, USA).

### **PCR analysis**

PCR was performed according to Theodoro et al.<sup>24</sup> with the primers Pb-ITSR (5'-AAGGGTGTTCGATCGAGAGAG-3') and Pb-ITSE (5'-GAGCTTTGACGTCTGAGACC-3') under the annealing temperature of 62° C. The set of primers were designed to amplify a 387-bp region of the *P. brasiliensis* DNA. The reaction was performed with GoTaq (Promega, Madison, USA), using the isolate

B-339 as a positive control and as negative control the reaction was performed without adding DNA. Electrophoresis was performed in polyacrylamide with 100 bp ladder (Invitrogen, Carlsbad, USA) and visualized by silver nitrate staining. The products of positive samples were purified with ammonium acetate and sequenced by the Sanger method using Big Dye Terminator Sequencing Kits (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). The sequencing analysis was performed using the BioEdit program, and the sequence of nucleotides obtained was compared with the National Center database for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) searched through BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### **Phylogenetic grouping**

For the phylogenetic analysis, were used the sequences of amplicons obtained in this study (n=3), *P. brasiliensis* (n=13), *P. lutzii* (n=4), and fungi belonging to the *Paracoccidioides* family (*Ajellomycetaceae*) (n=6): *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatidis*, *Emmonsia crescens* and also *Lacazia loboi* (n=2). DNA sequences (n= 25) of the ITS 1 and 2 regions were obtained on GenBank and used to generate the phylogenetic tree. *Cryptococcus neoformans* was used as outgroup to root the tree. The sequences were aligned using MegaX and the phylogenetic tree was automatically constructed by the Jukes-Cantor model and analyzed by the maximum likelihood method. The percentage of the branch similarity from each cluster was supported through the distances of 1000 bootstrapped datasets.

## Results

All of three tilapias inoculated with inactivated cells of *P. brasiliensis* showed a significant increase in antibody response against gp43, ( $p < 0.05$ ) (Fig 1).

The analysis of 204 Tilapia serum samples by indirect ELISA showed a positivity of 11.7% to *P. brasiliensis*. The difference in positivity between fish cultured in ponds (5.7%) and cages (17.4%) was statistically significant ( $p < 0.05$ ) (Table 1).

The analysis of 100 tissue samples from tilapia farmed in cages (liver, encephalon and kidney) by PCR, showed three positive results each one from a different fish, (Fig. 2). These sequence data have been submitted to the GenBank databases ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)) under accession number MN025351, MN025352, and MN025353: liver, encephalon, and kidney, respectively. All the positive samples showed 100% similarity with *P. brasiliensis* isolates (access: [KP636451.1](#) ; [KJ540974.1](#); [KJ540973.1](#); [KJ540971.1](#); [JQ675762.1](#)), after analyzing the sequencing results on BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

The sequences derived from this study were placed with *P. brasiliensis* in the same cluster in the phylogenetic tree generated from the comparison of the ITS 1 and 2 regions (Fig. 3).

## Discussion

Taking into account that gp43 is the main antigen used for serological detection of *P. brasiliensis* infection, as a first step, the antibody response of Nile Tilapia inoculated with *P. brasiliensis* was evaluated. A significant response was observed in all of the fish from day 0 to 21<sup>st</sup>. One of three tilapia showed a higher response to the immunization compared to the others. (Fig. 1).

The caged fish showed higher percentage of positivity against gp43 than those raised in ponds (see Table1), probably because fish cultured in cages are often under stress due to high stocking density that is related to immunosuppression<sup>25</sup>. In addition, fish kept in ponds could be less exposed to the fungus infection. One explanation for that is spreading quicklime (CaO) and sun exposure to the bottom of the tank as a routine procedure for building ponds and maintaining nurseries prior to the introduction of a new batch of fish.<sup>26,27</sup> Quicklime and sunlight act as disinfectant and they could affect any viability of soil microbiota. The competition among the aquatic microorganisms and *P. brasiliensis* could be more intense because of the lower water renewal rates in the ponds when compared to rivers, this could be another explanation for the lower infection observed in tilapia raised in ponds.

The detection of antibodies against gp43 and *P. brasiliensis* DNA in *O. niloticus* reinforces the hypothesis that the fungus can infect heterothermal aquatic organisms, as proposed by Conti-Diaz et al.<sup>19,28</sup> The infection could occur through contact with *P. brasiliensis* propagules carried by surface runoff from the soil that surrounds water bodies. De Bedout et al.<sup>29</sup> showed that *P. brasiliensis* can develop in distilled water and therefore viable fungus propagules could be present in waters of rivers and lakes.

Studies in dolphins showed the presence of *P. brasiliensis* yeast-like cells in granulomatous skin lesions diagnosed as leishmaniasis. Minakawa et al.<sup>30</sup> identified yeast cells morphologically similar to *P. brasiliensis* in a white-sided dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*) in Japan. Vilela et al.<sup>31</sup> also identified yeast-like cells of *P. brasiliensis* in tissue samples from six bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the USA. The molecular analysis of the isolate from the Japanese dolphin showed

99% homology with a partial sequence of *P. brasiliensis* gp43 while Vilela et al. observed 100% identity of the fungus with *P. brasiliensis*.

The DNA detected by the PCR from the fish tissues showed 100% similarity with *P. brasiliensis* isolates belonging to the S1 cryptic species, such as Pb 18 and T16BI ([access: KJ540973.1](#), [JQ675762.1](#)).<sup>32</sup> The sequences obtained from tilapia, strongly supported by the bootstrap, were grouped in the same *P. brasiliensis* cluster showing high similarity among the group (Fig. 3). This result suggests that there is not high variability among these different *P. brasiliensis* sequences obtained in GenBank and those obtained in this study. The result suggests a lack of differentiation among *P. brasiliensis* obtained from different origins such as environmental, human patients and animals, using the sequences amplified by this set of primers. As shown in this analysis the ITS region was able to differentiate the *P. brasiliensis* from other members of the *Ajellomycetaceae* family such as *Histoplasma*, *Emmonsia* and *Blastomyces*.

Low body temperature apparently is not a barrier to infection by *P. brasiliensis*. Even in mammal species different temperature range does not appear to impair the fungus infection as described in several studies of PCM in armadillos<sup>13,23,33</sup> (Fernandes 2004, Corredor 1999, Bagagli 2003) whose body temperature ranges from 32°C to 34°C.<sup>34</sup>

Stevens and Fry<sup>35</sup> studied the rate of thermal exchange in mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and observed a body temperature of 0.4°C above the tank temperature. Nile tilapia grows better at 26 to 30°C,<sup>36,37</sup> therefore its body temperature probably would not reach the internal temperature of either mammals and birds. In addition, the fish immune response<sup>38,39,40</sup> is affected by temperature

changes below or above the optimal, which could increase susceptibility to pathogens.

Infection by *P. brasiliensis* by intestinal route after ingestion of infected fish is unlikely. A study showed that mice experimentally infected by oral route with *P. brasiliensis* propagules did not develop disease even when associated with intestinal lesions caused by *Trichinella spiralis*.<sup>41</sup> Greer and Bolaños<sup>42</sup> cultivated the stomach, upper intestine, lower intestine and rectum of frugivorous bats, *Artibeus lituratus*, that ingested viable yeast cells of *P. brasiliensis* and observed that the fungus was unable to survive more than 8h in the digestive tract.

In brief, we can conclude that tilapia is infected by *P. brasiliensis*. The results indicate the presence of the fungus in the aquatic environment and its capacity to infect fish.

### **Acknowledgements**

Mario Augusto Ono are recipients of the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; Brazil) fellowships and grants.

### **Conflict of Interest**

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

## References

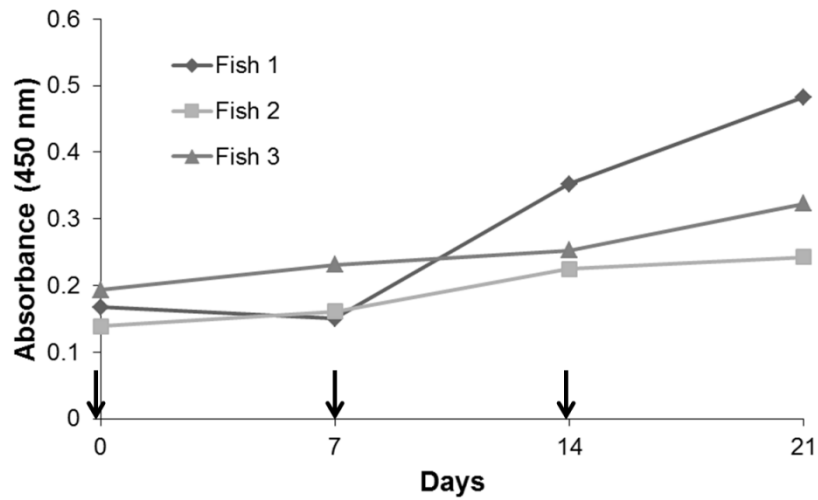
1. San-Blas G, Niño-Vega G, Iturriaga T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: Molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol.* 2002;40(3):225-242.
2. Teles A, Klafke G, Cabana Â, Albano A, Xavier M, Meireles M. Serological investigation into *Paracoccidioides brasiliensis* infection in dogs from southern Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathologia.* 2015;181(3-4):323-328.
3. de Oliveira G, Belitardo D, Balarin M, Freire R, de Camargo Z, Ono M. Serological survey of paracoccidioidomycosis in cats. *Mycopathologia.* 2013;176(3-4):299-302.
4. Belitardo D, Calefi A, Sbeghen M et al. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Mycoses.* 2013;57(4):222-227.
5. Oliveira G, Silveira L, Itano E et al. Serological evidence of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in chickens from Paraná and Mato Grosso do Sul states, Brazil. *Mycopathologia.* 2010;171(3):197-202.
6. Silveira L, Paes R, Medeiros E, Itano E, Camargo Z, Ono M. Occurrence of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in dairy cattle from Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mycopathologia.* 2008;165(6):367-371.
7. Belitardo D, Calefi A, Borges I et al. Detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in free-range domestic pigs (*Sus scrofa*). *Mycopathologia.* 2014;177(1-2):91-95.
8. Albano A, Klafke G, Brandolt T et al. Seroepidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in horses from Rio Grande do Sul, Brazil. *Braz J of Microbiol.* 2015;46(2):513-517.

9. Oliveira G, Navarro I, Freire R et al. Serological survey of paracoccidioidomycosis in sheep. *Mycopathologia*. 2011;173(1):63-68.
10. Ferreira J, Navarro I, Freire R et al. Evaluation of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in dairy goats. *Mycopathologia*. 2013;176(1-2):95-99.
11. Sbeghen M, Zanata T, Macagnan R et al. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in small wild mammals. *Mycopathologia*. 2015;180(5-6):435-440.
12. Corte A, Svoboda W, Navarro I et al. Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Paraná State, Brazil. *Mycopathologia*. 2007;164(5):225-228.
13. Fernandes G, Deps P, Tomimori-Yamashita J, Camargo Z. IgM and IgG antibody response to *Paracoccidioides brasiliensis* in naturally infected wild armadillos (*Dasypus novemcinctus*). *Med Mycol*. 2004;42(4):363-368.
14. Shome SK, Batista AC. Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* in the soil of Recife, Brazil. *Rev Fac Med Fed Ceará*. 1963;3:90-94.
15. Silva-Vergara, ML, Martinez R, Chadu A, Madeira M, Freitas-Silva G, LeiteMaffei CM. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, state of Minas Gerais, Brazil. *Med Mycol*. 1998;36(1):37-42.
16. Negroni P. The *Paracoccidioides brasiliensis* lives saprophytically in the soil of Argentina. *Prensa Med Argent*. 1966;53(39):2381.
17. de Albornoz M. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Med Mycol*. 1971;9(3):248-253.
18. Restrepo M A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Med Mycol*. 1985;23(5):323-334.
19. Conti-Díaz I A, Rilla F D. Hipótesis sobre el nicho ecológico de *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev Med Urug*; 1989;5:97-103.

20. Restrepo A, McEwen J, Castañeda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle?. *Med Mycol.* 2001;39(3):233-241.
21. IBGE. In: *Pesquisa da Pecuária Municipal | Estatísticas | IBGE :: Instituto brasileiro de geografia e estatística.* 2017. <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=resultados>. Accessed December 13, 2018.
22. Gupta MV, Acosta BO. A review of global tilapia farming practices. *Aquac Asia.* 2004;9:7-12.
23. Corredor GG, Castaño JH, Peralta LA, Díez S, Arango M, McEwen J, Restrepo A. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. *Rev Iberoam Micol.* 1999;16:216–220.
24. Theodoro R, Candeias J, Araújo J et al. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. *Med Mycol.* 2005;43(8):725-729.
25. Ashley PJ. Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Appl Anim Behav Sci.* 2007;104(3-4):199-235.
26. Pouomogne V, Ombredane D. Effect of feeding frequency on the growth of tilapia (*Oreochromis niloticus*) in earthen ponds. *Tropicultura.* 2001;19(3):141-146.
27. Araújo-Silva S, Moraes M, Carmo C, Osti J, Vaz-dos-Santos A, Mercante C. Effluent of a polyculture system (tilapias and shrimps): Assessment by mass balance of nitrogen and phosphorus. *J Environ Prot.* 2014; 5:799-804.
28. Conti Días I. On the unknown ecological niche of *Paracoccidioides brasiliensis*: our hypothesis of 1989: Present status and perspectives. *Rev Inst Med Trop de Sao Paulo.* 2007;49(2):131-134.

29. de Bedout C, Cano L, Tabares A, Van de Ven M, Restrepo A. Water as a substrate for the development of *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. *Mycopathologia*. 1986;96(2):123-130.
30. Minakawa T, Ueda K, Tanaka M et al. Detection of multiple budding yeast cells and a partial sequence of 43-kDa glycoprotein coding gene of *Paracoccidioides brasiliensis* from a case of leishmaniasis in a female pacific white-sided dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*). *Mycopathologia*. 2016;181(7-8):523-529.
31. Vilela R, Bossart G, St. Leger J et al. Cutaneous granulomas in dolphins caused by novel uncultivated *Paracoccidioides brasiliensis*. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(12):2063-2069.
32. Roberto T, Rodrigues A, Hahn R, de Camargo Z.. Identifying *Paracoccidioides* phylogenetic species by PCR-RFLP of the alpha-tubulin gene. *Med Mycol*. 2015;54(3):240-247.
33. Bagagli E, Franco M, Bosco, SDM, Hebel-Barbosa F, Trinca, LA, Montenegro MR. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. *Med Mycol*. 2003;41(3):217-223.
34. Talmage RV, Buchanan GD. The armadillo *Dasypus novemcinctus* - a review of its natural history, ecology, anatomy and reproductive physiology. *Rice Inst*. 1954;41:1-135.
35. Stevens E. Fry F. The rate of thermal exchange in a teleost, *Tilapia mossambica*. *Can J Zool*. 1970;48(2):221-226.

36. Azaza M, Dhraïef M, Kraïem M. Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in geothermal waters in southern Tunisia. *J Thermal Biol.* 2008; 33(2):98-105.
37. El-Sayed A, Kawanna M. Optimum water temperature boosts the growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry reared in a recycling system. *Aquac Res.* 2008;39(6):670-672.
38. Abram Q, Dixon B, Katzenback, B. Impacts of Low Temperature on the teleost immune system. *Biology.* 2017;6(4):39.
39. Le Morvan C, Troutaud D, Deschaux P. Differential effects of temperature on specific and nonspecific immune defences in fish. *Expe Biol.* 1998; 201:165-168.
40. Atwood H., Tomasso J, Webb K, Gatlin D. Low-temperature tolerance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: effects of environmental and dietary factors. *Aquac Res.* 2003;34(3):241-251.
41. Mackinnon, J. Pathogenesis of south american blastomycosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1959;53(6):487-494.
42. Greer D, and Bolaños, B. Role of bats in the ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: The survival of *Paracoccidioides brasiliensis* in the intestinal tract of frugivorous bat, *Artibeus lituratus*. *Med Mycol.* 1977;15(3):273-282.

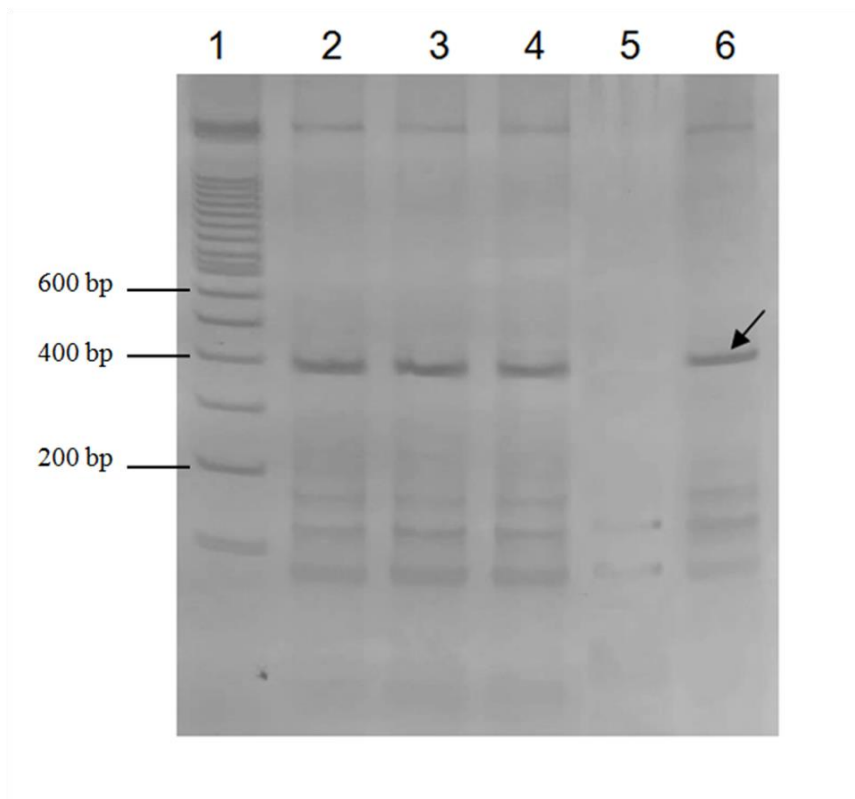


**Figure 1** – Antibody response in three Nile tilapia inoculated with inactivated *P. brasiliensis* cells, evaluated by indirect ELISA using gp43 as antigen. The arrows indicate the days of inoculation. Statistically significant ( $t$ -test;  $p=0.0026$ ) differences were calculated from the comparisons between day 0 (control group) and day 21<sup>st</sup> after prior immunization.

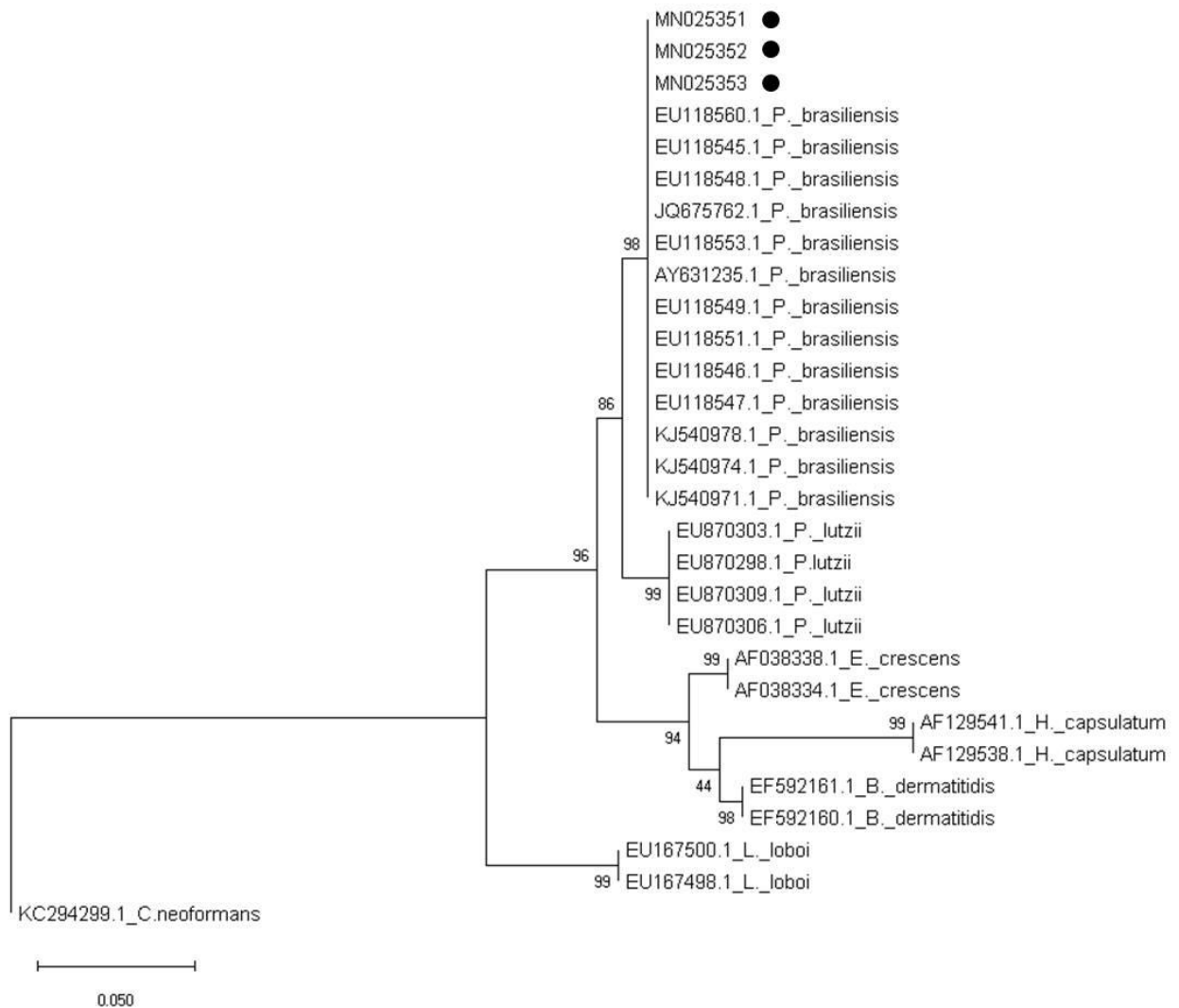
**Table 1** – Reactivity of the serum samples from fish to *P. brasiliensis* gp43 antigen evaluated by indirect ELISA according to source farm.

Fish farm	Positive		Negative		Total
	n	%	n	%	n
Pond	6	5.7	99	94.3	105
Cage	19	17.4	90	82.6	109
Total	25	11.7	189	88.3	214

P value = 0.008



**Figure 2** - Positive samples after PCR in SDS-PAGE with silver nitrate staining. Lane: [1] 100 bp ladder, [2] Liver, [3] kidney, [4] Encephalon, [5] Negative control, [6] Positive control (*P. brasiliensis* B-339). The arrow indicates a region of amplification of 387-bp.



**Figure 3.** Phylogenetic tree of ITS regions 1 and 2 of several sequences obtained from GenBank (accession numbers are given) and the 3 sequences derived from this study (black dots). The sequence of *C. neoformans* was used to outgroup. The tree was generated by the Jukes Cantor method and analyzed by the maximum likelihood method. The bootstrap values from 1,000 resamplings are indicated along the branches. Scale bar indicates nucleotide substitutions per site. The three sequences derived from this study were grouped with *P. brasiliensis*.

## CONCLUSÃO

Tilápias-do-nilo imunizadas com células de *P.brasiliensis* foram capazes de desenvolver resposta imune com a produção de anticorpos contra gp43.

Os resultados obtidos através da sorologia, utilizando como antígeno gp43, indicam a infecção por *P. brasiliensis* em peixes, sendo aqueles criados em tanques rede apresentaram maior positividade, observada no ELISA, quando em comparação aos peixes de tanque escavado.

A amplificação do DNA fúngico a partir de amostras de encéfalo, fígado e rim de tilápias-do-nilo demonstram indiretamente a presença do fungo no meio aquático e ainda a sua capacidade de infectar de forma natural uma espécie ectotérmica. Este estudo conseguiu identificar a ocorrência da infecção natural por *Paracoccidioides brasiliensis* em tilápias-do-nilo oriundas da região norte do Paraná.

Utilizando-se a região ITS, foi possível agrupar as sequências de DNA obtidas neste estudo no mesmo cluster de diferentes sequências obtidas à partir de amostras ambientais, animais e humanas de *P. brasiliensis*, sendo possível a sua diferenciação de outros fungos filogeneticamente próximos.

## REFERÊNCIAS

- ABRAM, Q.; DIXON, B.; KATZENBACK, B.. Impacts of low temperature on the teleost immune system. **Biology**, v. 6, n. 4, p. 39, nov. 2017.
- ALBORNOZ, M. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, [S. l.], v. 9, n.3, p. 248-253, jun. 1971.
- ARANTES, T. D.; et al. Detection of *Paracoccidioides* spp. in environmental aerosol samples. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 51, n. 1, p. 83-92, jan 2013.
- ARANTES, T. D.; et al. Environmental mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil reveals new clues into genetic diversity, biogeography and wild host association. **Plos One Neglected Tropical Diseases**, v.10, n.4, p. 1-18, abr. 2016.
- ARAÚJO-SILVA, S.L. et al. Effluent of a polyculture system (tilapias and shrimps): assessment by mass balance of nitrogen and phosphorus. **Journal of Environmental Protection**, v. 5, n. 10, p. 797, jul. 2014.
- ALBANO, A. P.; et al. Wild animals as sentinels of *Paracoccidioides brasiliensis* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mycopathologia**, [S. l.], n. 3-4, v. 177, p. 207-2015, abr. 2014.
- ATWOOD, H. L. et al. Low-temperature tolerance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: effects of environmental and dietary factors. **Aquaculture Research**, v. 34, n. 3, p. 241-251, jan. 2003.
- AZAZA, M. S.; DHRAIEF, M. N.; KRAIEM, M. M. Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in geothermal waters in southern Tunisia. **Journal of thermal Biology**, v. 33, n. 2, p. 98-105, fev. 2008.
- AZEVEDO-SANTOS, V.M.; RIGOLIN-SÁ, O.; PELICICE, F.M. Growing, losing or introducing? Cage aquaculture as a vector for the introduction of non-native fish in Furnas Reservoir, Minas Gerais, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 9, n. 4, p. 915-919, dez. 2011.
- BAGAGLI, E.; et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [S. l.], v. 58, n. 4, p.:505-512, abr. 1998.
- BAGAGLI, E.; et al. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Medical Mycology**, [S. l.], v.41, n. 3, p. 217-223, jun. 2003.

BAGAGLI, E.; et al. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infection Genetics and Evolution**, [S. l.], v.6, n. 5, p. 344-351, set. 2006.

BAGAGLI, E; et al. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, [S. l.], v.165, n. 4-5, p. 197-207, abr. 2008.

BARROZO L. V.; et al. First description of a cluster of acute/subacute Paracoccidioidomycosis cases and its association with a climatic anomaly. **Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4, n. 3, p. 643, mar. 2010.

BELITARDO, D.R.; et al. Detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in free-range domestic pigs (*Sus scrofa*). **Mycopathologia**, [S. l.], v.177, n.1-2, p. 91-95, fev. 2014.

BELITARDO, D. R.; et al. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Mycoses**, [S.l.], v. 57, n. 4, p. 222-227, abr. 2014.

BELLÍSSIMO-RODRIGUES, F.; et al. Paracoccidioidomycosis Epidemiological Features of a 1,000-Cases Series from a Hyperendemic Area on the Southeast of Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 85, n. 3, p. 546-550, set. 2011.

BELLÍSSIMO-RODRIGUES, F.; et al. Endemic paracoccidioidomycosis: Relationship between clinical presentation and patients' demographic features. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 51, n. 3, p. 313-318, abr. 2013.

BEVERIDGE, Malcolm CM. **Cage and pen fish farming: carrying capacity models and environmental impact**. Food & Agriculture Org., 1984.

BLOTA, M. H.; et al. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 61, n. 3, p. 390-394, set. 1999.

BOTTEON, F. A.; et al. *Paracoccidioides brasiliensis*-reactive antibodies in Brazilian blood donors. **Medical Mycology**, Oxford, v. 40, n. 4, p. 387-391, jul. 2002

BRUMMER, E.; et al. Murine model of paracoccidioidomycosis. Production of fatal acute pulmonary or chronic pulmonary and disseminated disease: immunological and pathological observations. **Journal of Experimental Pathology**, Oxford, v.1, n. 3, p.241-255, jan.1984.

BRUMMER, E.; CASTENEDA, E.; RESTERPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 89-117, abr.1993.

CAMARGO, Z.P.; et al.; Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion test. **Journal of Clinical Microbiology**, [S.l.], n.26, v. 10, p. 2147-2151, out. 1988.

CAMPOS, M. V. S. **Estudo de pacientes com paracoccidioidomicose e a co-infecção paracoccidioidomicose HIV/AIDS, assistidos no Hospital Universitário de Brasília entre 1984 e 2005**. 2011. f.136. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas). Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília.

CANONICO, G.C. et al. The effects of introduced tilapias on native biodiversity. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 15, n. 5, p. 463-483, set. 2005.

CONTI-DIAZ, I. A.; et al. Intradermal reaction survey with paracoccidioidin and histoplasmin in horses. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.14, n. 6, p. 372-376, nov.1972.

CONTI-DÍAZ, I.A.; RILLA, F. D. Hipótesis sobre el nicho ecológico de *Paracoccidioides brasiliensis*. **Rev Méd Urug**, v. 5, p. 97-103, 1989.

CORREDOR, G. G.; et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. **Revista Iberoamericana de Micología**, [S. l.], São Paulo, n. 16, p. 216-220, dez. 1999.

CORREDOR, G. G.; et al. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis* molecular identification of the isolate. **Medical Mycology**, [S. l.], v.43, n. 3, p. 275-280, mai. 2005.

CORTE A. C.; et al. Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Paraná State, Brazil. **Mycopathologia**, [S.l.], n.164, v.5, p. 225-228, nov. 2007.

COSTA E. O.; Fava-Netto, C. Contribution to the epidemiology of paracoccidioidomycosis and histoplasmosis in the State of São Paulo, Brazil. Paracoccidioidin and Histoplasmin intradermic tests in domestic animals. **Sabouraudia**, [S.l.], v. 16, n.2, p. 93-102, jul.1978.

COSTA, E. O.; et al. Delayed hypersensitivity test with paracoccidioidin in captive Latin American wild mammals. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, [S. l.], v. 33, n.1, p. 39-42, jul.1995.

COWARD, K.; LITTLE, D. C. Culture of the 'aquatic chicken': present concerns and future prospects. **Biologist (London, England)**, v. 48, n. 1, p. 12-16, fev. 2001.

DE FARIAS, M. R.; et al. Paracoccidioomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly. **Mycopathologia**, v. 172, n. 2, p. 147-152, ago. 2011.

EL-SAYED, AF.; M.; KAWANNA, M. Optimum water temperature boosts the growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry reared in a recycling system. **Aquaculture Research**, v. 39, n. 6, p. 670-672, fev. 2008.

FAGUNDES, R. Q. **Pesquisa da paracoccidioomicose em cães (canis familiaris) na região endêmica de Botucatu, São Paulo**. 2002. f. 75. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu) –Universidade Estadual Paulista. Botucatu.

FAVA-NETTO, C.; et al. Contribuição para o estudo epidemiológico de blastomicose de Lutz. **Revista do Instituto Adolpho Lutz**, São Paulo, v. 21, p. 99-194, nov.1961.

FARIAS, M. R.; et al. Paracoccidioomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly. **Micopathologia**, [S. I.], v. 172, n 2, p. 147-152, mar. 2011.

FERREIRA, J. B.; et al. Evaluation of *Paracoccidiooides brasiliensis* Infection in Dairy Goats, **Mycopathologia**, [S.I.], v. 176, n. 1- 2, p. 95-99, ago. 2013.

FONTANA, F. F.; et al. Seroepidemiological survey of paracoccidioomycosis infection among urban and rural dogs from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Mycopathologia**, [S. I.], v. 169, n. 3, p. 159-165, mar. 2010.

GONZALES, J. F.; MONTIEL, N. A.; MAASS, R. L. First report on the diagnosis and treatment of encephalic and urinary paracoccidioomycosis in a cat. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, [S.I.], v.12, n.8, p. 659-662, ago. 2010.

GUTIERREZ, A. H.; et al. Encuesta sobre tuberculosis, histoplasmosis y paracoccidioomycosis en ganado lechero Del Valle Del Aburra. **Antiquina Medica**, [S.I.], v. 24, p. 339-358, jul.1974.

HEADLEY, S. A.; et al. *Paracoccidiooides brasiliensis*-associated dermatitis and lymphadenitis in a dog. **Mycopathologia**, [S.I.], v. 182, n. 3-4, p. 425-434, abr. 2017.

HESS, J. (2015). [online] **Atividade de Piscicultura no Paraná**. Sistemafaep.org.br. Available at: <http://sistemafaep.org.br/wpcontent/uploads/2015/06/AtividadesdepisciculturanoParana1.pdf> [Accessed 14 Dec. 2018].

HENSON, M.; ADAY, D.; RICE, J. Thermal Tolerance and Survival of Nile Tilapia and Blue Tilapia under Rapid and Natural Temperature Declination

Rates. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 147, n. 2, p. 278-286, dez. 2018.

JOHNSON, W. D.; LANG, C. M. Paracoccidioidomycosis (South American Blastomycosis) in a Squirrel Monkey (*Saimiri sciureus*). **Veterinary Pathology**, [S.I.], v. 14, p. 368-371, jul. 1977.

KERR, I. B.; DA COSTA, SC; ALENCAR, A. Experimental paracoccidioidomycosis in immunosuppressed mice. **Immunology letters**, v. 5, n. 3, p. 151-154, set. 1982.

MACKINNON, J. Pathogenesis of South American blastomycosis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. v.53, n.6, p. 487-494, 1959. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v.53, n.6, p. 487-494, nov. 1959.

MATUTE, D. R.; et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Molecular Biology and Evolution**, [S. I.], v.23. n. 1. p.65-73, jan. 2006.

MATUTE, D. R., et al. Microsatellite Analysis of Three Phylogenetic Species of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 6, p. 2153-2157, jun. 2006.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; et al. Antibody response to the 43KDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Mclean, v.43, n.2, p.200-206, ago. 1990.

IBGE (2017). **Pesquisa da Pecuária Municipal | Estatísticas | IBGE :: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. [online] Ibge.gov.br. Available at: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=resultados> [Accessed 13 Dec. 2018].

MINAKAWA, T.; et al. Detection of Multiple Budding Yeast Cells and a Partial Sequence of 43-kDa Glycoprotein Coding Gene of *Paracoccidioides brasiliensis* from a Case of Lacaziosis in a Female Pacific White-Sided Dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*). **Mycopathologia**, [S. I.], v. 181, n. 7-8, p. 523-529, ago. 2016.

NAIFF, R. D.; et al. Paracoccidioidomycose enzootica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no Estado do Pará. **Revista do Instituto Médico Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 28, n.1, p.19–27, fev. 1986.

NEGRONI, P. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente en El suelo Argentino. **Prensa Medica Argentina**, [S. I.], v. 53, n. 39, p. 2831-2832, jul. 1966.

NDONG, D. et al. The immune response of tilapia *Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 22, n. 6, p. 686-694, jun. 2007.

OLIVEIRA, G. G.; et al. Serological evidence of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in chickens from Paraná and Mato Grosso do Sul states, Brazil. **Mycopathologia**, [S. I.], v. 171, n. 3, p. 197-202, mar. 2011.

OLIVEIRA, G. G.; et al. Serological survey of Paracoccidioidomycosis in sheep. **Mycopathologia**, [S. I.], v. 173, p. 63-68, jan. 2012.

OLIVEIRA, G. G.; et al. Serological Survey of Paracoccidioidomycosis in Cats. **Mycopathologia**, [S. I.], v. 176, n. 3-4, p. 299-302, out. 2013.

ONO, M. A.; et al. Canine paracoccidioidomycosis: A seroepidemiologic study. **Medical Mycology**, [S. I.], v. 39, n. 3, p. 277-282, set. 2001.

ONO, M. A.; et al. Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by pesticides: Is this a partial explanation for the difficulty in isolating this fungus from the soil? **Medical Mycology**, [S. I.], v.40, n. 5, p. 493-499, jan. 2002.

ONO, M. A. et al.; Experimental paracoccidioidomycosis in dogs. **Medical mycology**, v. 41, n. 3, p. 265-268, jul. 2003.

PEDROSA, P. N. **Paracoccidioidomicose. Inquérito intradérmico com paracoccidioidin em zona rural do Estado do Rio de Janeiro**. 1976. Dissertação - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

PEREIRA Jr, H. R.; JORGE, W.; BAGAGLI, E.; Por que tatu?. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 199, p. 70- 73, nov. 2003.

PETRONI, T. F.; et al. Serological Evidence of Infection by *Paracoccidioides brasiliensis* in Dogs with Leishmaniasis. **Mycopathologia**, [S. I.], v. 182, n. 9- 10, p. 947-952, out. 2017.

PINZAN, C. F.; et al. Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Plos One**, [S. I.], v. 5, n. 5, mai. 2010.

PUCCIA, R.; et al. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infection and Immunology**, v. 53, n. 1, p. 199-206, jul. 1986.

PURTILO, D. T.; et al. The immune system of the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn). **The Anatomical Record**, [S. I.], v.181, n. 4, p. 725-734, abr. 1975.

RESTREPO, A.; JIMÉNEZ, B. E.; BEDOUT C. Survival of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells under microaerophilic conditions. **Sabouraudia**, [S. I.], v.19, n. 4, p. 301-305, nov. 1981.

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, nov. 1984.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, [S. I.], v.23. n.5, p. 323-334, out. 1985

RESTERPO, A.; McEWEN J. G.; CASTAÑEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Medical Mycology**, [S. I.], v. 39, n. 3, p. 233-241, jun. 2001.

RICCI, G.; et al. Canine paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**, [S. I.], v.42, n. 4, p. 379-383, ago. 2004.

RIOS-GONÇALES, A. J. LONDERO, A.T.; TERRA, G. M. F. Paracoccidioidomycosis in children in the state of Rio de Janeiro (Brazil). Geographic distribution and the study of a "reservarea". **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.40, n. 1, p. 11-13, fev. 1998.

ROJAS, A.; WADSWORTH, S. A review of cage aquaculture: Latin America and the Caribbean. **FAO Fisheries Technical Paper**, v. 498, p. 73, jan. 2007.

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. **Cladistic**, [S. I.], v. 26, p. 613-624, jan. 2010.

SBEGHEN, M. R., et al. *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Small Wild Mammals. **Mycophatologia**, [S. I.], v. 180, n. 5-6, p. 435-440, dez. 2015.

SCORZONI, L. et al. Comparison of virulence between *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* using *Galleria mellonella* as a host model. **Virulence**, v. 6, n. 8, p. 766-776, nov. 2015.

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

SHOME, S. K.; BATISTA, A. C. Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* In the soil of Recife (Brazil). **Revista da Faculdade de Medicina da Universidade do Ceará**, Fortaleza, v. 3, p. 90 – 94, abr. 1963.

SILVA-VERGARA, M. L.; et al. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 36, n.1, p. 37-42, fev. 1998.

SILVA-VERGARA, M. L. et al. The marsupial *Didelphis albiventris* is an improbable host of *Paracoccidioides brasiliensis* in endemic area of paracoccidioidomycosis in Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, p. 771-772, ago. 2001.

SILVEIRA, L. H.; et al. Occurrence of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in rom Mato Grosso do Sul, Brazil. **Mycopathologia**, [S. l.], v. 165, n.6, p.367-371, jun. 2008.

STEVENS, E. D; FRY, F. E. J. The rate of thermal exchange in a teleost, *Tilapia mossambica*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 48, n. 2, p. 221-226, set. 1970.

TEIXEIRA, M. M.; et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, [S. l.], v. 52, n. 2, p. 273-283, ago. 2009.

TEIXEIRA, M. M.; et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. **Medical mycology**, v. 52, n. 1, p. 19-28, jan. 2013.

TEIXEIRA, M. M.; et al. *Paracoccidioides* species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 10, p. e1004397, out. 2014.

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

THEODORO, R.C. et al. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. **Mediacal Mycology**, [S. l.], v. 43, n.8, p 725 – 729, dez. 2005.

TREJÓ-CHAVES, A. Disseminated paracoccidioidomycosis in a Southern two-toed sloth (*Choloepus didactylus*). **Journal of Comparative Pathology**, [S. l.], v. 144, n. 2-3, p. 231-234, abr. 2011.

VILELA, R.; et al. Cutaneous Granulomas in Dolphins Caused by Novel Uncultivated *Paracoccidioides brasiliensis*. **Emerging Infectious Diseases Journal**, Atlanta, v. 22, n. 12, p. 2063-2069, dez. 2016.

VILELA, R.; MENDOZA, L. Paracoccidioidomycosis ceti (Iacaziosis/lobomycosis) in dolphins. In: **Emerging and Epizootic Fungal Infections in Animals**. Springer, Cham, p. 177-196, jun. 2018.