



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

AÇUCENA VELEH RIVAS

**EVIDÊNCIAS SOROLÓGICAS E PADRÕES ESPACIAIS DE
EXPOSIÇÃO A *LEISHMANIA INFANTUM* E
PARACOCCIDIOIDES SPP. EM CÃES DE FOZ DO IGUAÇU,
BRAZIL**

AÇUCENA VELEH RIVAS

**EVIDÊNCIAS SOROLÓGICAS E PADRÕES ESPACIAIS DE
EXPOSIÇÃO A *LEISHMANIA INFANTUM* E
PARACOCCIDIOIDES SPP. EM CÃES DE FOZ DO IGUAÇU,
BRAZIL**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Mario Augusto Ono

Coorientador: Prof. Dr. Kelvinson Fernandes Viana

Londrina
2026

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

Rivas, Açucena Veleh.

EVIDÊNCIAS SOROLÓGICAS E PADRÕES ESPACIAIS DE EXPOSIÇÃO A LEISHMANIA INFANTUM E PARACOCCIDIOIDES SPP. EM CÃES DE FOZ DO IGUAÇU, BRAZIL / Açucena Veleh Rivas. - Londrina, 2026.
88 f. : il.

Orientador: Mario Augusto Ono.

Coorientador: Kelvinson Fernandes Viana.

Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2026.

Inclui bibliografia.

1. Paracoccidioidomicose - Tese. 2. Leishmaniose visceral - Tese. 3. Saúde Única - Tese. 4. Vigilância epidemiológica - Tese. I. Ono, Mario Augusto. II. Viana, Kelvinson Fernandes. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

CDU 574

AÇUCENA VELEH RIVAS

**EVIDÊNCIAS SOROLÓGICAS E PADRÕES ESPACIAIS DE
EXPOSIÇÃO A *LEISHMANIA INFANTUM* E *PARACOCCIDIOIDES*
SPP. EM CÃES DE FOZ DO IGUAÇU, BRAZIL**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Mario Augusto Ono

Coorientador: Prof. Dr. Kelvinson Fernandes Viana

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dra. Lilian Cristiane Baeza
Universidade Estadual do Oeste do Paraná –
UNIOESTE

Dra. Tatiane Ferreira Petroni
Instituto Adolfo Lutz – IAL, Araçatuba

Dr. Igor Massahiro de Souza Suguiura
Secretaria de Saúde do Paraná – SESA

Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 22 de abril de 2026.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mario Augusto Ono, pela orientação cuidadosa, pela confiança depositada em meu trabalho, pela disponibilidade e pelas valiosas contribuições científicas proporcionadas durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Kelvinson Fernandes Viana, pelas contribuições e apoio ao longo desta pesquisa; e à Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA) pela estrutura oferecida para as análises laboratoriais.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, pela dedicação à formação acadêmica. Aos colegas de laboratório de pesquisa, Dr. Igor Massahiro de Souza Suguiura e Dra. Giovana Gomes de Carvalho Ishiuchi, pelas contribuições e apoio ao longo dessa jornada.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite para participar da avaliação deste trabalho e pelas observações, sugestões e contribuições para o seu aprimoramento.

Aos profissionais do Centro de Controle de Zoonoses de Foz do Iguaçu, em especial ao Dr. André de Souza Leandro e à equipe do laboratório, pela disponibilidade, suporte técnico, científico e institucional, bem como pelo auxílio na coleta dos dados e das amostras utilizadas neste estudo.

À minha família, pelo amor incondicional, apoio constante, compreensão e incentivo ao longo de toda a minha trajetória acadêmica. Sou profundamente grata por estarem ao meu lado em todos os momentos, celebrando conquistas e oferecendo amparo nos períodos mais desafiadores.

Às minhas amigas Adrieli, Beatriz, Francieli e Renata, pelo apoio e pela disposição em ajudar, mesmo atuando em outras áreas da Biologia. Agradeço, sobretudo, por nunca duvidarem de mim, mesmo nos momentos em que eu mesma questioneei minha capacidade.

Ao Guga, pelo incentivo, por sempre me ouvir ao longo desses anos, quando nem eu mesma aguentava mais o assunto, pelas ideias e sugestões que auxiliaram na construção deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que estiveram presentes, direta ou indiretamente, nesta trajetória. A conclusão desta tese representa não apenas uma conquista acadêmica, mas também o resultado do apoio e da colaboração de muitas pessoas.

Aos meus animais, pela companhia constante e
pelo afeto incondicional ao longo desta
trajetória.

RESUMO

RIVAS, Açucena Veleh. **Evidências sorológicas e padrões espaciais de exposição a *Leishmania infantum* e *Paracoccidioides* spp. em cães de Foz do Iguaçu, Brazil.** 2026. 88 f. Tese (Patologia Experimental) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2026.

A presente tese busca contribuir para o avanço do conhecimento sobre a paracoccidioidomicose (PCM) em cães, tanto por meio da sistematização da produção científica disponível quanto pela geração de evidências originais em uma área de reconhecida importância epidemiológica. A tese foi estruturada em dois artigos científicos. O primeiro consistiu em uma revisão sistemática da literatura sobre infecção por *Paracoccidioides* spp. e PCM em cães, incluindo estudos experimentais, imunológicos, soroepidemiológicos e relatos de casos naturais. O segundo correspondeu a um estudo observacional realizado em Foz do Iguaçu, Paraná, no qual foram analisadas 250 amostras de soro canino por imunodifusão radial dupla (ID), avaliação clínica e análise espacial por densidade de Kernel, com comparação entre cães positivos e negativos para *Leishmania infantum*. Os resultados da revisão demonstraram que os cães são frequentemente expostos a *Paracoccidioides* spp. em áreas endêmicas, com elevadas taxas de soropositividade, embora a progressão para PCM clínica aparente ser rara. Os estudos experimentais confirmaram suscetibilidade biológica, mas com desfechos heterogêneos, enquanto os relatos de caso evidenciaram formas sistêmicas, cutâneas e mucocutâneas semelhantes às observadas em humanos. No estudo de campo, a leishmaniose visceral canina apresentou alta soroprevalência (35,6%), enquanto anticorpos contra *Paracoccidioides* spp. foram detectados em 8,4% dos cães, todos também soropositivos para *L. infantum*, com associação significativa entre os agentes e distribuição espacial heterogênea e agrupada. Conclui-se que os cães atuam como indicadores epidemiológicos relevantes da exposição ambiental a *Paracoccidioides* spp., sendo úteis para a vigilância sob a perspectiva de Saúde Única, e que a associação observada com *L. infantum* em áreas endêmicas reforça a necessidade de abordagens integradas de vigilância e de estudos adicionais para aprofundar a compreensão dessa interface epidemiológica.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose; leishmaniose visceral; Saúde Única; vigilância epidemiológica; imunodifusão dupla.

ABSTRACT

RIVAS, Açucena Veleh. **Serological evidence and spatial patterns of exposure to *Leishmania infantum* and *Paracoccidioides* spp. in dogs from Foz do Iguaçu, Brazil.** 2026. 88 p. Thesis (Postgraduate in Experimental Pathology) – Center for Biological Sciences, State University of Londrina, Londrina, 2026.

This thesis aims to contribute to the advancement of knowledge on paracoccidioidomycosis (PCM) in dogs by both systematizing the available scientific evidence and generating original data in a region of recognized epidemiological relevance. The thesis is structured into two scientific articles. The first comprises a systematic review of the literature on *Paracoccidioides* spp. infection and PCM in dogs, including experimental, immunological, seroepidemiological studies, and reports of naturally occurring cases. The second consists of an observational study conducted in Foz do Iguaçu, Paraná, in which 250 canine serum samples were analyzed through double immunodiffusion (DID), clinical evaluation, and spatial analysis using Kernel density estimation, comparing dogs positive and negative for *Leishmania infantum*. The findings of the review indicate that dogs are frequently exposed to *Paracoccidioides* spp. in endemic areas, with high rates of seroreactivity, although progression to clinical PCM appears to be uncommon. Experimental studies have demonstrated biological susceptibility, albeit with heterogeneous outcomes, while case reports describe systemic, cutaneous, and mucocutaneous manifestations similar to those observed in humans. In the field study, canine visceral leishmaniasis showed a high seroprevalence (35.6%), whereas antibodies against *Paracoccidioides* spp. were detected in 8.4% of the dogs, all of which were also seropositive for *L. infantum*. A significant association between the pathogens was observed, along with a heterogeneous and spatially clustered distribution. It can be concluded that dogs are relevant epidemiological indicators of environmental exposure to *Paracoccidioides* spp., making them valuable for surveillance from a One Health perspective, and that the observed association with *L. infantum* in endemic areas highlights the need for integrated surveillance strategies and further studies to better understand this epidemiological interface.

Keywords: Paracoccidioidomycosis; visceral leishmaniasis; One Health; epidemiological surveillance; double immunodiffusion.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
DNA	ácido desoxirribonucleico
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FPPL	<i>Fungal Priority Pathogens List</i>
gp27	glicoproteína de 27 kDa
gp43	glicoproteína de 43 kDa
HSP70	<i>heat shock protein 70</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDD	imunodifusão dupla
IFI	imunofluorescência indireta
IgE	imunoglobulina E
IgG4	imunoglobulina G4
IL	interleucina
ITS	<i>internal transcribed spacer</i>
KOH	hidróxido de potássio
LAMP	<i>loop-mediated isothermal amplification</i>
LVC	leishmaniose visceral canina
LV	leishmaniose visceral
LVH	leishmaniose visceral humana
MS	Ministério da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PAHO	<i>Pan American Health Organization</i>
Pb01	isolado Pb01 de <i>Paracoccidioides</i>
PCM	paracoccidioidomicose
PCR	reação em cadeia da polimerase

PS2	espécie filogenética 2 de <i>Paracoccidioides</i>
PS3	espécie filogenética 3 de <i>Paracoccidioides</i>
PS4	espécie filogenética 4 de <i>Paracoccidioides</i>
SIH-SUS	Sistema de Internações Hospitalares do Sistema Único de Saúde
SUS	Sistema Único de Saúde
TGF- β	fator de transformação do crescimento beta
Th1	<i>T helper 1</i>
Th2	<i>T helper 2</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	PARACOCCIDIOIDOMICOSE	14
2.1	Histórico, Taxonomia e Agentes Etiológicos	14
2.2	Distribuição Geográfica e Relevância Epidemiológica	16
2.3	Biologia, Habitat e Dimorfismo de <i>Paracoccidioides</i> spp.	19
2.4	Diagnóstico Laboratorial da Infecção por <i>Paracoccidioides</i> spp.	21
2.5	Infecção Humana por <i>Paracoccidioides</i> spp.	23
2.6	Infecção por <i>Paracoccidioides</i> spp. em Animais	25
2.7	Cães como Sentinelas Epidemiológicos de <i>Paracoccidioides</i> spp.	26
3	LEISHMANIOSE VISCERAL	27
3.1	Histórico, epidemiologia e biologia de <i>L. infantum</i>	27
3.2	Infecção por <i>L. infantum</i> : manifestações clínicas e resposta imune	30
3.3	Diagnóstico imunológico de Leishmania Visceral	31
3.4	Sobreposição entre <i>L. infantum</i> e <i>P. brasiliensis</i> em cães	31
4	OBJETIVOS	33
4.1	Geral	33
4.2	Específicos	33
5	PRODUÇÃO CIENTÍFICA	34
5.1	Artigo 1	34
5.2	Artigo 2	55
6	CONCLUSÃO	75
	REFERÊNCIAS	77
	APÊNDICE A – Ficha de Coleta de Dados	86
	ANEXO A – Cópia do Parecer do Comitê de Ética Animal da UNILA	87
	ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	88

1 INTRODUÇÃO

A paracoccidiodomicose (PCM) constitui uma micose sistêmica de elevada relevância em saúde pública na América Latina, com maior concentração de casos no Brasil, onde a doença assume caráter endêmico em extensas áreas do território nacional (MARTINEZ, 2017). Causada por fungos do gênero *Paracoccidioides*, a infecção está associada a condições ecológicas e ambientais específicas, sobretudo à exposição ao solo e à vegetação em áreas rurais, periurbanas e em ambientes submetidos a modificações antrópicas (RODRIGUES-VENDRAMINI et al., 2019). Embora os aspectos clínicos, epidemiológicos e imunopatológicos da PCM humana estejam relativamente bem estabelecidos na literatura, o conhecimento acerca da infecção por *Paracoccidioides* spp. em cães permanece mais restrito e fragmentado.

No âmbito da medicina veterinária, os cães apresentam particular interesse epidemiológico por compartilharem com os seres humanos os mesmos espaços domiciliares, peridomiciliares e, frequentemente, ambientes rurais, estando sujeitos a condições semelhantes de exposição aos agentes infecciosos presentes no ambiente. Sob essa perspectiva, esses animais podem desempenhar papel relevante como sentinelas da circulação ambiental de *Paracoccidioides* spp., contribuindo para a identificação de áreas de risco e para a ampliação do conhecimento sobre a ecoepidemiologia da infecção. Além disso, a investigação da exposição canina ao agente insere-se em uma abordagem integrada de Saúde Única, ao articular saúde animal, saúde humana e fatores ambientais.

Paralelamente, a leishmaniose visceral canina (LVC) representa uma zoonose de reconhecida importância no Brasil, com ampla distribuição geográfica e expansão progressiva em diferentes regiões do país (MS, 2019). Na região de tríplice fronteira,

especialmente no município de Foz do Iguaçu, Paraná, a circulação de *Leishmania infantum* ocorre em cenário epidemiológico de interesse particular, no qual também se observam condições favoráveis à exposição a *Paracoccidioides* spp. (MOREIRA et al., 2026). A sobreposição endêmica desses patógenos torna-se especialmente relevante diante de evidências que sugerem associação entre a sororreatividade para *L. infantum* e *P. brasiliensis* em cães, levantando hipóteses relacionadas à possibilidade de reatividade cruzada, coinfeção ou compartilhamento de fatores ambientais de risco (SILVEIRA et al., 2006; PETRONI et al., 2017).

Nesse contexto, a presente tese foi concebida com a finalidade de aprofundar a compreensão da infecção por *Paracoccidioides* spp. em cães, considerando tanto o estado atual do conhecimento científico quanto a investigação de sua ocorrência em cenário endêmico de interesse epidemiológico. Para tanto, o trabalho foi estruturado em dois artigos científicos.

O primeiro artigo teve por objetivo analisar e integrar sistematicamente a literatura disponível sobre infecção por *Paracoccidioides* spp. e PCM em cães, abrangendo modelos experimentais de infecção, estudos imunológicos, levantamentos soropidemiológicos e casos clínicos de ocorrência natural.

O segundo artigo teve por objetivo avaliar a soropositividade para *Paracoccidioides* spp. em cães positivos e negativos para *Leishmania infantum* e descrever a distribuição espacial dos animais soropositivos nas regiões urbanas de Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil, considerando a sobreposição endêmica desses patógenos na região da tríplice fronteira.

2 PARACOCCIDIOIDOMICOSE

2.1 Histórico, Taxonomia e Agentes Etiológicos

A PCM é uma micose sistêmica descrita pela primeira vez por Adolfo Lutz, em 1908, a partir do relato dos aspectos clínicos, histopatológicos e micológicos de dois casos humanos observados em São Paulo, Brasil (LUTZ, 1908). Posteriormente, em 1912, Alfonso Splendore descreveu novos casos e estudou a morfologia do fungo causador da doença, denominando-o *Zymonema brasiliensis* (SPLENDORE, 1912; LACAZ, 1983). Em 1930, Floriano Paulo de Almeida redefiniu a espécie como *Paracoccidioides brasiliensis* (LACAZ, 1983). Desde então, a doença recebeu diferentes denominações, como blastomicose brasileira, blastomicose sul-americana, doença de Lutz e doença de Lutz-Splendore-Almeida. Em 1971, durante a reunião de micologistas das Américas realizada em Medellín, Colômbia, consolidou-se a nomenclatura paracoccidioidomicose para designar a micose causada por fungos do gênero *Paracoccidioides* (LACAZ, 1983).

Inicialmente, *P. brasiliensis* foi classificado na família Onygenaceae, ordem Onygenales, filo Ascomycota. Posteriormente, foi proposta a família Ajellomycetaceae para englobar o grupo monofilético *Ajellomyces*, que inclui os gêneros anamórficos *Blastomyces*, *Emmonsia*, *Histoplasma* e *Paracoccidioides* (BIALEK et al., 2000; HERR et al., 2001; SAN-BLAS; NIÑO-VEGA; ITURRIAGA, 2002; UNTEREINER et al., 2004; BAGAGLI et al., 2008).

Estudos moleculares demonstraram ampla variabilidade genética entre isolados de *Paracoccidioides brasiliensis*, bem como possíveis correlações entre genótipos, distribuição geográfica, virulência e resistência a fármacos (MOLINARI-MADLUM et al., 1999; NIÑO-VEGA et al., 2000; HAHN et al., 2003; MATUTE et al.,

2006). Análises filogenéticas baseadas em sequenciamento multilocus de 65 cepas evidenciaram a existência de três grupos filogenéticos principais, inicialmente tratados como espécies crípticas ou linhagens geneticamente distintas dentro de *P. brasiliensis*, denominados S1, PS2 e PS3, derivados de eventos independentes de especiação. Nesse contexto, PS2 e PS3 mostraram-se monofiléticos, enquanto S1 foi caracterizado como parafilético; além disso, S1 e PS2 apresentaram comportamento simpátrico e recombinante, ao passo que PS3 foi considerado alopátrico e clonal (MATUTE et al., 2006). Esses achados indicaram que a diversidade genética observada no então denominado *P. brasiliensis* não correspondia apenas a variações intraespecíficas, mas refletia a presença de linhagens evolutivamente independentes, cuja delimitação passou a ganhar maior suporte com o avanço das abordagens filogenéticas multilocus e genômicas.

Posteriormente, análises filogenéticas demonstraram que a cepa Pb01 se distinguia dos demais isolados do gênero *Paracoccidioides* (CARRERO et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2009). Com base em dados filogenéticos moleculares e genômicos comparativos, foi então proposta formalmente a espécie *Paracoccidioides lutzii*, constituída por isolados do grupo “Pb01-like” (TEIXEIRA et al., 2014). Esse processo de revisão taxonômica foi ampliado por Turissini et al. (2017), que reforçaram a hipótese de que o gênero *Paracoccidioides* compreende cinco espécies filogenéticas, sendo quatro pertencentes ao complexo *P. brasiliensis* e uma correspondente a *P. lutzii*. Assim, as linhagens anteriormente reconhecidas como espécies crípticas passaram a ser interpretadas como espécies filogenéticas formalmente delimitadas, com base na divergência observada em loci nucleares, nas relações filogenéticas e em padrões evolutivos independentes. Embora os autores tenham observado incongruências entre genealogias nucleares e mitocondriais, os dados nucleares

sustentaram a separação das espécies do complexo *P. brasiliensis*, contribuindo para consolidar a reclassificação taxonômica do grupo (TURISSINI et al., 2017).

Atualmente, reconhece-se a existência de pelo menos quatro espécies filogenéticas irmãs no complexo *P. brasiliensis*, além de *P. lutzii* (TEIXEIRA et al., 2014; TURISSINI et al., 2017). O complexo *P. brasiliensis* compreende: *P. brasiliensis* sensu stricto (S1), encontrada especialmente no Sudeste e Sul do Brasil, além da Argentina e do Paraguai; *Paracoccidioides americana* (PS2), com distribuição esporádica e casos humanos descritos na Venezuela e no Sudeste do Brasil; *Paracoccidioides restrepiensis* (PS3), menos frequente, com predomínio na Colômbia e registros esparsos na Argentina, no Peru e no Brasil; e *Paracoccidioides venezuelensis* (PS4), com ocorrências descritas na Venezuela e no Brasil (MATUTE et al., 2006; THEODORO et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2014; TURISSINI et al., 2017; COCIO et al., 2020a; COCIO et al., 2020b; DE MELO TEIXEIRA et al., 2020; PINHEIRO et al., 2020, LEITE et al., 2024). Por sua vez, *P. lutzii* constitui uma espécie distinta, predominantemente distribuída nas regiões Centro-Oeste e Amazônica do Brasil, além do Equador (MARQUES-DA-SILVA et al., 2012; TATAGIBA et al., 2018).

2.2 Distribuição Geográfica e Relevância Epidemiológica da PCM em Humanos

A PCM é uma micose sistêmica endêmica restrita à América Latina, sendo considerada uma das infecções fúngicas de maior relevância epidemiológica na região. Estima-se que aproximadamente 10 milhões de indivíduos estejam infectados por fungos do gênero *Paracoccidioides*, embora apenas cerca de 1% a 2% desenvolvam manifestações clínicas da doença. O Brasil concentra

aproximadamente 80% dos casos humanos descritos, com maior ocorrência nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Sul, e a PCM já foi registrada em cerca de 27% dos municípios brasileiros (COUTINHO et al., 2015; MARTINEZ, 2017).

No Brasil, Coutinho et al. (2002) demonstraram que a PCM constituiu a oitava causa mais frequente de morte entre as doenças infecciosas e parasitárias crônicas ou recorrentes, com 3.181 óbitos registrados entre 1980 e 1995, correspondendo a uma média anual de 198,81 óbitos e a uma taxa média anual de mortalidade de 1,45 por milhão de habitantes. Nesse estudo, as maiores taxas de mortalidade foram observadas nas regiões Sudeste e Sul, responsáveis por 53,99% e 27,51% dos óbitos, respectivamente. O Paraná respondeu por 14,52% do total de óbitos registrados no Brasil, com coeficiente médio anual de mortalidade de 3,45 por milhão de habitantes (COUTINHO et al., 2002).

Dados hospitalares também reforçam a importância da PCM como agravamento de saúde pública. Entre 1998 e 2006, foram registradas 13.683 internações hospitalares por micoses sistêmicas no Brasil, das quais 49% corresponderam à PCM, totalizando 6.732 internações e 334 óbitos hospitalares. Esses dados representam taxa de internação de 4,3 e taxa de óbito hospitalar de 5% (COUTINHO et al., 2015). No mesmo período, a região Sul apresentou valores superiores aos nacionais, com taxa de internação de 6,9 e taxa de óbito hospitalar de 7%, onde o Paraná, isoladamente, concentrou 50% das internações regionais e 55% dos óbitos hospitalares da região (COUTINHO et al., 2015).

Apesar desse cenário, a real prevalência da PCM provavelmente está subestimada, uma vez que a doença não integra a Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública (BRASIL, 2022a). Desse modo, o conhecimento epidemiológico sobre a PCM no país baseia-se, em

grande parte, em séries retrospectivas de casos, estudos com isolados ou linhagens mantidas em coleções de pesquisa e dados provenientes do Sistema de Internações Hospitalares do Sistema Único de Saúde (SIH-SUS) (BRASIL, 2022b). Com base na experiência de serviços de referência, estima-se que a incidência anual no Brasil varie de 0,71 a 3,70 casos por 100 mil habitantes (MARTINEZ, 2017). O estado do Paraná, no sul do país, apresentou incidência cumulativa de 6,4 casos por 100 mil habitantes, com incidência média anual de 0,46 caso por 100 mil habitantes (DE SOUZA SUGUIURA & ONO, 2022).

No Oeste do Paraná, a importância epidemiológica da PCM é evidenciada por estudos conduzidos no município de Foz do Iguaçu. Loth e colaboradores (2011) reportaram a incidência da doença e a ocorrência de óbitos entre residentes dessa região entre janeiro de 2008 e julho de 2009. No período, foram identificados 102 novos casos de PCM, sendo 70,6% em homens e 29,4% em mulheres, com média de idade de $49,1 \pm 15,5$ anos. Além disso, foram registrados 15 óbitos, correspondentes a 14,7% dos pacientes avaliados, e observou-se elevada frequência de comorbidades associadas, especialmente tuberculose. Os autores destacaram que, somente em 2008, foram diagnosticados cerca de 50 novos casos, número expressivo em comparação com outras regiões do Paraná e do Brasil. Esse achado foi atribuído, ao menos em parte, à inclusão do exame micológico de escarro para PCM na rotina de pacientes investigados para tuberculose. Esses dados sustentam a caracterização da região como área endêmica e reforçam a importância de serviços locais capacitados para o diagnóstico da PCM (LOTH et al., 2011).

Em análise retrospectiva de dados de PCM humana entre 2007 e 2020, de Souza Suguiura e Ono (2022) observaram que Foz do Iguaçu apresentou a maior incidência cumulativa entre os municípios do Paraná avaliados, com 9,7 casos por 10

mil habitantes. Embora esses dados indiquem elevada concentração de casos no município, os autores ponderam que não é possível determinar se esse padrão reflete, necessariamente, uma condição hiperendêmica da região Oeste ou se resulta da maior eficiência na identificação, diagnóstico e notificação dos casos. Portanto, além de indicar a relevância epidemiológica da doença no Oeste do Paraná, esses achados reforçam a necessidade de diretrizes diagnósticas e estratégias de vigilância que permitam estimar com maior precisão a carga da PCM em áreas endêmicas.

Nesse sentido, em 2022, a Organização Mundial da Saúde publicou a primeira lista de fungos prioritários, intitulada *Fungal Priority Pathogens List* (FPPL), com o objetivo de direcionar pesquisas e intervenções políticas voltadas ao enfrentamento de infecções fúngicas e da resistência a antifúngicos. Nessa lista, *Paracoccidioides* spp. foi incluído no grupo de prioridade média, com base em critérios como mortalidade, incidência anual, distribuição geográfica, tendência temporal, hospitalização, complicações e sequelas, resistência a antifúngicos, evitabilidade, acesso ao diagnóstico e disponibilidade de tratamentos baseados em evidências. Embora sua distribuição seja regionalmente restrita, a elevada relevância em áreas endêmicas justifica sua consideração prioritária em contextos epidemiológicos regionais, sub-regionais e nacionais, especialmente para definição de agendas locais de saúde pública e pesquisa (WHO, 2022).

2.3 Biologia, Habitat e Dimorfismo de *Paracoccidioides* spp.

Os fungos da ordem Onygenales evoluíram com adaptações a dois nichos ecológicos distintos: o ambiente sapróbio no solo e os tecidos vivos de hospedeiros animais (TEIXEIRA et al., 2014). Em condições ambientais, aproximadamente a

25°C, *Paracoccidioides* spp. apresenta-se na fase filamentosa, produzindo hifas e conídios com 2 a 5 µm de diâmetro, considerados os principais propágulos infectantes (MENDES et al., 2017). Após a inalação pelo hospedeiro, em temperatura corporal entre 35 e 37 °C, ocorre a conversão para a fase leveduriforme, nessa fase, observam-se células ovais, esféricas ou elípticas, com paredes birrefringentes e múltiplos brotamentos laterais; as células-mãe medem de 20 a 30 µm de diâmetro e podem originar 10 a 12 células-filhas de 2 a 10 µm (MENDES et al., 2017).

O habitat natural de *Paracoccidioides* spp. ainda não está completamente definido, embora o solo seja considerado seu provável nicho ecológico (RESTREPO, 1985). O isolamento direto da forma sapróbia, entretanto, permanece difícil, tendo sido obtido apenas esporadicamente na Argentina, na Venezuela e no Brasil (NEGRONI et al., 1966; DE ALBORNOZ, 1971; SILVA-VERGARA et al., 1998). Em geral, as tentativas de isolamento e reisolamento permanecem pouco exitosas.

As formas sapróbias de *Paracoccidioides* spp. parecem estar associadas a condições ambientais específicas, incluindo áreas com vegetação submetida a perturbações naturais ou antrópicas e proximidade de fontes de água (RESTREPO; MCEWEN; CASTANEDA, 2001). Além disso, condições geológicas e climáticas favoráveis, associadas à alta precipitação e a atividades agrícolas que promovem revolvimento do solo, podem favorecer tanto a permanência do fungo no ambiente quanto a exposição de hospedeiros suscetíveis, contribuindo para maior endemicidade da PCM em determinadas áreas (MENDES et al., 2017; RODRIGUES-VENDRAMINI et al., 2019).

Após a inalação de fragmentos miceliais ou conídios depositados nos alvéolos pulmonares, o fungo converte-se à fase leveduriforme em resposta à temperatura do hospedeiro (FRANCO, 1987). A partir desse evento, podem ocorrer três desfechos

principais: eliminação do patógeno sem manifestação clínica; desenvolvimento de doença aguda ou subaguda, geralmente com disseminação sistêmica; ou eliminação parcial, com persistência de focos quiescentes que podem reativar-se posteriormente, culminando em doença crônica localizada ou disseminada (FRANCO, 1987; CHAVES et al., 2021).

2.4 Diagnóstico Laboratorial da Infecção por *Paracoccidioides* spp.

O diagnóstico da PCM pode ser realizado por diferentes métodos, incluindo exame micológico direto, cultura microbiológica, histopatologia, sorologia e técnicas moleculares (SCHECHTMAN; AZULAY, 2022). A visualização e o reconhecimento do agente em secreções ou tecidos, assim como o isolamento em cultivo, permanecem como referências diagnósticas importantes. Para essas análises, o material pode ser obtido por raspado, curetagem, bisturi ou microbiópsia, sendo posteriormente depositado em lâmina, clarificado com KOH a 40%, recoberto com lamínula, macerado suavemente e examinado em microscopia óptica (SCHECHTMAN; AZULAY, 2022).

Entre os métodos moleculares, a reação em cadeia da polimerase destaca-se por possibilitar detecção rápida e específica de material genético de *Paracoccidioides* spp. Entre os principais alvos empregados estão regiões conservadas do DNA ribossômico, como os genes 18S, 5.8S e 28S, além dos espaçadores internos transcritos ITS1 e ITS2, amplamente utilizados para identificação de *P. brasiliensis* (SANO et al., 2001; ENDO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2014). Também podem ser utilizadas sequências de genes codificadores de proteínas espécie-específicas, como *gp43* e *gp27* para *P. brasiliensis*, *ARF* para *P. americana* e *HSP70* para *P. lutzii* (DE

MACEDO et al., 2019).

No diagnóstico sorológico, diferentes metodologias podem ser empregadas para detecção de anticorpos ou antígenos fúngicos, entre elas a imunodifusão dupla, o ELISA e o *western blotting*. O desenvolvimento do imunodiagnóstico da PCM teve início com a padronização de polissacarídeos extraídos de culturas de *P. brasiliensis*, e posteriormente, o exoantígeno obtido a partir de cultivos da cepa B-339 foi reconhecido como adequado para ensaios de imunodifusão, devido à elevada reatividade com anticorpos presentes em soros de indivíduos acometidos pela micose (PUCCIA et al., 1986; CAMARGO et al., 1988; MENDES-GIANNINI et al., 1990). Entre os antígenos secretados, destaca-se a glicoproteína de 43 kDa, gp43, considerada o principal antígeno imunodominante da espécie (SOUZA et al., 1997).

Atualmente, a imunodifusão dupla em gel de agarose permanece entre os métodos sorológicos mais empregados no diagnóstico da PCM, em razão de sua simplicidade operacional, baixo custo e boa acurácia diagnóstica, apresentando sensibilidade superior a 80% e especificidade acima de 90%, embora reações cruzadas possam ocorrer (ALMEIDA, 2018). Além de sua aplicação no diagnóstico inicial, o método pode ser utilizado no acompanhamento terapêutico, uma vez que a redução dos títulos de anticorpos ao longo do tratamento pode indicar resposta clínica favorável (ALMEIDA, 2018).

Na imunodifusão dupla, antígenos e anticorpos difundem-se radialmente em meio gelificado até atingirem a zona de equivalência, na qual se formam imunocomplexos insolúveis visualizados como linhas de precipitação. A interpretação diagnóstica baseia-se na identidade entre as linhas observadas no soro controle positivo e aquelas verificadas no soro em análise, indicando a presença de anticorpos específicos contra o antígeno testado (VAZ; MACHADO; BUENO, 2018; ALMEIDA,

2018).

2.5 Infecção Humana por *Paracoccidioides* spp.

Em humanos, atividades relacionadas ao manejo do solo, como agricultura, terraplenagem, preparo do solo, jardinagem e transporte de produtos vegetais, constituem os principais fatores de risco para a infecção por *Paracoccidioides* spp., por promoverem exposição ao provável habitat do fungo, sobretudo em ambientes rurais (SHIKANAI-YASUDA et al., 2018).

A doença é menos frequente em mulheres adultas, fato classicamente associado aos níveis endógenos de estrogênio, capazes de inibir a transição do fungo para a fase leveduriforme patogênica (STOVER et al., 1986; ARISTIZABAL et al., 2002; SHANKAR et al., 2011). Assim, a razão de acometimento em adultos é estimada entre 10:1 e 15:1, em favor do sexo masculino (SHIKANAI-YASUDA et al., 2018).

A infecção é adquirida, em geral, nas duas primeiras décadas de vida, com pico entre 10 e 20 anos; contudo, apenas cerca de 10% dos casos evoluem para doença nessa faixa etária; a maioria das manifestações clínicas ocorre em adultos de 30 a 50 anos, frequentemente em decorrência da reativação de focos latentes (SHIKANAI-YASUDA et al., 2018).

Do ponto de vista imunológico, a resposta do hospedeiro pode variar amplamente. Nas formas controladas, predomina resposta Th1, com ativação de macrófagos, participação de linfócitos T CD4+ e, em menor grau, de T CD8+, favorecendo a formação de granulomas organizados capazes de conter a multiplicação fúngica (HAHN et al., 2022). Em contraposição, nas formas graves,

disseminadas ou agudas/subagudas, observa-se predomínio de resposta Th2 exacerbada, com aumento de IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β , intensa ativação de linfócitos B, produção elevada de anticorpos específicos, especialmente IgE e IgG4, e formação de granulomas mal organizados, o que favorece a progressão da doença (HAHN et al., 2022).

A classificação clínica mais utilizada baseia-se em dados demográficos, evolução natural e comprometimento de órgãos e sistemas, distinguindo-se as formas aguda/subaguda e crônica (FRANCO, 1987). A forma aguda/subaguda, também denominada juvenil, corresponde a 5% a 25% dos casos e acomete principalmente crianças, adolescentes e adultos jovens. Caracteriza-se por rápida disseminação, com linfadenomegalia, manifestações digestivas, lesões cutâneas, comprometimento osteoarticular, febre, anorexia e perda de peso, sendo o comprometimento pulmonar menos frequente (FRANCO, 1987).

A forma crônica representa a maioria dos casos de PCM humana, com frequência entre 74% e 96%, e acomete predominantemente homens entre 30 e 60 anos (SHIKANAI-YASUDA et al., 2018). Pode apresentar-se como forma unifocal, geralmente pulmonar, ou multifocal, com acometimento de diferentes órgãos e sistemas, como pulmões, pele e glândulas adrenais (SCHECHTMAN; AZULAY, 2022). Nas manifestações menos graves da PCM, observa-se resposta imune Th1 parcialmente eficaz, capaz de promover formação de estruturas granulomatosas, embora com infiltração neutrofílica significativa e fagocitose incompleta das células fúngicas, mantendo equilíbrio precário entre hospedeiro e patógeno (HAHN et al., 2022).

Além da fase ativa, a PCM pode deixar sequelas anatômicas e funcionais relevantes. As formas residuais podem comprometer pulmões, pele, laringe, traqueia,

glândulas adrenais, mucosa das vias aerodigestivas superiores, sistema nervoso central e sistema linfático, com impacto duradouro sobre a qualidade de vida dos pacientes (SHIKANAI-YASUDA et al., 2018). Dessa forma, a PCM não se limita ao período de infecção ativa, podendo resultar em alterações permanentes que justificam acompanhamento clínico mesmo após a conclusão do tratamento antifúngico.

2.6 Infecção por *Paracoccidioides* spp. em Animais

Em áreas endêmicas de PCM, a infecção por *Paracoccidioides* spp. têm sido relatada em diferentes espécies animais, incluindo animais silvestres, de produção e domésticos. Entre os animais silvestres, há registros em morcegos, macacos-prego, bugios, pequenos roedores, tatus, ouriço e guaxinins (GROSE; TAMSITT, 1965; BAGAGLI et al., 1998; CORTE et al., 2007; RICHINI-PEREIRA et al., 2008; SBEGHEN et al., 2015). Em animais de produção, foram descritas evidências de infecção em galinhas, bovinos, suínos, coelhos, caprinos, ovinos, equinos e peixes (SILVEIRA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012; FERREIRA et al., 2013; BELITARDO et al., 2014a; BELITARDO et al., 2014b; DE SOUZA SUGUIURA et al., 2020). Entre os animais domésticos, destacam-se relatos em cães e gatos (MÓS; FAVA-NETTO, 1974; ONO et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2013).

A ocorrência da infecção em múltiplas espécies reforça o caráter ambiental da exposição ao agente etiológico e evidencia a ampla interface entre o fungo, o solo e os hospedeiros suscetíveis. Nesse contexto, os animais podem contribuir para a compreensão da circulação ambiental de *Paracoccidioides* spp., sobretudo em regiões endêmicas, nas quais fatores ecológicos, climáticos e antrópicos favorecem a permanência do fungo e a exposição de humanos e outros mamíferos.

Entre os animais domésticos, os cães merecem atenção particular, uma vez que compartilham com os seres humanos o ambiente domiciliar, peridomiciliar e, frequentemente, o ambiente rural. Essa proximidade ecológica e comportamental torna essa espécie especialmente relevante para estudos epidemiológicos voltados à identificação de áreas de circulação do fungo e à compreensão da interface entre exposição ambiental e infecção.

2.7 Cães como Sentinelas Epidemiológicos de *Paracoccidioides* spp.

A vigilância sentinela baseia-se no monitoramento de subpopulações específicas, constituindo uma estratégia capaz de ampliar a sensibilidade para detecção de agravos e, simultaneamente, otimizar a relação custo-benefício das ações de vigilância (BOWZER et al., 2018). Nesse contexto, os animais podem ser utilizados como sentinelas para a identificação e o acompanhamento de diferentes riscos à saúde, atuando como indicadores biológicos relevantes da ocorrência de enfermidades em determinadas populações ou ambientes (BOWZER et al., 2018).

No âmbito das doenças infecciosas, o conceito de animal sentinela refere-se ao emprego desses organismos para indicar a presença de patógenos, detectar surtos em novas áreas, monitorar variações na prevalência e na incidência ao longo do tempo e do espaço, além de subsidiar a formulação de hipóteses epidemiológicas, a avaliação da efetividade de medidas de controle e a investigação de fatores de risco relacionados à dinâmica de transmissão em populações humanas e animais (BOWZER; ANDERSON, 2018).

Os cães podem ocupar uma posição estratégica na epidemiologia da PCM, uma vez que vivem em estreita associação com os seres humanos e, com frequência,

compartilham os mesmos fatores de risco ambientais (CHEN et al., 2023). Em áreas rurais, esses animais mantêm contato direto com solo, matéria orgânica, vegetação e outros microambientes potencialmente favoráveis à permanência de *Paracoccidioides* spp. Assim, a exposição canina pode refletir a circulação ambiental desse agente em determinada região, reforçando o potencial dos cães como sentinelas epidemiológicos em estudos voltados à compreensão da distribuição espacial e ecológica da infecção (HEGEDUS et al., 2023). Nesse cenário, investigações voltadas à população canina tornam-se particularmente importantes para ampliar a compreensão da distribuição de *Paracoccidioides* spp. no ambiente e fortalecer estratégias integradas de vigilância.

3. LEISHMANIOSE VISCERAL

3.1. Histórico, epidemiologia e biologia de *L. infantum*

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença endêmica em mais de 70 países, distribuídos em todos os continentes exceto na Antártida e na Austrália, afetando uma população em risco estimada em 200 milhões de indivíduos (BURZA, CROFT & BOELAERT, 2018). A taxa de incidência de leishmaniose visceral (LV) nas Américas foi de 2,96 casos por 100.000 habitantes quando considerada a população residente em áreas de transmissão, e de 0,47 casos por 100.000 habitantes quando considerada a população total (OPAS, 2020).

Em escala latino-americana, o Brasil permanece como o principal território endêmico para a doença, concentrando aproximadamente 97% das notificações registradas em 2019 (OPAS, 2020). No contexto nacional, observa-se uma expansão

consistente da Leishmaniose Visceral, com ocorrência de Leishmaniose Visceral Canina (LVC) em 25 dos 27 estados e confirmação de casos autóctones de Leishmaniose Visceral Humana (LVH) em 23 unidades federativas BRASIL, 2019). Entre 2007 e 2024, foram registrados no Brasil 50.372 casos da doença, com 3.944 óbitos, resultando em uma taxa de letalidade de 7,03% (BRASIL, 2024). Quanto à distribuição por sexo, observou-se predominância de casos no sexo masculino, que concentrou 64,54% das notificações, enquanto o sexo feminino representou 35,46% (BRASIL, 2024).

A LV é predominantemente causada por duas espécies do parasito, com distribuição geográfica distinta: *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* no Hemisfério Oriental, e *Leishmania infantum chagasi* no Hemisfério Ocidental (CDC, 2025). A *L. infantum* é considerada provavelmente uma espécie introduzida no Brasil, inicialmente estabelecida na região Nordeste por meio de cães trazidos de Portugal e Espanha (KILLICK-KENDRICK et al., 1980). Entre as décadas de 1920 e 1980, a Leishmaniose Visceral permaneceu endêmica em áreas rurais dessa região; entretanto, a partir dos anos 1980, observou-se sua expansão para centros urbanos e periurbanos de outras partes do país, e na década seguinte, novos surtos foram notificados, sobretudo nas regiões Sudeste e Centro-Oeste (PASQUALI et al., 2019).

Na região Sul do Brasil, os primeiros registros de LV ocorreram no Rio Grande do Sul em 2006 (LVC) e 2008 (LVH) e Santa Catarina em 2011 (PASQUALI et al., 2019). No estado do Paraná, a presença dos vetores flebotomíneos (SANTOS et al., 2012) e casos caninos de leishmaniose visceral (LVC) (DIAS et al., 2013) foram detectados pela primeira vez em 2012, seguidos pela confirmação dos primeiros casos autóctones de leishmaniose visceral humana (LVH) em 2016 (TRENCH et al., 2016), ambos ocorrendo no município de Foz do Iguaçu.

Os vetores flebotomíneos responsáveis pela transmissão de *L. infantum* pertencem principalmente aos gêneros *Phlebotomus*, distribuído na Europa, África e Ásia, e *Lutzomyia*, presente no continente americano (DI-BLASI et al., 2019). A infecção do vetor ocorre durante o repasto sanguíneo realizado pela fêmea em hospedeiros vertebrados parasitados, ocasião em que são ingeridos macrófagos contendo formas amastigotas da *Leishmania* (LAINSON, 2005). No trato digestório do inseto, essas formas intracelulares, inicialmente arredondadas, aflageladas e imóveis, diferenciam-se em promastigotas flageladas e móveis, que passam por intensa multiplicação e migram em direção à região anterior do intestino médio, onde se tornam promastigotas metacíclicos altamente infectantes para mamíferos e são inoculados durante subseqüentes repastos sanguíneos realizados pelo vetor (LAINSON, 2005).

A *Leishmania* depende de hospedeiros mamíferos para completar seu ciclo de vida e tem como principal hospedeiro reservatório os cães domésticos (ciclo animal-flebotomíneo-humano) (SCARPINI et al., 2022). Após o repasto sanguíneo, os promastigotas metacíclicos de *L. infantum* inoculados no hospedeiro são fagocitados por macrófagos caninos, nos quais iniciam a diferenciação em amastigotas, que se multiplicam intracelularmente (MORALES-YUSTE, MARTÍN-SÁNCHEZ & CORPAS-LOPEZ, 2022).

Embora os cães sejam reconhecidos como os principais reservatórios de *L. infantum*, o parasito também já foi detectado em outras espécies animais, incluindo gatos (MARTÍN-SANCHEZ et al., 2007), coelhos, lebres e diferentes roedores silvestres (CARRILLO, MORENO & CRUZ, 2013; DÍAZ-SÁEZ et al., 2014). Além disso, há registros da infecção em diversos mamíferos selvagens, como lobos (*Canis lupus*), raposas (*Vulpes vulpes*), chacais (*Canis aureus*) e genetass (*Genetta genetta*),

evidenciando a ampla gama de hospedeiros envolvidos na manutenção do ciclo do parasito na natureza (QUINNELL & COURTENAY, 2009).

3.2. Infecção por *L. infantum*: manifestações clínicas e resposta imune

A LV em humanos apresenta um quadro clínico característico, marcado por febre prolongada, emagrecimento progressivo e comprometimento hepatoesplênico - com esplenomegalia geralmente mais acentuada que a hepatomegalia; pancitopenia (compreendendo anemia, leucopenia e trombocitopenia), além de distúrbios proteicos como hipoalbuminemia, hipergamaglobulinemia e elevação das proteínas totais (CDC, 2025). Entre as manifestações secundárias da doença destacam-se alterações respiratórias e gastrointestinais, incluindo episódios de vômitos e diarreia (OPAS, 2025). Em quadros mais avançados, pode haver comprometimento nutricional e edema de membros inferiores, petéquias, icterícia, ascite e hemorragias, que podem ser fatais, além de poder estar associado a infecções bacterianas (OPAS, 2025).

Em cães, os parasitas são capazes de evadir a resposta imune inata por meio da modificação do vacúolo parasitóforo, interferindo nos mecanismos de sinalização intracelular dos macrófagos em favor de sua própria sobrevivência (KOUTINAS & KOUTINAS, 2014). À medida que ocorre aumento significativo da carga parasitária, há lise dessas células hospedeiras, resultando na liberação de amastigotas, que passam a ser fagocitadas por outras células do sistema fagocítico mononuclear, com predomínio nos compartimentos sanguíneo e em órgãos como fígado, baço e medula óssea (KOUTINAS & KOUTINAS, 2014).

Nas infecções por *Leishmania*, tanto em humanos quanto em cães, é comumente observada a ativação concomitante de mecanismos imunes celulares e

humorais, caracterizando uma resposta imune mista, que resulta na produção simultânea de citocinas associadas aos perfis Th1 e Th2, cujo balanço dinâmico é determinante para o desfecho da infecção, de modo que sua desregulação pode culminar tanto no controle do parasita quanto na progressão da doença (CARRILLO & MORENO, 2009).

3.3 Diagnóstico imunológico de Leishmaniose Visceral

O imunodiagnóstico da leishmaniose baseia-se principalmente na detecção de antígenos do parasito ou de anticorpos específicos anti-*Leishmania* em amostras biológicas, entre os quais se destacam: (i) o teste de imunofluorescência indireta (IFI); (ii) o ensaio imunoenzimático (ELISA); (iii) o Western blot; (iv) o teste de aglutinação direta (TAD); (v) os testes imunocromatográficos em tira (TIC), amplamente utilizados em diagnósticos rápidos; e (vi) o teste de aglutinação em látex (KAtex) (REIMÃO et al., 2020; OPAS, 2025).

No diagnóstico da leishmaniose visceral, o antígeno rK39 é amplamente utilizado em testes sorológicos. Esse antígeno corresponde a um peptídeo derivado de uma proteína relacionada à cinesina, composto por uma sequência repetitiva de 39 aminoácidos de *Leishmania infantum* (REIMÃO et al., 2020).

3.4 Sobreposição entre *L. infantum* e *P. brasiliensis* em Cães

Nos cães, *L. infantum* estabelece infecção intracelular em macrófagos, com multiplicação amastigota e disseminação para órgãos do sistema fagocítico mononuclear, como fígado, baço e medula óssea, além de modular a resposta imune

inata, favorecendo sua sobrevivência e persistência no hospedeiro (KOUTINAS; KOUTINAS, 2014). De modo geral, as infecções por *Leishmania* caracterizam-se por resposta imune mista, envolvendo mecanismos celulares e humorais, cujo equilíbrio entre perfis Th1 e Th2 influencia diretamente o desfecho da infecção (CARRILLO; MORENO, 2009). Essa complexidade imunológica é particularmente importante ao se considerar a possível interação com outros agentes infecciosos, incluindo fungos sistêmicos como *Paracoccidioides* spp.

Silveira et al. (2006), em investigação conduzida no Mato Grosso do Sul, observaram maior reatividade aos antígenos de *P. brasiliensis* em cães soropositivos para LVC quando comparados a cães soronegativos para *L. infantum*. Segundo os autores, esse achado pode refletir tanto a possibilidade de reatividade cruzada entre antígenos dos dois patógenos quanto a ocorrência de coinfeção em animais da região. De modo semelhante, Petroni et al. (2017), ao analisarem soros de cães positivos e negativos para *L. infantum* em municípios do estado de São Paulo, verificaram forte correlação positiva entre a reatividade para *L. infantum* e *P. brasiliensis* ($r = 0,96$), reforçando a possibilidade de associação epidemiológica ou imunológica entre essas enfermidades em cães.

Embora os dados disponíveis ainda não permitam definir de forma conclusiva se essa associação resulta predominantemente de reatividade cruzada, coinfeção verdadeira ou compartilhamento de fatores ambientais de exposição, o conjunto de evidências disponíveis demonstra que a relação entre esses agentes não deve ser negligenciada em investigações conduzidas com cães de áreas endêmicas.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar o papel dos cães na ecoepidemiologia de *Paracoccidioides* spp., integrando evidências da literatura científica e dados soroepidemiológicos obtidos em área de sobreposição endêmica com *Leishmania infantum*.

4.2 ESPECÍFICOS

- Analisar e integrar sistematicamente a literatura disponível sobre infecção por *Paracoccidioides* spp. e paracoccidioidomicose em cães;
- Avaliar a sororreatividade para *Paracoccidioides* spp. em cães positivos e negativos para *Leishmania infantum* em Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil;
- Descrever a distribuição espacial dos cães soropositivos para *Paracoccidioides* spp. nas regiões urbanas de Foz do Iguaçu;
- Investigar a possível associação epidemiológica entre a soropositividade para *Paracoccidioides* spp. e a infecção por *L. infantum* em cães de área endêmica.

5 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

5.1 ARTIGO 1

Canine Paracoccidioidomycosis: A Systematic Review of Clinical, Serological, and Experimental Evidence

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by thermodimorphic fungi of the genus *Paracoccidioides* and remains a major public health problem in Latin America. While the disease has been extensively investigated in humans, its occurrence, clinical relevance, and epidemiological significance in animal hosts, particularly dogs, remain poorly understood. This review systematically analyzes the available literature on *Paracoccidioides* spp. infection and PCM in dogs, integrating evidence from experimental infection models, immunological studies, seroepidemiological surveys, and naturally occurring clinical cases. A total of 19 studies met the inclusion criteria, comprising nine seroepidemiological investigations, five case reports of naturally infected dogs, four experimental infection studies, and one immunological study. The findings indicate that dogs are frequently exposed to *Paracoccidioides* spp. in endemic regions, as demonstrated by consistently high serological reactivity, especially in rural and peri-rural environments. However, progression to clinically overt PCM appears to be rare, suggesting that most dogs effectively control infection through immune response. Experimental studies support biological susceptibility while highlighting heterogeneous outcomes ranging from acute fatal disease to complete immune-mediated clearance. Case reports confirm that dogs can develop systemic, cutaneous, and mucocutaneous forms of PCM that closely resemble human disease. Collectively, the evidence supports the role of dogs as accidental hosts and valuable sentinels of environmental fungal circulation rather than primary reservoirs. From a One Health perspective, canine surveillance may contribute to understanding the ecology, geographic distribution, and epidemiological dynamics of *Paracoccidioides* spp., underscoring the need for species-adapted diagnostic tools and further integrative research.

Keywords: Paracoccidioidomycosis; *Paracoccidioides* spp.; Dogs; Canine infection;

1. Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic fungal disease caused by thermophilic species of the genus *Paracoccidioides* (Peçanha, 2022). The disease is endemic in several Latin American Countries, with Brazil accounting for most of reported human cases, where PCM remains a major cause of morbidity and mortality among systemic mycoses (Martinez, 2017).

After inhalation of fungal propagules from the environment, some individuals develop PCM infection, characterized by the absence of clinical signs and effective immune control of the fungus, and others progress to PCM disease, which may manifest as acute, subacute, or chronic forms with localized or disseminated involvement of multiple organs and tissues (Venturini et al, 2026).

Among non-human mammals, armadillos have been consistently implicated as natural reservoirs of *Paracoccidioides* spp., harboring the fungus at high frequencies in endemic areas (Krycyk et al., 2018). In contrast, the role of domestic animals, particularly dogs, in the epidemiology of PCM remains poorly understood. Dogs share close contact with humans and are frequently exposed to soil and organic matter, especially in rural and peri-urban environments, making them plausible indicators of environmental fungal presence (Ferguson et al., 2024). Early investigations in dogs revealed high rates of serological reactivity to *Paracoccidioides* antigens (Mós & Fava Netto, 1974; Ono et al., 2001), suggesting widespread exposure.

Given the fragmented and heterogeneous nature of the available literature, a comprehensive synthesis of experimental, seroepidemiological, and clinical evidence is necessary to clarify the relevance of canine infection by *Paracoccidioides* spp. Such an approach is particularly important within a One Health framework, in which animal data may

contribute to understanding environmental fungal circulation and human disease risk (Lebov et al., 2017; Ferguson et al., 2024). Therefore, the objective of this review was to systematically analyze and integrate the available literature on *Paracoccidioides* spp. infection and PCM in dogs, encompassing experimental infection models, immunological studies, seroepidemiological surveys, and naturally occurring clinical cases.

2. Materials and Methods

2.1. Literature review design

A bibliographic review was conducted to identify and synthesize scientific evidence regarding natural and experimental infection by *Paracoccidioides* spp. and PCM in dogs. The review aimed to summarize clinical, pathological, immunological, and epidemiological aspects of canine infection, as well as experimental models used to investigate host–pathogen interactions.

A comprehensive literature search was performed in PubMed/MEDLINE, Scopus, Web of Science, SciELO, and Google Scholar. Search was conducted using combinations of controlled vocabulary and free-text terms related to *Paracoccidioides* infection in dogs. The main keywords included: “*Paracoccidioides*”, “paracoccidioidomycosis”, “canine”, “dog”, “experimental infection”, “animal model”, and “domestic animals”. Boolean operators (“AND”, “OR”) were applied to refine the search strategy.

2.2. Eligibility criteria

Eligible publications included original research articles, case reports, case series, and experimental studies published in English, Portuguese, or Spanish. Studies were included if they met at least one of the following criteria:

- (i) reports of natural infection or clinical paracoccidioidomycosis in dogs;
- (ii) experimental studies involving controlled infection of dogs with *Paracoccidioides* spp.; and
- (iii) studies describing diagnostic, clinical, pathological, immunological, or molecular aspects of infection.

Exclusion criteria comprised: (i) studies not indexed in the scientific databases selected as eligibility criteria for the bibliographic review; (ii) studies involving animal species other than dogs without specific canine data; (iii) review articles, conference abstracts, editorials, and letters to the editor; and (iv) studies lacking sufficient methodological or diagnostic detail.

2.3. Data extraction and analysis

Data were systematically extracted from the selected studies using a standardized data collection form. The following information was recorded: year of publication, country, study type, number of animals evaluated, diagnostic methods employed, clinical manifestations and main findings. The extracted data were qualitatively synthesized and descriptively analyzed. Given the limited number of reported cases and the heterogeneity of study designs, a meta-analysis was not performed. The methodological quality of the included studies was assessed based on study design, diagnostic criteria, and completeness of reported data. Limitations related to publication bias, underreporting, and the scarcity of available studies were considered during interpretation of the findings.

3. Results and discussion

A systematic review of the literature identified 19 studies investigating *Paracoccidioides* spp. infection and PCM in dogs. Of these, nine were seroepidemiologic studies, four described naturally occurring clinical cases, four evaluated experimental infection models, and one

investigated immunological aspects of infection. One additional publication corresponded to a case report but was excluded according to the predefined eligibility criteria (Figure 1).

This distribution highlights both the predominance of serological approaches and the relative scarcity of confirmed clinical cases and experimental investigations in canine hosts.

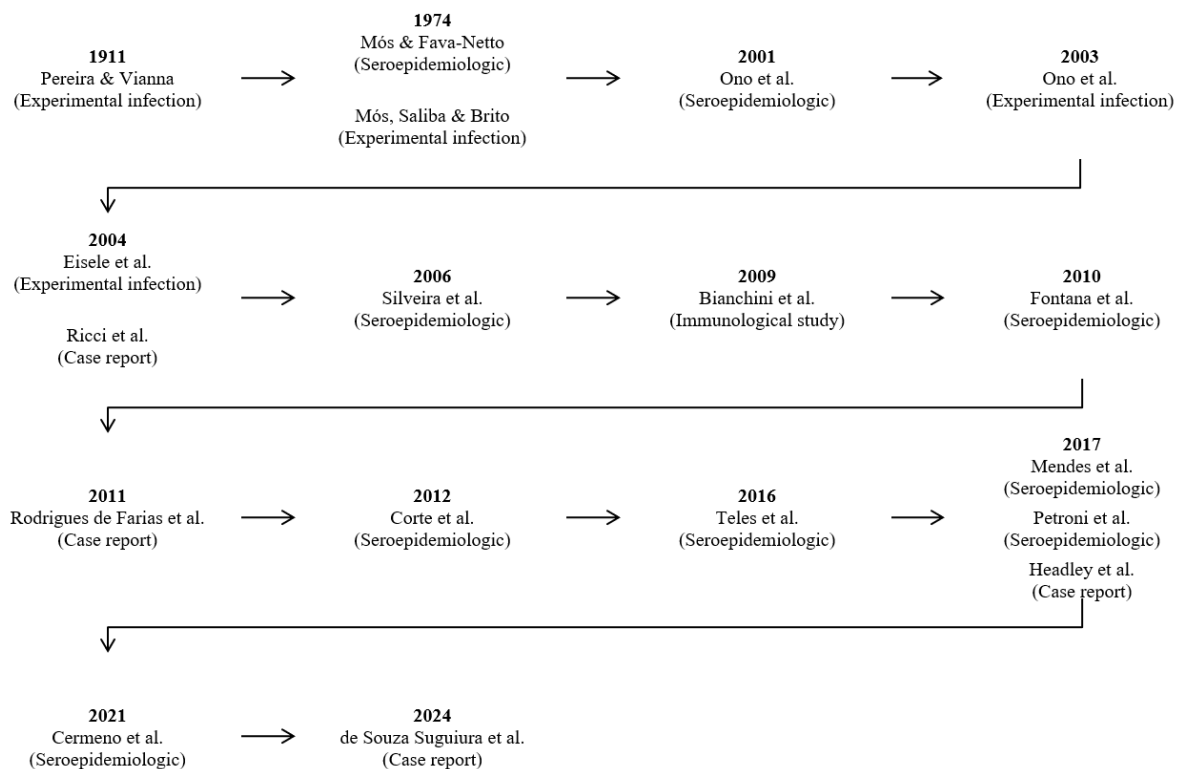


Figure 1. Timeline of Scientific Evidence on *Paracoccidioides* spp. Infection and Paracoccidioidomycosis in Dogs (1911–2024). Chronological distribution of studies identified in the systematic review, including experimental infection models, seroepidemiologic surveys, immunological investigations, and reports of naturally occurring canine PCM published between 1911 and 2024. The timeline illustrates the progressive development of knowledge regarding canine exposure, immune response, infection, and clinical disease associated with *Paracoccidioides* spp.

The literature review demonstrated that canine exposure to *Paracoccidioides* spp. has been reported in different endemic regions of South America, with serological evidence predominantly concentrated in Brazil and isolated reports in Venezuela (Figure 2). Seropositivity rates varied markedly among studies, ranging from 7% to 89%, depending on geographic region, diagnostic method, and sampled population. Higher seroprevalence values were observed in rural environments, particularly in early investigations conducted in endemic Brazilian areas, whereas lower frequencies were reported in urban canine populations.

Confirmed cases of canine PCM were exclusively described in Brazil and were geographically concentrated in southern and southeastern states, reinforcing the association between environmental fungal circulation and occurrence of clinical disease.

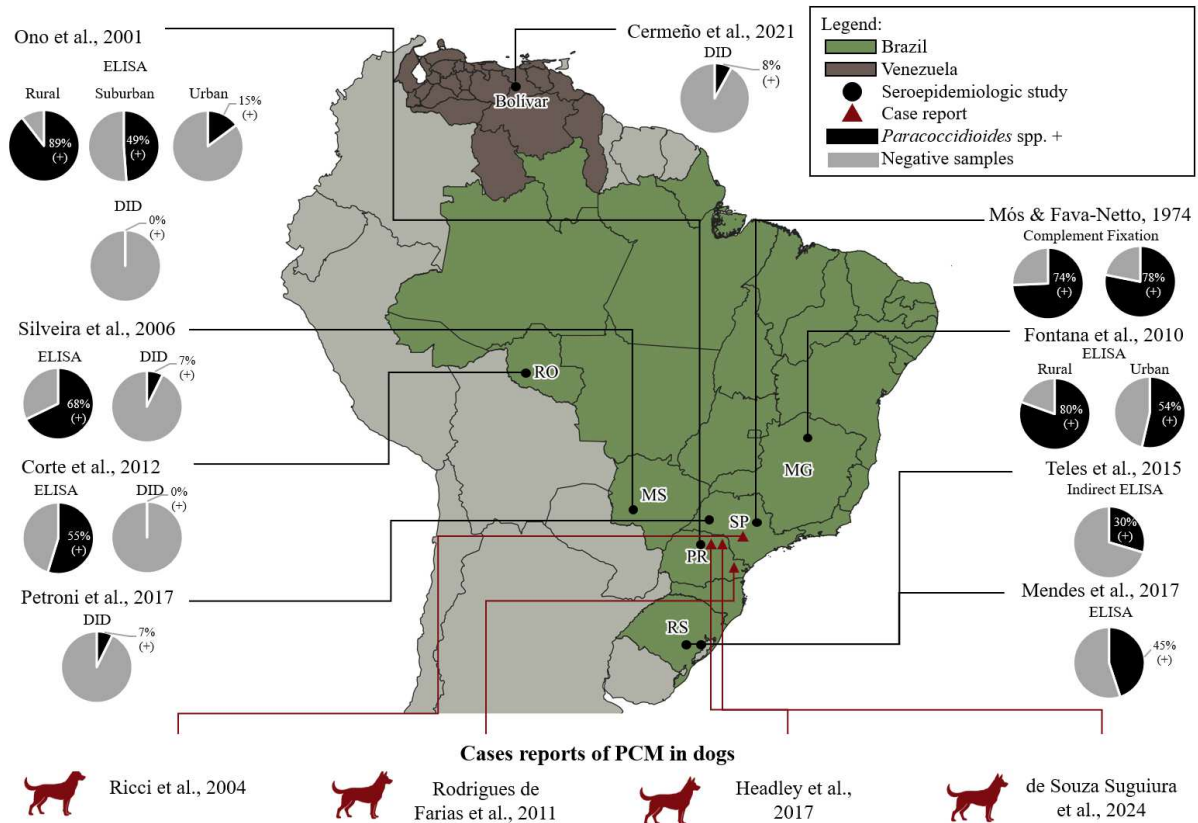


Figure 2. Geographic distribution of studies reporting dogs seropositive for anti-*Paracoccidioides* antibodies and confirmed cases of canine paracoccidioidomycosis in South America, based on published literature. Black circles indicate seroepidemiologic studies, while red triangles represent reports of confirmed canine paracoccidioidomycosis. Pie charts show the proportion of seropositive and seronegative animals reported in each study, with black indicating *Paracoccidioides brasiliensis* seropositivity, blue indicating *Paracoccidioides lutzi* seropositivity, and gray indicating negative samples. Red dog icons indicate individual reports of confirmed clinical disease.

The main characteristics and findings of the selected studies are summarized in Table 1, providing an integrated overview of the available evidence regarding occurrence, clinical manifestations, diagnostic approaches, and the epidemiological relevance of *Paracoccidioides* infection in dogs.

Table 1. Epidemiological, clinical, and diagnostic features of *Paracoccidioides* spp. infection in dogs reported in the literature.

Author(s) / Year	Country	Type	Sample	Diagnostic approach	Clinical manifestations	Main findings
Pereira & Vianna, 1911	Brazil	EI	1 dog	Histopathology	Systemic disease with pyogenic lesions	First report of blastomycosis (later recognized as PCM) in a dog.
Mós & Fava-Netto, 1974	Brazil	SE	145 dogs	CFT, precipitation, histopathological, microscopy, culture	Asymptomatic	High seroreactivity to <i>P. brasiliensis</i> , suggesting environmental exposure
Mós, Saliba & Brito, 1974	Brazil	EI	14 dogs	CFT, precipitation, histopathological, microscopy	Asymptomatic	Transient local infection and complement-fixing antibody production, with spontaneous resolution despite persistent serological response
Ono et al., 2001	Brazil	SE	305 dogs	DID, ELISA, skin test	Not assessed	Evidence of exposure to <i>Paracoccidioides</i> sp. in dogs, suggesting subclinical infection.
Ono et al., 2003	Brazil	EI	4 dogs	ELISA, skin test, clinical exam, histopathology	Asymptomatic	Confirmed susceptibility of dogs and antibody production with granulomatous inflammation and <i>P. brasiliensis</i> found in all organs
Eisele et al., 2004	Brazil	EI	6 dogs	DID, ELISA, skin test, clinical exam, histopathology	Lymphadenomegaly	Immune response profile of dogs infected with <i>P. brasiliensis</i>
Ricci et al., 2004	Brazil	CR	1 dog	Histopathology, Immunohistochemistry, nested PCR	Cervical lymphadenomegaly	First report of naturally acquired canine PCM.
Silveira et al., 2006	Brazil	SE	836 dogs	DID, ELISA, clinical exam	Discreet signs of illness	Serological evidence of <i>Paracoccidioides</i> sp. infection in dogs with leishmaniasis.
Bianchini et al., 2009	Brazil	IM	27 canine sera	Alternative hemolytic activity	Not applicable	Dog alternative complement pathway activation by <i>P. brasiliensis</i> .
Fontana et al., 2010	Brazil	SE	275 dogs	ELISA, skin test, clinical exam, histopathology	Asymptomatic	Evidence of exposure to <i>Paracoccidioides</i> sp. in dogs, suggesting natural resistance to develop PCM.
Rodrigues de Farias et al., 2011	Brazil	CR	1 dog	Culture, histopathology, immunohistochemistry, molecular sequencing, clinical exam	Lymphadenomegaly and hepatosplenomegaly, mild bronchial lung pattern, increase in mediastinal radiopacity	Second report of naturally acquired PCM, highlighted lymphatic involvement as a key manifestation.
Corte et al., 2012	Brazil	SE	126 dogs	DID, Indirect ELISA	Asymptomatic	First survey carried out with dogs from the Western Brazilian Amazon.
Teles et al., 2016	Brazil	SE	196 dogs	Indirect ELISA	Asymptomatic	Demonstrated subclinical exposure to <i>Paracoccidioides</i> sp.
Mendes et al., 2017	Brazil	SE	196 dogs	ELISA	Not assessed	First report of <i>Paracoccidioides lutzii</i> infection in dogs in southern Brazil
Petroni et al., 2017	Brazil	SE	300 dogs	DID, Western blotting	Associated with clinical leishmaniasis	High positive correlation between positivity for <i>L. infantum</i> and <i>P. brasiliensis</i> , suggesting an association between these infections
Headley et al., 2017	Brazil	CR	1 dog	Cytology, mycology, DID, western blot, molecular analysis	Dermatitis and lymphadenitis	Third report of clinical PCM in dog, detailed pathological description of cutaneous and lymph node involvement.
Cermeno et al., 2021	Venezuela	SE	200 dogs	DID	Appetite and weight loss, nasal discharge, itching, diarrhea, fever, and vomiting	Evidence of exposure to <i>Paracoccidioides</i> sp. in dogs in Venezuela.
de Souza Suguiura et al., 2024	Brazil	CR	1 dog	Histopathology, culture, molecular identification	Chronic systemic disease	Atypical chronic PCM caused by <i>P. brasiliensis</i> complex species.

EI: Experimental Infection

SE: Seroepidemiologic

CR: Case Report

IM: Immunological study

3.1. Experimental Infection and Immunological Studies of *Paracoccidioides* spp. in Dogs

Experimental studies evaluating canine susceptibility to *Paracoccidioides* spp. reveal a complex relationship between fungal exposure, development of disease, and host immune response. The earliest report by Pereira and Vianna (1911) provided historical evidence that dogs are biologically susceptible to *P. brasiliensis*, as inoculation of purulent material obtained from a human lesion resulted in rapid clinical deterioration and death within 22 days. However, because the inoculum consisted of non-standardized clinical material, this study has limited comparability with later experimental models and should be interpreted mainly as proof of biological plausibility rather than as a controlled reproduction of canine PCM.

In contrast, Mós et al. (1974) used a more defined experimental approach, inoculating 14 seronegative dogs via the testicular route with the cerebriform variant of *P. brasiliensis*. In this model, the fungus and characteristic lesions were detected by direct microscopy and histopathology from the 3rd to the 20th day after inoculation, indicating local establishment of infection. Nevertheless, the infection appeared to resolve spontaneously, despite increasing complement-fixation antibody titers up to 90 days after inoculation. Notably, all animals became positive by complement fixation, whereas no antibodies were detected by precipitation tests, suggesting that serological response varied according to the method used and that antibody detection did not necessarily correlate with progressive disease.

The experimental study by Ono et al. (2003) provides important evidence that dogs are susceptible to *P. brasiliensis* infection, but that the outcome of exposure may vary markedly among individuals. In this intravenous infection model, two of four puppies died one week after inoculation and showed severe disseminated infection. Although macroscopic lesions were mainly observed in the lungs, histopathological analysis using HE and Grocott staining demonstrated granulomatous inflammation and typical multibudding yeast cells of *P.*

brasiliensis in the lungs, spleen, and liver, with a particularly high fungal burden in the pulmonary tissue. The recovery of viable *P. brasiliensis* from all evaluated organs further confirmed active systemic infection. These findings indicate that intravenous inoculation can overcome early host barriers and lead to rapid fungal dissemination, especially in young animals, suggesting that age, inoculation route, and isolate virulence may strongly influence disease progression. In contrast, the two surviving dogs did not develop clinical signs compatible with PCM, such as fever, weight loss, or anorexia, and showed no macroscopic or microscopic lesions at one and five months post-inoculation. Moreover, fungal culture from the lungs, spleen, and liver was negative at these later time points. Despite the absence of active disease, both animals developed measurable immune responses. The positive gp43 skin tests, with indurations of 18 and 11 mm, and the intense inflammatory infiltrate composed of mononuclear and polymorphonuclear cells suggest the activation of a cellular immune response. In parallel, ELISA detected anti-gp43 antibodies after infection, with one dog showing titers of 1:100, 1:200, and 1:100 at 2, 3, and 4 weeks post-inoculation, respectively, and the other showing titers of 1:100, 1:400, 1:200, and 1:100 at 2, 3, 4, and 8 weeks post-infection, respectively. The transient nature of these antibody titers, together with the absence of lesions and negative cultures at later stages, suggests that serological response in dogs may reflect exposure and immune activation rather than persistent infection. The divergent outcomes observed in the same experimental model are particularly relevant for interpreting canine PCM. While two animals developed fatal disseminated disease, the other two appeared to control the infection effectively. This supports the hypothesis that dogs may range from highly susceptible hosts under specific experimental conditions to naturally resistant animals capable of limiting fungal persistence.

Eisele et al. (2004) provided further evidence supporting the dissociation between infection, clinical disease, and immune response. Young dogs experimentally infected

intravenously with *P. brasiliensis* developed detectable humoral and cellular immune responses, as demonstrated by ELISA for IgM and IgG anti-gp43 antibodies, double immunodiffusion (DID), and gp43 skin testing. IgM and IgG responses peaked in the first and second months after infection, respectively, and most infected dogs became positive by DID and skin testing. However, histopathological examination with H&E and Grocott stains failed to demonstrate fungal elements in tissues, and fungal isolation attempts were unsuccessful throughout follow-up. These findings suggest that dogs can mount measurable immune responses after experimental exposure without developing persistent lesions or recoverable infection. Therefore, serological positivity in experimental canine PCM should be interpreted cautiously: it may indicate exposure, antigenic stimulation, or transient infection rather than active disease.

The findings of Bianchini et al. (2009), showing activation of the canine alternative complement pathway by *P. brasiliensis*, provide a mechanistic explanation for these observations, suggesting that innate immune responses may contribute to fungal containment and spontaneous resolution in dogs. Overall, experimental evidence supports that dogs are susceptible to *Paracoccidioides* infection, but they often appear capable of controlling fungal progression, resulting in a spectrum that ranges from acute disseminated disease to subclinical infection characterized primarily by serological conversion.

Taking together, these studies indicate that the experimental outcome in dogs is strongly influenced by the nature of the inoculum, inoculation route, age of the animals, and diagnostic strategy employed. Direct microscopy, histopathology, and fungal culture provide stronger evidence of active infection and tissue involvement, whereas serological assays quantify host immune recognition but do not necessarily reflect disease severity or fungal persistence. Complement fixation, precipitation tests, DID, ELISA, and gp43 skin testing yielded different patterns of positivity across studies, highlighting that immune response is method-dependent

and may vary over time after inoculation.

3.2. Seroepidemiologic studies of *Paracoccidioides* spp. in dogs

The seroepidemiologic studies included in this review showed marked variation in canine seropositivity, with ELISA-based assays generally yielding higher positivity rates than DID. ELISA positivity ranged from 29% to 89%, with higher frequencies reported especially in rural dogs, such as 89% in Ono et al. (2001) and 80% in Fontana et al. (2010). In contrast, DID showed substantially lower positivity rates, ranging from 0% to 8%, including negative results in Ono et al. (2001) and Corte et al. (2012), and low positivity in Silveira et al. (2006), Petroni et al. (2017), and Cermenon et al. (2021). Although the higher ELISA reactivity may reflect greater sensitivity for detecting exposure to *Paracoccidioides* spp., these results should be interpreted with caution, as ELISA may be more susceptible to cross-reactivity with antibodies generated against other fungal pathogens. Therefore, the discrepancy between ELISA and DID suggests that ELISA may overestimate seropositivity in some contexts, whereas DID, despite its lower sensitivity, may provide greater specificity for confirming exposure or infection (Table 2).

Table 2 – Canine seropositivity for *Paracoccidioides* spp. in seroepidemiological studies

Author(s) / Year	Sample	Positivity
Mós & Fava-Netto, 1974	145 dogs	CFT: 74,33% e 78,12%
Ono et al., 2001	305 dogs	ELISA: 89% Rural, 49% Suburban, 15% Urban / DID: 0%
Silveira et al., 2006	836 dogs	ELISA: 68% / DID: 7%
Fontana et al., 2010	275 dogs	ELISA: 80% Rural; 54% Urban
Corte et al., 2012	126 dogs	ELISA: 55% / DID: 0%
Teles et al., 2016	196 dogs	ELISA: 30%
Mendes et al., 2017	196 dogs	ELISA: 29% <i>P. brasiliensis</i> , 11% <i>P. brasiliensis</i> + <i>P. lutzii</i>
Petroni et al., 2017	300 dogs	DID: 7%
Cermenon et al., 2021	200 dogs	DID: 8%

The earliest survey by Mós and Fava-Netto (1974) evaluated 145 dogs from São Paulo and Botucatu using complement fixation and tube precipitation tests. High positivity was observed by complement fixation, reaching 74.3% in dogs from São Paulo and 78.1% in dogs from Botucatu, whereas the precipitation test was positive in only one animal. However, necropsy of 37 dogs with high antibody titers did not reveal lesions, fungal structures, or positive cultures. These findings suggested, from the first serological surveys, that dogs may develop detectable humoral responses after exposure to *P. brasiliensis* without necessarily developing active or progressive disease.

Ono et al. (2001) introduced an important methodological advance by using ELISA to detect antibodies against gp43, a major antigen of *P. brasiliensis*, in 305 dogs from urban, suburban, and rural areas. The study demonstrated a clear environmental gradient, with positivity of 14.8% in urban dogs, 48.8% in suburban dogs, and 89.5% in rural dogs. Intradermal testing with gp43 also showed higher positivity in rural dogs than in suburban dogs. Despite this high seroreactivity, culture and histopathological examination of selected animals with high ELISA titers and strong skin test reactions failed to detect the fungus or compatible lesions. The main contribution of this study was to support the use of dogs as epidemiological markers of environmental exposure, while also reinforcing that seropositivity does not necessarily correspond to active infection.

Silveira et al. (2006) expanded this discussion by evaluating antibodies against *P. brasiliensis* in dogs seropositive and seronegative for leishmaniasis, using ELISA with gp43 and DID with exoantigen. The overall positivity was markedly higher by ELISA, reaching 67.8%, whereas immunodiffusion detected only 7.3% positive samples. Dogs positive for leishmaniasis showed higher reactivity to *P. brasiliensis* antigens than leishmaniasis-negative dogs, raising the possibility of co-exposure, co-infection, or serological cross-reactivity. This study was particularly relevant because it highlighted that ELISA, although more sensitive, may

overestimate exposure in some contexts, especially when antigenic preparations expose carbohydrate-rich components that can be shared among different fungal or infectious agents. In contrast, DID detected a much smaller proportion of positive animals, suggesting lower sensitivity but greater specificity.

Fontana et al. (2009) further supported the environmental interpretation of canine seropositivity by comparing urban and rural dogs from Uberaba, Minas Gerais, using ELISA and intradermal testing with gp43. ELISA positivity was 53.6% among urban dogs and 80.5% among rural dogs, again indicating greater exposure in rural environments. However, intradermal test positivity was much lower among urban dogs, and neither culture nor histopathology detected fungal elements or granulomatous lesions in euthanized animals. These results were consistent with those of Ono et al. (2001), indicating that dogs may frequently encounter *Paracoccidioides* spp. in endemic areas but often do not develop disease.

Corte et al. (2012) extended canine seroepidemiologic investigation to the Western Brazilian Amazon, evaluating urban dogs from Monte Negro, Rondônia, by indirect ELISA and DID. The study found 54.8% positivity by ELISA, whereas no samples were positive by DID. This was the first survey of *P. brasiliensis* infection in dogs from the Western Brazilian Amazon and suggested frequent canine exposure to fungal antigens in that region.

Teles et al. (2015) investigated stray and semi-domiciled dogs from Pelotas and Capão do Leão, Rio Grande do Sul, using indirect ELISA for anti-gp43 antibodies. Positivity was detected in 29.6% of the animals, with no significant association with sex, age, or breed, and seropositive dogs were identified in all evaluated neighborhoods. Compared with previous ELISA-based studies, this lower positivity may reflect regional differences in fungal distribution, animal exposure, antigenic composition, or cutoff definition. Nevertheless, the detection of seropositive animals across different neighborhoods suggested widespread environmental circulation of *P. brasiliensis* in southern Brazil.

Mendes et al. (2017) investigate serological reactivity to *Paracoccidioides* spp. in domestic and wild mammals from Rio Grande do Sul, including 196 dogs previously evaluated for *P. brasiliensis*. Among dogs, 28.8% showed reactivity only in the assay interpreted as anti-*P. lutzii*, while some animals also reacted to *P. brasiliensis* antigens. Although these findings suggested the possible circulation of antigenically related *Paracoccidioides* species in southern Brazil, they should be interpreted with caution. It is not possible to confirm that the animals were infected with *P. lutzii*, since species-specific antigens capable of unequivocally distinguishing *P. lutzii* from other members of the genus were not used. As highlighted by De Souza Suguiura et al. (2025), different *Paracoccidioides* species share several antigenic components recognized by host antibodies in ELISA and Western blot, and antigen recognition patterns are not consistently species-specific. The main contribution of the study, therefore, lies in highlighting the need to incorporate antigenic diversity, cross-reactivity, and molecular or species-specific diagnostic approaches into seroepidemiologic studies of *Paracoccidioides* spp.

Petroni et al. (2017) revisited the association between canine leishmaniasis and *P. brasiliensis* seroreactivity using immunodiffusion with exoantigen and Western blotting with recombinant gp43. Among 300 dogs, DID positivity was 7.3%, and 86% of DID-positive samples were also positive by Western blotting. This low percentage of positives by DID was similar to that reported by Silveira et al. (2006), contrasting with the higher ELISA rates observed in previous studies. The use of Western blotting as a complementary method strengthened the evidence that at least part of the DID-positive samples represented specific recognition of gp43, while also indicating that overlapping endemic areas for leishmaniasis and PCM may influence serological findings.

Finally, Cermeño et al. (2021) broadened the geographic scope of canine seroepidemiology by evaluating domestic dogs from Caroní, Bolívar State, Venezuela, using DID to detect antibodies against *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides* spp., and the

Sporothrix schenckii complex. Antibodies against *Paracoccidioides* spp. were detected in 7.0% of dogs, while 1.0% reacted to both *H. capsulatum* and *Paracoccidioides* spp. Although the positivity rate was lower than those reported in ELISA-based studies, the use of DID provided evidence of exposure in a different endemic setting and highlighted the coexistence of multiple dimorphic fungi in the same geographic area.

Overall, canine seroepidemiologic studies indicate frequent exposure to *Paracoccidioides* spp. in endemic areas, particularly in rural environments. The recurrent absence of fungal isolation, histopathological lesions, or clinical disease in seropositive animals supports the hypothesis that dogs often develop measurable immune responses after environmental exposure but may effectively control fungal progression. Therefore, dogs are valuable sentinel animals for mapping the environmental circulation of *Paracoccidioides* spp., provided that serological findings are interpreted considering test specificity, antigenic composition, possible cross-reactivity, and the distinction between exposure, infection, and disease.

3.3. Case reports of natural Paracoccidioidomycosis in dogs

Reported cases studies of naturally acquired canine have been essential for redefining the role of dogs in the epidemiology and pathogenesis of *Paracoccidioides* infection. Initially regarded mainly as sentinel animals that develop serological evidence of exposure without active disease, dogs are now recognized as potential hosts capable of developing clinical PCM under specific conditions.

The first confirmed natural case, described by Ricci et al. (2004), demonstrated active granulomatous lymphadenitis with abundant multibudding yeast cells, confirmed by histopathology, immunohistochemistry, and nested PCR, providing definitive evidence that canine infection can progress to disease. Subsequent reports expanded this clinical spectrum,

showing systemic involvement with lymphadenomegaly, hepatosplenomegaly, and weight loss; cutaneous manifestations associated with dermatitis and lymphadenitis; and, more recently, chronic mucocutaneous-like disease with progressive nasal deformity. Together, these cases indicate that canine PCM may resemble human disease in its systemic, lymphatic, cutaneous, and mucosal presentations, while also revealing important diagnostic challenges related to fungal isolation, molecular confirmation, antigenic variability, and heterogeneous humoral responses, including recognition of antigens other than gp43. Therefore, case reports are particularly valuable in this review because they bridge the gap between experimental susceptibility, serological exposure in endemic areas, and the rare but clinically relevant occurrence of active canine PCM.

Ricci et al. (2004) reported the first case of naturally acquired clinical PCM in a dog. The identification of active granulomatous lymphadenitis with abundant multibudding yeast cells, confirmed by histopathology, immunohistochemistry, and nested PCR, provided clear evidence that dogs can develop clinical PCM. This finding challenged the prevailing view that dogs act only as asymptomatic indicators of environmental exposure and showed that, under certain conditions, they may develop disease manifestations similar to those observed in humans.

Building on this first report, Rodrigues de Farias et al. (2011) described the second confirmed case of naturally acquired PCM in a dog. The systemic involvement, characterized by generalized lymphadenomegaly, hepatosplenomegaly, and marked weight loss, closely resembled the human PCM. Recovery of *P. brasiliensis* from lymph node tissue and its molecular characterization, showing high genetic similarity to human isolates, further support the absence of strict host-specific lineages. The favorable response to long-term itraconazole therapy also demonstrated that early recognition and appropriate antifungal treatment can result

in successful clinical management. Accordingly, PCM should be considered in the differential diagnosis of chronic lymphoproliferative disease in dogs from endemic regions.

Headley et al. (2017) expanded the recognized clinical spectrum of canine PCM by documenting the first case of *P. brasiliensis*-associated dermatitis accompanied by lymphadenitis. The use of a comprehensive diagnostic approach, integrating cytology, fungal culture, serology, and molecular analysis, strengthened the etiological confirmation and emphasized the diagnostic complexity of this mycosis. The presence of cutaneous lesions, common in human PCM but previously unreported in dogs, highlights the capacity of the fungus to disseminate beyond the mononuclear phagocyte system in canine hosts.

More recently, de Souza Suguiura et al. (2024) described an atypical and clinically informative case of chronic canine PCM that further refined the current understanding of the disease. The progressive nasal deformity closely resembled the classic mucocutaneous lesions seen in human PCM, suggesting shared pathogenic mechanisms across hosts. Notably, the humoral immune response was directed against gp70 rather than gp43, the major antigen traditionally used for PCM diagnosis. Molecular analysis grouped the isolate within the *P. brasiliensis* complex, reinforcing the genetic diversity of circulating strains. Collectively, these findings highlight the heterogeneity of clinical and immunological presentations in canine PCM and underscore the need for species-adapted diagnostic strategies to improve detection and understanding of this emerging veterinary mycosis.

These naturally acquired cases demonstrate that, although clinical PCM remains rare in dogs, infection can progress to overt disease with diverse systemic, lymphatic, cutaneous, and mucocutaneous manifestations. The variability observed among reported cases, particularly in clinical presentation, antigen recognition, and diagnostic confirmation, suggests that canine PCM may be influenced by both host-related factors and the biological diversity of *Paracoccidioides* spp. These reports also reinforce that dogs should not be regarded solely as

epidemiological sentinels of environmental exposure, but also as susceptible hosts in which active disease may occasionally develop. Nevertheless, the small number of confirmed cases and the heterogeneity of diagnostic approaches still limit a comprehensive characterization of canine PCM.

4. Conclusion

This systematic review demonstrates that dogs are frequently exposed to *Paracoccidioides* spp. in endemic regions, although reports of clinically overt PCM remain scarce. The predominance of seroepidemiological studies over experimental investigations and confirmed case reports reflects both the relative ease of detecting immunological sensitization and the difficulty in documenting active disease in canine hosts. Collectively, experimental and immunological studies provide strong evidence that dogs are biologically susceptible to *Paracoccidioides* infection; however, most exposed animals appear capable of mounting effective innate and adaptive immune responses that limit fungal persistence and prevent progression to clinical disease.

Seroepidemiological data consistently reveal high rates of antibodies reactivity, highlighting intense and widespread environmental circulation of *Paracoccidioides* spp. The recurrent dissociation between seropositivity and pathological confirmation underscores important limitations in interpreting serological assays as indicators of active infection, while simultaneously reinforcing their value for epidemiological surveillance. Dogs, therefore, emerge as sensitive sentinels of environmental exposure, capable of reflecting geographic distribution, ecological risk factors. The frequent overlap with other endemic infections, such as leishmaniasis, further emphasizes the shared ecological niches and the need for cautious interpretation of serological findings.

Although canine PCM may present clinical manifestations resembling those described in human disease, including systemic, lymphatic, cutaneous, and mucocutaneous involvement, the current evidence does not support a direct application of the human clinical classification to dogs. In humans, PCM is traditionally classified into asymptomatic infection and acute/subacute or chronic disease forms; however, in dogs, most available data derive from seroepidemiological studies showing exposure or immunological sensitization rather than confirmed active disease. The limited number of naturally acquired canine cases, together with the heterogeneity of clinical signs, diagnostic approaches, and immune responses, prevents the establishment of a standardized canine-specific classification. Therefore, human PCM categories may be useful as a comparative framework, but canine PCM should currently be interpreted more cautiously, ranging from environmental exposure and subclinical infection to rare cases of clinically overt disease.

In conclusion, the available evidence positions dogs as highly informative indicators of environmental exposure to *Paracoccidioides* spp. From a One Health perspective, integrating canine surveillance into epidemiological studies may enhance the understanding of fungal ecology, support early detection of endemic and emerging areas, and contribute to improved risk assessment for both animal and human populations.

5. References

- Bianchini AAC, Petroni TF, Fedatto PF, Bianchini RR, Venancio EJ, Itano EN, et al. Activation of the alternative complement pathway in canine normal serum by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Braz J Microbiol.* 2009;40(2):234-7. doi:10.1590/S1517-83822009000200005.
- Cermeño JR, Ortiz JC, Quintero AK. Detección de anticuerpos contra *Histoplasma capsulatum*, complejo *Paracoccidioides* y complejo *Sporothrix schenckii* en *Canis familiaris*, mediante la prueba de inmunodifusión en gel de agarosa. Municipio Caroní, estado Bolívar, Venezuela. *Invest Clin.* 2021;62(3):208-18. doi:10.22209/IC.v62n3a02.
- Corte AC, Gennari SM, Labruna MB, Camargo L, Itano EN, Freire RL, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in dogs from Western Brazilian Amazon. *Pesqui Vet Bras.* 2012;32(7):649-52. doi:10.1590/S0100-736X2012000700011.

de Souza Suguiura, IM, et al. Antigenic Similarity Between Different *Paracoccidioides* Species in a Murine Model of Paracoccidioidomycosis Reveals High IgG Avidity for the 70 kDa Antigen. *Mycopathologia* 190.3. 2025; 46.

Eisele RC, Juliani LC, Belitardo DR, Itano EN, Estevão D, Bracarense APFRL, et al. Immune response in dogs experimentally infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*. 2004;42(6):549-53. doi:10.1080/13693780400005940.

Ferguson AJ, Thompson GR, Bruyette D, Sykes JE. The dog as a sentinel and animal model for coccidioidomycosis. *Med Mycol*. 2024;62(1):myad139. doi:10.1093/mmy/myad139.

Fontana FF, dos Santos CTB, Esteves FM, Rocha A, Fernandes GF, do Amaral CC, et al. Seroepidemiological survey of paracoccidioidomycosis infection among urban and rural dogs from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Mycopathologia*. 2010;169(3):159-65. doi:10.1007/s11046-009-9241-5.

Headley SA, Pretto-Giordano LG, Di Santis GW, Gomes LA, Macagnan R, da Nóbrega DF, et al. *Paracoccidioides brasiliensis*-associated dermatitis and lymphadenitis in a dog. *Mycopathologia*. 2017;182(3-4):425-34. doi:10.1007/s11046-016-0075-7.

Hrycyk MF, Garcia Garces H, Bosco SMG, de Oliveira SL, Marques SA, Bagagli E. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*, *P. lutzii* and related species: infection in armadillos, soil occurrence and mycological aspects. *Med Mycol*. 2018;56(8):950-62. doi:10.1093/mmy/myx142.

Lebov J, Grieger K, Womack D, Zaccaro D, Whitehead N, Kowalczyk B, et al. A framework for One Health research. *One Health*. 2017;3:44-50. doi:10.1016/j.onehlt.2017.03.004.

Martinez R. New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology. *J Fungi (Basel)*. 2017;3(1):1. doi:10.3390/jof3010001.

Mendes JF, Klafke GB, Albano APN, Cabana ÂL, Teles AJ, de Camargo ZP, et al. Paracoccidioidomycosis infection in domestic and wild mammals by *Paracoccidioides lutzii*. *Mycoses*. 2017;60(6):402-6. doi:10.1111/myc.12608.

Mós EDN, Netto CF. Contribuição ao estudo da paracoccidioidomicose. I. Possível papel epidemiológico dos cães: estudo sorológico e anátomo-patológico. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1974;16(3):154-9.

Mós EN, Netto CF, Saliba AM, Brito T. Contribuição ao estudo da paracoccidioidomicose. II. Infecção experimental do cão. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1974;16(4):232-7.

Ono MA, Bracarense APFRL, Morais HSA, Trapp SM, Belitardo DR, Camargo ZP. Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. *Med Mycol*. 2001;39(3):277-82. doi:10.1080/MMY.39.3.277.282.

Ono MA, Kishima MO, Itano EN, Bracarense APFRL, Camargo ZP. Experimental paracoccidioidomycosis in dogs. *Med Mycol*. 2003;41(3):265-8. doi:10.1080/13693780310001597395.

Peçanha PM, Peçanha-Pietrobon PM, Grão-Velloso TR, Rosa Júnior M, Falqueto A, Gonçalves SS. Paracoccidioidomycosis: what we know and what is new in epidemiology, diagnosis, and treatment. *J Fungi (Basel)*. 2022;8(10):1098. doi:10.3390/jof8101098.

Pereira M, Vianna GO. A propósito de um caso de blastomicose (*Pyohemia blastomycotica*). *Arq Bras Med*. 1911;1:63-83.

Petroni TF, Bonfietti LX, Zaninelli TH, Itano EN, Ono MA. Serological evidence of infection by *Paracoccidioides brasiliensis* in dogs with leishmaniasis. *Mycopathologia*. 2017;182(9-10):947-52. doi:10.1007/s11046-017-0148-2.

Rodrigues de Farias M, Condas LAZ, Ribeiro MG, Bosco SMG, Muro MD, Werner J, et al. Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly. *Mycopathologia*. 2011;172(2):147-52. doi:10.1007/s11046-011-9412-z.

Silveira LH, Domingos IH, Kouchi K, Itano EN, Silva EA, Landgraf VO, et al. Serological detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in dogs with leishmaniasis. *Mycopathologia*. 2006;162(5):325-9. doi:10.1007/s11046-006-0046-5.

de Souza Suguiura IM, Navolar FMN, Souza BA, Simioni MLS, de Carvalho Ishiuchi GG, Macagnan R, et al. An atypical case of chronic paracoccidioidomycosis in a dog caused by a fungus from the *Paracoccidioides brasiliensis* complex. *Vet Res Commun*. 2024;48(4):2583-8. doi:10.1007/s11259-024-10413-0.

Teixeira MM, Theodoro RC, Niño-Vega G, Bagagli E, Felipe MSS. *Paracoccidioides* species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. *PLoS Pathog*. 2014;10(10):e1004397. doi:10.1371/journal.ppat.1004397.

Teles AJ, Klafke GB, Cabana ÂL, Albano APN, Xavier MO, Meireles MCA. Serological investigation into *Paracoccidioides brasiliensis* infection in dogs from Southern Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathologia*. 2016;181(5-6):323-8. doi:10.1007/s11046-015-9972-4.

5.2 ARTIGO 2

Serological evidence and spatial patterns of exposure to *Leishmania infantum* and *Paracoccidioides* spp. in dogs from Foz do Iguaçu, a Brazil–Paraguay–Argentina triple-border region

Abstract

International border regions are epidemiologically relevant because neighboring countries often share pathogens, vectors, reservoirs, and environmental risk factors. In this context, Foz do Iguaçu, located at the triple border of Brazil, Paraguay, and Argentina, is endemic for visceral leishmaniasis and presents a high incidence of human paracoccidioidomycosis (PCM). Given the endemic overlap of both pathogens and the limited data available in this region, this study evaluated seropositivity for *Paracoccidioides* spp. in dogs positive and negative for *Leishmania infantum* and described the spatial distribution of seropositive animals in urban areas of Foz do Iguaçu. A total of 250 canine serum samples were analyzed using serological tests, clinical evaluation, and spatial kernel density analysis. Canine visceral leishmaniasis (CVL) showed high seroprevalence (35.6%), although antibodies against *Paracoccidioides* were detected in 8.4% of the dogs analyzed. All animals seropositive for *Paracoccidioides* were also seropositive for *L. infantum*. A significant association and moderate correlation were observed between the infection by both pathogens. Spatial analysis revealed heterogeneous distribution and localized clustering of cases. These findings highlight the endemicity of CVL and *Paracoccidioides* spp. in the municipality, suggesting shared environmental conditions favoring exposure to both pathogens, and reinforce the importance of integrated One Health surveillance in endemic areas for both diseases.

Keywords: Canine visceral leishmaniasis; Paracoccidioidomycosis; Neglected Tropical Disease; Epidemiological surveillance; Zoonosis

1. Introduction

International border regions in the Americas represent important epidemiological settings because neighboring countries often share similar transmission dynamics, including circulating pathogens, vectors, reservoirs, and environmental risk factors (Lopes et al., 2023).

Visceral leishmaniasis (VL) is a neglected tropical disease responsible for approximately 30,000 new human cases each year worldwide (OPAS, 2025). In the Americas, Brazil accounts for nearly 97% of reported human cases, remaining the principal endemic country in the region, while domestic dogs constitute the main urban reservoir of the parasite (OPAS, 2020). In southern Brazil, the epidemiological expansion of VL became evident in Paraná state with the first detection of phlebotomine vectors in 2012 (Santos et al., 2012), followed by canine cases in 2013 (Dias et al., 2013) and the first autochthonous human cases in 2015 (Trench, 2016), all recorded in Foz do Iguaçu, a municipality located at the triple border with Paraguay and Argentina. Since then, the municipality has remained endemic, with sustained transmission associated with intense cross-border mobility, the presence of competent vectors, and a large canine reservoir population (Moreira, 2026). Similar epidemiological conditions have also been reported in neighboring Paraguay and Argentina, where environmental and social determinants continue to influence VL transmission dynamics (Moreira, 2026).

PCM, in turn, is a systemic granulomatous mycosis caused by thermodimorphic fungi of the genus *Paracoccidioides* (Peçanha et al., 2022). Among endemic countries, Brazil accounts for approximately 80% of reported cases, representing the highest disease burden worldwide (Martinez, 2017). Although PCM is also endemic in Argentina (Tracogna et al., 2019) and Paraguay (Araújo López et al., 2024), epidemiological indicators such as prevalence and incidence remain poorly defined across much of Latin America (Venturini et al., 2026).

Within Brazil, annual human PCM incidence ranges from 0.71 to 3.70 cases per 100,000 inhabitants (Martinez, 2017). Paraná is considered an important endemic area, with a cumulative incidence of 6.4 cases per 100,000 inhabitants (de Suguiura & Ono, 2022). Notably, Foz do Iguaçu presents the highest cumulative incidence in the state, reaching 9.7 cases per 10,000 inhabitants (de Suguiura & Ono, 2022). This epidemiological profile has been

associated with regional environmental conditions, including abundant rainfall, moderate temperatures, acidic soils, and preserved vegetation, all of which favor fungal survival and sporulation (Mendes et al., 2017). In addition, anthropogenic activities such as deforestation, agricultural expansion, and urban soil disturbance may increase human and animal exposure to infective propagules (Rodrigues-Vendramini et al., 2019).

Evidence of *Paracoccidioides* infection in dogs has been demonstrated through serological (Ono et al., 2001; Silveira et al., 2006; Teles et al., 2015) and pathological studies (Ricci et al., 2004; Rodrigues de Farias et al., 2011; Headley et al., 2017; de Souza Suguiura et al., 2024), supporting the role of dogs as environmental sentinels of fungal circulation. In addition, previous studies have suggested a relationship between *Paracoccidioides* spp. and *Leishmania* spp. in canine populations, with positive correlations reported in coinfecting animals (Silveira et al., 2006; Petroni et al., 2017). Considering the endemic overlap of both pathogens in the triple-border region, this study aimed to evaluate seropositivity for *Paracoccidioides* spp. in dogs positive and negative for *Leishmania infantum*, and to describe the spatial distribution of seropositive animals in the urban regions of Foz do Iguaçu, Paraná Brazil.

2. Materials and Methods

2.1. Study area

Foz do Iguaçu (25°32'49" S, 54°35'18" W) is a Brazilian municipality located in the triple-border region between Brazil, Paraguay, and Argentina. The municipality covers an area of 617.7 km², of which 197.2 km² correspond to the urban area (PMFI, 2018), and has an estimated population of 297,352 inhabitants, resulting in a population density of 468.5 inhabitants per km² (IBGE, 2025).

The local climate is classified as humid subtropical (Cfa), characterized by hot summers and rainfall distributed throughout the year (PMFI, 2020). The municipality is divided into five

main urban regions (North, West, Northeast, East, and South), which differ in terms of territorial extent, number of properties, and population distribution.

A domestic animal census conducted by ZCC-FOZ in 2014 estimated a population of approximately 55,000 domestic dogs and cats in the municipality (CCZ-FOZ, 2018a). Epidemiological surveillance of Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) is routinely conducted by ZCC-FOZ (CCZ-FOZ, 2018b).

2.2. Data and samples collection and analysis

This study was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University for Latin American Integration (CEUA-UNILA No. 004/2021).

Blood samples were collected from domestic dogs between March and August 2022. For the diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis (CVL), the Dual Path Platform TR-DPP® immunochromatographic screening test (Bio-Manguinhos/Fiocruz, Brazil) was performed. Samples that tested positive in the screening test were subsequently sent to the Central Laboratory of the State of Paraná (LACEN-PR) for confirmatory ELISA testing.

Information on each animal was obtained through a standardized epidemiological form, including data on residential address, sex, age, place of birth, recent travel history outside the municipality, and whether the animal had been rescued from the streets. During clinical evaluation, signs were also recorded, including lymphadenomegaly, alopecia, furfuraceous desquamation, ulcerative lesions, onychogryphosis, muscular atrophy, and weight loss.

Statistical analyses were performed using the chi-square test with Yates' correction to evaluate associations between categorical variables. The phi coefficient (ϕ) was used to assess the correlation between the pathogens. A significance level of 5% ($p < 0.05$) was adopted. All analyses were conducted using BioEstat software, version 5.0.

2.3. Serological analysis

All serum samples were tested for antibodies against *Paracoccidioides* spp. using the double immunodiffusion (DID) assay with *P. brasiliensis* exoantigen (B-339), following the method previously described by Camargo et al. (1988). Positive control serum from a dog diagnosed with *P. brasiliensis* infection was included in all assays. Serum samples were tested qualitatively, without serial dilution or antibody titer determination.

2.4. Georeferencing and Spatial Analysis with Density Map (Kernel)

Spatial analyses were performed using QGIS software (version 3.42.1). The residential addresses recorded in the epidemiological forms were geocoded to obtain geographic coordinates (latitude and longitude). Cartographic base data were obtained from official sources, including the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) and regional geoinformation agencies.

Kernel density estimation (KDE) was applied to the georeferenced data to identify areas with higher concentrations of seropositive cases. This spatial statistical method estimates the density of point events across a geographic surface, generating a continuous density map that highlights areas of higher occurrence.

The analysis was conducted using the “Heatmap (Kernel Density Estimation)” tool available in QGIS. The resulting maps represent case density using a color gradient, where warmer colors indicate areas with higher concentrations of cases, facilitating the identification of potential clusters and supporting spatial epidemiological interpretation.

3. Results

3.1. Seropositivity for *L. infantum* and *Paracoccidioides* spp. in dogs

A total of 250 canine blood samples were collected, including 166 (66.4%) females and

84 (33.6%) males. Serological analysis identified 89 animals (35.6%) positive for *L. infantum* infection. Among these, 53 (59.6%) were females and 36 (40.4%) were males. Statistical analysis showed no significant association between sex and seropositivity for *L. infantum*. ($\chi^2 = 2.43$; $df = 1$; $p = 0.12$).

Antibodies against *Paracoccidioides* spp. were detected in 21 dogs (8.4%). All *Paracoccidioides*-seropositive samples were also positive for *L. infantum*, representing 23.6% of the CVL-positive animals. No *Paracoccidioides* seropositivity was observed among *Leishmania*-negative samples. Statistical analysis revealed a significant association between seropositivity for *L. infantum* and *Paracoccidioides* spp. ($\chi^2 = 42.0$; $df = 1$; $p < 0.001$), with a moderate positive correlation ($\phi = 0.41$). No association was observed between sex and seropositivity for *Paracoccidioides* spp. ($\chi^2 = 0.05$; $df = 1$; $p = 0.82$) (Table 1).

Table 1. Distribution of positive and negative samples analyzed between March and August 2022, according to district in Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil

District	<i>L. infantum</i>	<i>Paracoccidioides</i> spp	Negative	Total Samples
North	29	5	64	98
West	32	8	14	54
North East	18	5	30	53
East	8	2	30	40
South	2	1	2	5
Total	89	21	140	250

Among the 89 dogs seropositive for *L. infantum*, several clinical manifestations commonly associated with CVL were observed. Lymphadenomegaly was the most frequent sign, affecting 60 animals (67.4%), followed by ulcerative skin lesions in 38 (42.7%). Onychogryphosis was observed in 32 dogs (35.9%), alopecia in 26 (29.2%), and weight loss in 24 (26.9%). Other clinical signs included furfuraceous desquamation in 22 animals (24.7%) and muscular atrophy in 19 (21.3%). Additional non-specific signs, such as lethargy,

conjunctivitis, or gastrointestinal alterations, were reported in 10 dogs (11.2%).

Of the 250 dogs evaluated, 78 (31.2%) showed no clinical signs compatible with the investigated diseases. Among these asymptomatic animals, 14 (17.9%) tested positive for CVL, while none were positive for *Paracoccidioides* antibodies. In contrast, 172 dogs (68.8%) presented one or more clinical signs; of these, 75 (43.6%) were positive for CVL. All 21 dogs seropositive for *Paracoccidioides* spp. were observed exclusively among clinically symptomatic animals. Additionally, 97 symptomatic dogs (56.4%) tested negative in both diagnostic assays.

Statistical analysis demonstrated a significant association between the presence of clinical signs and seropositivity for *L. infantum* ($\chi^2 = 14.31$; $df = 1$; $p = 0.00015$) and *Paracoccidioides* spp. ($\chi^2 = 8.87$; $df = 1$; $p = 0.003$). The epidemiological and clinical characteristics of the 21 dogs seropositive for both pathogens are summarized in Table 2.

Table 2. Epidemiological and clinical characteristics of dogs seropositive for *Paracoccidioides* spp. and *Leishmania infantum* in Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil, 2022

Sex	Female:	13	(62%)
	Male:	08	(38%)
Age	Puppyhood (< 1 year)	03	(14%)
	Adulthood (1 to 12 years)	13	(62%)
	Senior (> 12 years)	02	(10%)
	Unknown:	03	(14%)
City of birth	Foz do Iguaçu (Paraná, Brazil):	14	(67%)
	Other cities in Paraná (Brazil):	04	(19%)
	Unknown:	03	(14%)
Has the animal left the city in the last 12 months?	Yes:	01	(4.7%)*
	No:	20	(95.3%)
Was the animal rescued from the street?	Yes:	03	(14.3%)**
	No:	18	(85.7%)
Clinical Signs	Lymphadenomegaly	17	(80.9%)
	Ulcerated Lesions	12	(57.1%)

Alopecia	11	(52.4%)
Weight loss	09	(42.8%)
Onychogryphosis	08	(38.1%)
Furfuraceous desquamation	07	(33.3%)
Mass atrophy	05	(23.8%)
Others	04	(19.0%)

Percentage based on the 21 animals.

*The animal went to the city of São Paulo in Brazil.

**All animals rescued from the street remained living in the same region where they were found.

3.2. Spatial distribution of canine seropositivity for *L. infantum* and *Paracoccidioides* spp.

The spatial distribution of the sampled animals showed a predominance of dogs originating from the northern region of the municipality, which accounted for 39% of the total samples analyzed. The eastern and northeastern regions represented 22% and 21% of the samples, respectively, while the western region contributed 16%. The southern region had the lowest sampling frequency, corresponding to only 2% of the total dataset (Figure 1).

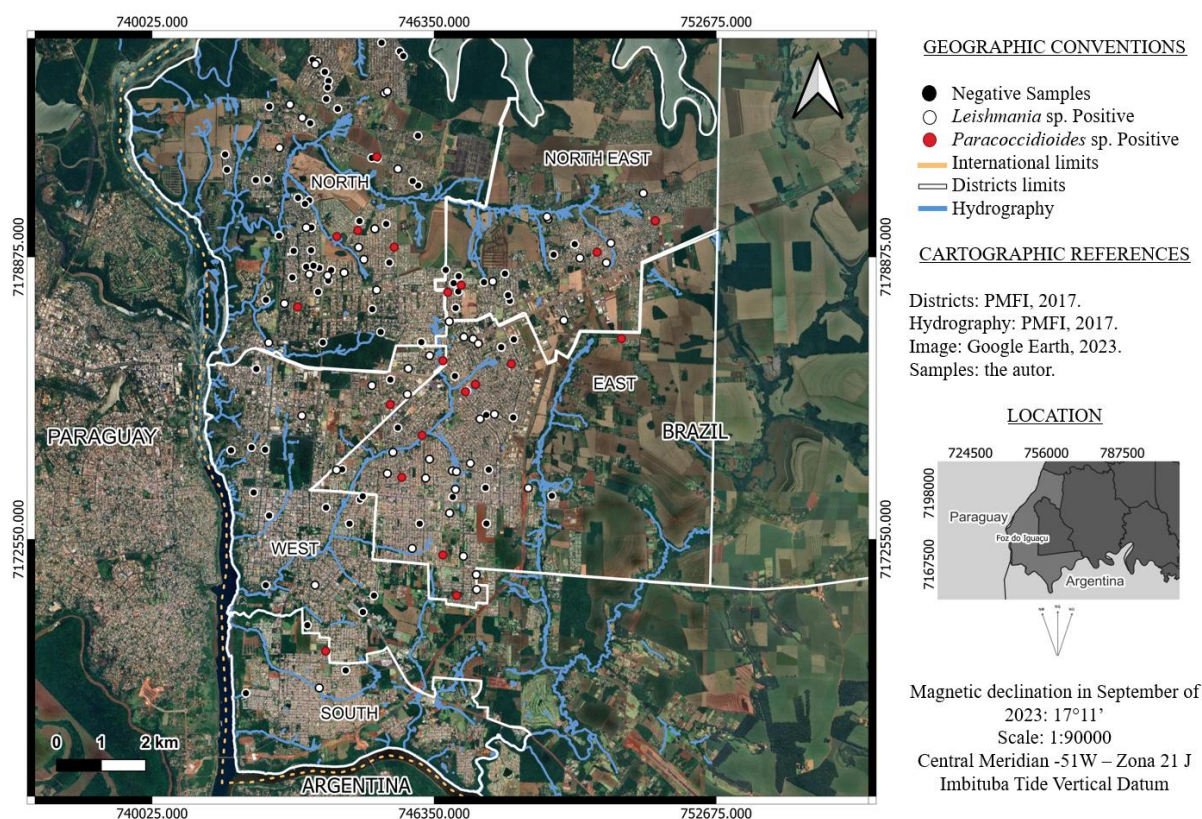


Figure 1. Spatial distribution of the dog serum samples in Foz do Iguaçu, PR, Brazil. Samples from all regions of the municipality were analyzed, with cases of positive serology for *L. infantum* and *Paracoccidioides* spp. distributed throughout all regions.

Among dogs seropositive for *L. infantum*, the eastern region presented the highest number of cases (32; 36%), followed by the northern region (29; 33%). The northeastern region accounted for 18 positive animals (20%), while the western region presented eight cases (9%). Only two cases (2%) were identified in the southern region. Kernel density analysis revealed a higher concentration of cases in the northern and northeastern areas of the municipality (Figure 2).

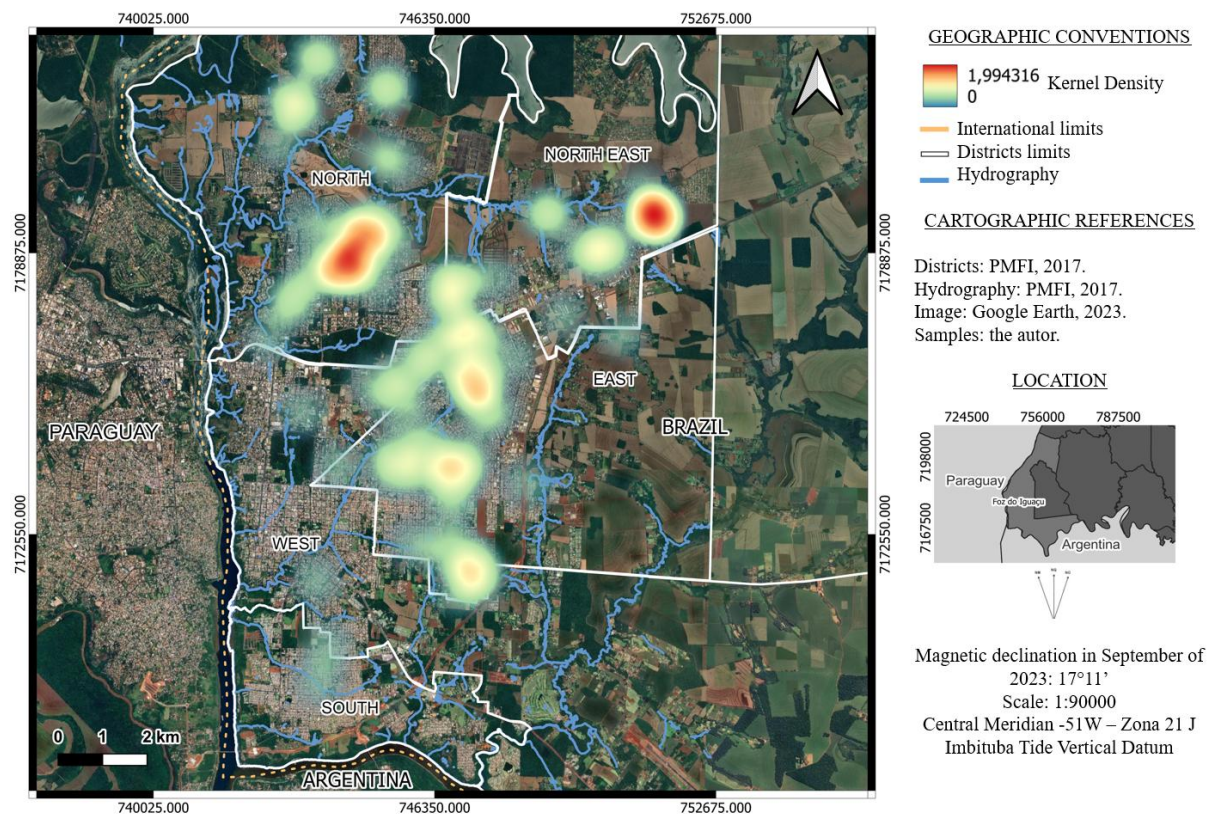


Figure 2. Kernel density analysis of seropositive samples for *Leishmania infantum* in Foz do Iguaçu, PR, Brazil. The analysis showed a higher concentration of cases in the northern and northeastern regions of the municipality.

Regarding *Paracoccidioides* spp., 21 seropositive cases were identified. The eastern region presented the highest number of positive animals (8; 38%), followed by the northern and northeastern regions, each with five cases (24%). Two positive dogs (9%) were identified in

the western region, while a single case (5%) was recorded in the southern region. Kernel density analysis demonstrated greater spatial clustering of seropositive cases in the northern, northeastern, and eastern sectors of the municipality (Figure 3).

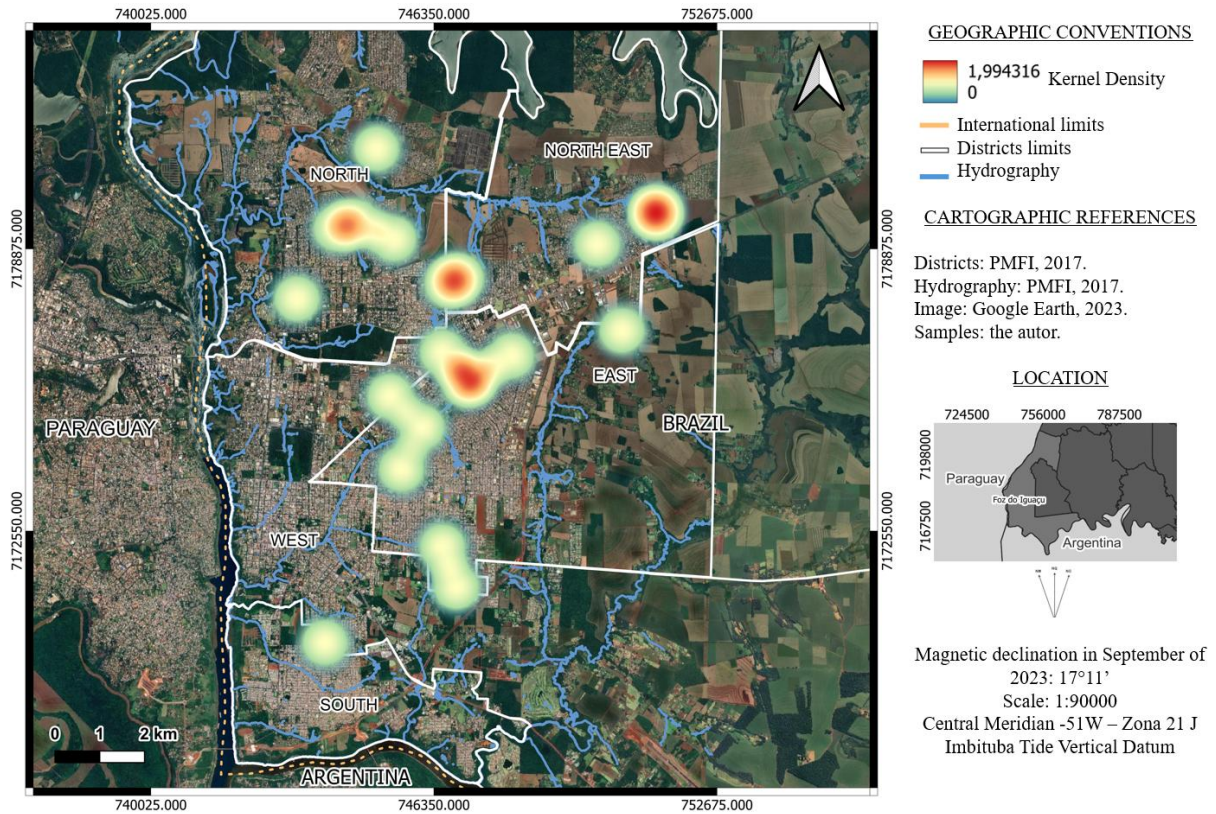


Figure 3. Kernel density analysis of seropositive samples for *Paracoccidioides* spp. in Foz do Iguaçu, PR, Brazil. The analysis showed a higher concentration of cases in the northern, northeastern, and eastern regions.

4. Discussion

Foz do Iguaçu has the highest cumulative incidence of human PCM in the state of Paraná (de Suguiura & Ono, 2022). Despite this elevated incidence, studies investigating PCM in the region remain scarce, both in the human population and in animal hosts, which may act as environmental sentinels of fungal circulation (Ferguson et al., 2024). To date, no studies have assessed the occurrence of *Paracoccidioides* spp. in animals in this municipality. Consequently, this pathogen is rarely considered in routine veterinary clinical investigations in dogs, which may contribute to the underrecognition and underreporting of animal infections. This knowledge gap is particularly relevant given that the region exhibits environmental conditions

conducive to the development e persistence of pathogenic fungi, including high humidity, mild temperatures, and the presence of exposed soil and dense vegetation (Teixeira et al., 2014; Mendes, 2017). In this context, integrated investigations adopting a One Health approach are essential to improve the understanding of PCM transmission dynamics and to strengthen regional epidemiological surveillance.

In this study, a high seroprevalence of CVL was observed, with 35.6% of dogs testing positive for *L. infantum*. This finding is consistent with previous studies conducted in Foz do Iguaçu, which reported prevalences of 23.8% in 2014 and 37.94% between 2015 and 2020 (Thomaz Soccol et al., 2017; Chiyo et al., 2023), confirming the persistence of active transmission in the municipality.

Immunodiffusion using exoantigen is a classical, specific, and widely used method for the immunodiagnosis of PCM, particularly in active human disease, since reactivity in this assay is generally associated with patients presenting clinical manifestations (Shikanai-Yassuda et al., 2018). In the present study, seropositivity by DID for *Paracoccidioides* spp. was detected in 8.4% of the dogs evaluated. Notably, all seropositive animals were also positive for *L. infantum*, and statistical analysis revealed a significant association between the two pathogens. This finding is consistent with Silveira et al. (2006) and Petroni et al. (2017), both of whom reported 7.3% positivity for *P. brasiliensis* by DID and observed higher reactivity among dogs positive for leishmaniasis. Petroni et al. (2017) also found that all samples reactive to *P. brasiliensis* exoantigen were from dogs seropositive for *Leishmania* sp., and 86% of these immunodiffusion-positive samples were confirmed by Western blotting using recombinant non-glycosylated gp43.

However, the absence of *Paracoccidioides* seropositivity among *Leishmania*-negative animals resulted in an empty cell in the contingency table, limiting the robustness of statistical estimates and preventing causal inference (Agresti & Kateri, 2025). In addition, because

confirmatory Western blotting, fungal isolation, histopathology, or molecular assays were not performed, it is not possible to determine whether DID reactivity reflects active infection, previous exposure, or, less likely, serological cross-reactivity. Thus, the exclusive detection of *Paracoccidioides* antibodies among CVL-positive dogs may indicate shared environmental exposure, overlapping endemicity, host-related susceptibility, or immune alterations associated with CVL.

The presence of clinical signs was significantly associated with CVL seropositivity, and the clinical manifestations observed are consistent with the classical clinical profile of the disease (Ordeix et al., 2019). In this study, the identification of seropositive animals without clinical signs (17,9%) highlights the epidemiological importance of subclinical infections, reinforcing previous observations that infected animals may remain clinically silent while still contributing to parasite maintenance in endemic areas (Singh et al., 2014; Thomaz Soccol et al., 2017).

All dogs seropositive for both *L. infantum* and *Paracoccidioides* spp. presented clinical signs, suggesting that coinfection may influence clinical expression. Both CVL and PCM are infections in which the clinical outcome depends largely on the balance between protective cell-mediated immunity and regulatory or humoral-biased immune responses.

In leishmaniasis, resistance to *L. infantum* is associated with a dominant Th1-type response, involving CD4⁺ Th1 and CD8⁺ Tc1 cells, production of IFN- γ , TNF- α and IL-2, macrophage activation, increased phagocytosis, reactive oxygen species generation and parasite killing (Yasmin et al., 2022). Conversely, progression of VL is favored by a Th2/regulatory profile, with increased IL-4, IL-10 and TGF- β , which dampen macrophage activation, inhibit effective phagocytosis and reduce microbicidal mechanisms, allowing parasite persistence and dissemination (Yasmin et al., 2022).

A similar immunological dichotomy is observed in PCM: effective control of

Paracoccidioides spp. is associated with a Th1 response, macrophage activation and formation of compact granulomas capable of limiting fungal proliferation, whereas severe disseminated or acute/subacute disease is linked to a Th2-skewed response, characterized by IL-4, IL-5, IL-10 and TGF- β , intense B-cell activation, high antibody production and poorly controlled fungal dissemination (Hahn et al., 2022). Therefore, in dogs with CVL, the immunomodulatory environment induced by *L. infantum* infection may theoretically reduce the host's ability to contain *Paracoccidioides* spp., favoring fungal persistence, reactivation or progression from exposure to active disease. However, interpretation of PCM-related clinical manifestations in dogs remains limited, as only a small number of confirmed cases have been described in the literature (Ricci et al., 2004; Rodrigues de Farias et al., 2011; Headley et al., 2017; de Souza Suguiura et al., 2024).

The large proportion of symptomatic animals negative for both pathogens further emphasizes the nonspecific nature of clinical signs often attributed to CVL and systemic mycoses. Similar manifestations may occur in several other canine diseases, including ehrlichiosis, dermatophytosis, canine scabies, anaplasmosis, and babesiosis (Evaristo et al., 2024), highlighting the importance of laboratory confirmation for accurate diagnosis.

Spatial analysis revealed an uneven distribution of samples, with a predominance of animals from the northern region of the municipality. This pattern likely reflects the location of the ZCC in this area, which may have facilitated access for nearby residents and influenced the demand-based sampling profile. Therefore, spatial patterns observed in this study should not be interpreted as prevalence estimates for each region, but rather as indicators of areas where cases were more frequently detected among animals submitted for evaluation.

Despite this sampling gradient, CVL cases were identified in all regions of the municipality. Compared with the spatial pattern in 2014, previously reported by Thomaz Soccol et al. (2017), the distribution observed in 2022 suggests a possible shift in the areas with greater

concentration of CVL-seropositive dogs in Foz do Iguaçu. In the 2014 survey, the highest prevalence was reported in the western, southern, and eastern regions, whereas the northern and northeastern areas showed lower prevalence and were interpreted as more recently affected areas, despite the presence of seropositive dogs in sampled patches. In contrast, in the present study, most *L. infantum*-seropositive dogs were recorded in the eastern (36%) and northern (33%) regions. Kernel density analysis also indicated a higher concentration of cases in the northern and northeastern portions of the municipality. This apparent increase in cases may reflect the progressive expansion of CVL into areas previously described as undergoing urban growth, particularly due to the construction of residential condominiums as well as the presence of rural and periurban landscapes that may favor the maintenance of vectors and reservoir hosts (Thomaz Soccol et al., 2017),

A similar spatial trend was observed for *Paracoccidioides* spp., with cases distributed across several regions but with greater clustering in the northern, northeastern, and eastern areas. Data indicating that animals had not left their residential areas in the previous 12 months supports the hypothesis of local exposure. Environmental factors such as soil humidity, vegetation cover, and land use may contribute to fungal persistence and influence the spatial distribution of infections (Rodrigues-Vendramini et al., 2019). In this context, the northern and northeastern regions of Foz do Iguaçu are particularly relevant because they include rural and periurban landscapes, areas undergoing urban expansion, vegetation fragments, unpaved soils, and sites with domestic animal presence, all of which may create favorable microenvironments for the maintenance of *Paracoccidioides* spp. (Ono et al., 2001; Fontana et al., 2010).

Overall, the results suggest that the circulation of *L. infantum* and *Paracoccidioides* spp. in Foz do Iguaçu is shaped by a combination of environmental suitability, host exposure, and local ecological conditions. The integration of serological and spatial analyses provides important insights into the eco-epidemiology of these pathogens and supports the development

of targeted surveillance strategies within a One Health perspective.

5. Conclusion

This study provides novel insights into the eco-epidemiology of *L. infantum* and *Paracoccidioides* spp. infections in dogs from Foz do Iguaçu, a municipality with documented human cases of PCM and environmental conditions favorable to pathogenic fungi. The high seroprevalence of CVL confirms the endemicity and sustained transmission of *L. infantum* in the region, including both symptomatic and asymptomatic dogs, reinforcing the role of subclinical infections in maintaining the transmission cycle. The exclusive occurrence of seropositivity for *Paracoccidioides* spp. among clinically symptomatic and *Leishmania*-positive dogs suggests a possible epidemiological association between these pathogens, warranting further investigation. Spatial analyses revealed heterogeneous distributions and localized clustering of infections, emphasizing the importance of integrating serological data with spatial analytical tools to identify potential transmission hotspots. Overall, these findings underscore the need for integrated One Health surveillance approaches involving human, animal, and environmental components, as well as expanded regional studies using complementary diagnostic methods, to improve understanding of transmission dynamics and support more effective control and surveillance strategies in endemic areas.

6. References

- Agresti A, Kateri M. Categorical data analysis. In: Lovric M, editor. *International encyclopedia of statistical science*. Berlin: Springer; 2025. p. 408-11.
- Araújo López PV, Aguilar Fernández G, Zancopé-Oliveira R. Pasado y presente de la paracoccidioidomicosis en Paraguay. *Rev Nac (Itaiguá)*. 2024;16(3):167-96. doi:10.18004/rdn2024.dic.03.167.196.
- Beasley EA, Pessôa-Pereira D, Scorza BM, Petersen CA. Epidemiologic, clinical and immunological consequences of co-infections during canine leishmaniosis. *Animals (Basel)*. 2021;11(11):3206. doi:10.3390/ani11113206.

Camargo ZP, Unterkircher C, Campoy SP, Travassos LR. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. J Clin Microbiol. 1988;26(10):2147-51. doi:10.1128/JCM.26.10.2147-2151.1988.

Centro de Controle de Zoonoses de Foz do Iguaçu (CCZ-FOZ). Ações e serviços do CCZ [Internet]. Foz do Iguaçu; 2018 [cited 2020 Nov 15]. Available from: pmficomunicacao.wixsite.com/cczfoz

Centro de Controle de Zoonoses de Foz do Iguaçu (CCZ-FOZ). Centro de Controle de Zoonoses inicia censo populacional de cães de rua [Internet]. Foz do Iguaçu; 2018 [cited 2020 Nov 10]. Available from: foz.portaldacidade.com/noticias/cidade/centro-de-controle-de-zoonoses-inicia-censo-populacional-de-caes-de-rua

Chiyo L, Thomaz-Soccol V, Pasquali AKS, Pozzolo EM, Baggio RA, Freire RL, et al. Cross-sectional spatial and epidemiological analysis of canine visceral leishmaniasis cases in the triple border region, Brazil, Argentina and Paraguay, between 2015 and 2020. Acta Trop. 2023;239:106811. doi:10.1016/j.actatropica.2022.106811.

Coutinho ZF, Wanke B, Travassos C, Oliveira RM, Xavier DR, Coimbra CE Jr. Hospital morbidity due to paracoccidioidomycosis in Brazil (1998-2006). Trop Med Int Health. 2015;20(5):673-80. doi:10.1111/tmi.12472.

de Souza Suguiura IM, Ono MA. Compulsory notification of paracoccidioidomycosis: a 14-year retrospective study of the disease in the state of Paraná, Brazil. Mycoses. 2022;65(3):354-61. doi:10.1111/myc.13417.

de Souza Suguiura IM, Navolar FMN, Souza BA, Simioni MLS, Carvalho Ishiuchi GG, Macagnan R, et al. An atypical case of chronic paracoccidioidomycosis in a dog caused by a fungus from the *Paracoccidioides brasiliensis* complex. Vet Res Commun. 2024;48(4):2583-8. doi:10.1007/s11259-024-10413-0.

Dias RCF, Thomaz-Soccol V, Bisetto A Jr, Pozzolo EM, Chiyo L, Freire RL, et al. Occurrence of anti-*Leishmania* spp. antibodies in domiciled dogs from the city of Foz do Iguaçu, state of Paraná, Brazil. In: Fifth World Congress on Leishmaniasis; 2013; Porto de Galinhas, Brazil. Porto de Galinhas: Rev Soc Bras Med Trop; 2013. p. 875-6.

Evaristo AMC, Santos PTT, Sé FS, Collere FCM, Silva BB, Cardoso ER, et al. Co-infection by tick-borne pathogens and *Leishmania* spp. in dogs with clinical signs suggestive of leishmaniasis from an endemic area in northeastern Brazil. Pesq Vet Bras. 2024;44:e07437.

Ferguson AJ, Thompson GR, Bruyette D, Sykes JE. The dog as a sentinel and animal model for coccidioidomycosis. Med Mycol. 2024;62(1):myad139. doi:10.1093/mmy/myad139.

Foz do Iguaçu. Prefeitura Municipal. Lei Complementar nº 296, de 12 de novembro de 2018 [Internet]. Foz do Iguaçu; 2018 [cited 2020]. Available from: sapl.fozdoiguacu.pr.leg.br/ta/1432/text

Hahn RC, et al. "Paracoccidioidomycosis: current status and future trends." Clinical microbiology reviews 35.4; 2022: e00233-21.

Headley SA, Pretto-Giordano LG, Di Santis GW, Gomes LA, Macagnan R, Nóbrega DF, et al. *Paracoccidioides brasiliensis*-associated dermatitis and lymphadenitis in a dog. *Mycopathologia*. 2017;182(3-4):425-34. doi:10.1007/s11046-016-0075-7.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Cidades: Foz do Iguaçu [Internet]. Rio de Janeiro: IBGE [cited 2020]. Available from: cidades.ibge.gov.br/brasil/pr/foz-do-iguacu/panorama

Martinez R. New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology. *J Fungi (Basel)*. 2017;3(1):1. doi:10.3390/jof3010001.

Mendes RP, Cavalcante RS, Marques SA, Marques MEA, Venturini J, Sylvestre TF, et al. Paracoccidioidomycosis: current perspectives from Brazil. *Open Microbiol J*. 2017;11:224-82. doi:10.2174/1874285801711010224.

Millington MA, Nishioka SDA, Martins ST, Santos ZMG, Lima Júnior FEF, Alves RV. Paracoccidioidomicose: abordagem histórica e perspectivas de implantação da vigilância e controle. *Epidemiol Serv Saude*. 2018;27:e0500002.

Moreira WDC, Leandro GCW, Ferreira H, Silva RMM, Pureza DYD, Hermes-Uliana C, et al. Visceral leishmaniasis risk clusters on Brazil's borders: 2013 to 2022. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2026;59:e0020-2025. doi:10.1590/0037-8682-0020-2025.

Mós EDN, Netto CF. Contribuição ao estudo da paracoccidioidomicose. I. Possível papel epidemiológico dos cães: estudo sorológico e anátomo-patológico. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1974;16(3):154-9.

Mós EN, Netto CF, Saliba AM, Brito T. Contribuição ao estudo da paracoccidioidomicose. II. Infecção experimental do cão. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1974;16(4):232-7.

Ono MA, Bracarense APFRL, Moraes HSA, Trapp SM, Belitardo DR, Camargo ZP. Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. *Med Mycol*. 2001;39(3):277-82. doi:10.1080/mmy.39.3.277.282.

Ono MA, Kishima MO, Itano EN, Bracarense APFRL, Camargo ZP. Experimental paracoccidioidomycosis in dogs. *Med Mycol*. 2003;41(3):265-8. doi:10.1080/13693780310001597395.

Ordeix L, Montserrat-Sangrà S, Martínez-Orellana P, Baxarias M, Solano-Gallego L. Toll-like receptors 2, 4 and 7, interferon-gamma and interleukin 10, and programmed death ligand 1 transcripts in skin from dogs of different clinical stages of leishmaniosis. *Parasit Vectors*. 2019;12(1):575.

Pan American Health Organization (PAHO). Leishmaniasis [Internet]. Washington (DC): PAHO; 2025 [cited 2025]. Available from: paho.org/en/topics/leishmaniasis

Pan American Health Organization (PAHO). Leishmaniasis: epidemiological report in the Americas, December 2020 [Internet]. Washington (DC): PAHO; 2020 [cited 2020]. Available from: iris.paho.org/handle/10665.2/53090

Paraná. Secretaria da Saúde do Estado do Paraná. Protocolo para diagnóstico e tratamento da paracoccidioidomicose. Curitiba: Secretaria da Saúde; 2002.

Pasquali AKS, Baggio RA, Boeger WA, González-Britez N, Guedes DC, Chaves EC, et al. Dispersion of *Leishmania (Leishmania) infantum* in central-southern Brazil: evidence from an integrative approach. PLoS Negl Trop Dis. 2019;13(8):e0007639. doi:10.1371/journal.pntd.0007639.

Peçanha PM, Peçanha-Pietrobon PM, Grão-Velloso TR, Rosa Júnior M, Falqueto A, Gonçalves SS. Paracoccidioidomycosis: what we know and what is new in epidemiology, diagnosis, and treatment. J Fungi (Basel). 2022;8(10):1098. doi:10.3390/jof8101098.

Pereira M, Vianna GO. A propósito de um caso de blastomicose (Pyohemia blastomycotica). Arq Bras Med. 1911;1:63-83.

Petroni TF, Bonfietti LX, Zaninelli TH, Itano EN, Ono MA. Serological evidence of infection by *Paracoccidioides brasiliensis* in dogs with leishmaniasis. Mycopathologia. 2017;182(9-10):947-52. doi:10.1007/s11046-017-0148-2.

Prefeitura Municipal de Foz do Iguaçu. Cidade [Internet]. Foz do Iguaçu; 2020 [cited 2020 Nov 6]. Available from: www5.pmfi.pr.gov.br/cidade#historia

Ricci G, Mota FT, Wakamatsu A, Serafim RC, Borra RC, Franco M. Canine paracoccidioidomycosis. Med Mycol. 2004;42(4):379-83. doi:10.1080/1369378032000141417.

Rodrigues de Farias M, Condas LAZ, Ribeiro MG, Bosco SMG, Muro MD, Werner J, et al. Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly. Mycopathologia. 2011;172(2):147-52. doi:10.1007/s11046-011-9412-z.

Rodrigues-Vendramini FAV, Marschall C, Toplak M, Macheroux P, Bonfim-Mendonça PDS, Svidzinski TIE, et al. Promising new antifungal treatment targeting chorismate synthase from *Paracoccidioides brasiliensis*. Antimicrob Agents Chemother. 2019;63(1):e01097-18. doi:10.1128/AAC.01097-18.

Santos DR, Ferreira AC, Bisetto A Jr. The first record of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Paraná, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2012;45(5):643-5.

Santos HD, Galvão SR, Dias FEF, Ribeiro TMP, Negreiros Filho O, Sousa SAP, et al. High frequency of visceral leishmaniasis in dogs under veterinary clinical care in an intense transmission area in the state of Tocantins, Brazil. Cienc Rural. 2017;47(3):e20160260.

Silveira LH, Domingos IH, Kouchi K, Itano EN, Silva EA, Landgraf VO, et al. Serological detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in dogs with leishmaniasis. Mycopathologia. 2006;162(5):325-9. doi:10.1007/s11046-006-0046-5.

Singh OP, Hasker E, Sacks D, Boelaert M, Sundar S. Asymptomatic *Leishmania* infection: a new challenge for *Leishmania* control. Clin Infect Dis. 2014;58(10):1424-9.

Teixeira MM, Theodoro RC, Nino-Vega G, Bagagli E, Felipe MSS. *Paracoccidioides* species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. PLoS Pathog. 2014;10(10):e1004397. doi:10.1371/journal.ppat.1004397.

Teles AJ, Klafke GB, Cabana ÂL, Albano APN, Xavier MO, Meireles MCA. Serological investigation into *Paracoccidioides brasiliensis* infection in dogs from Southern Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathologia*. 2016;181(5-6):323-8. doi:10.1007/s11046-015-9972-4.

Thomaz-Soccol V, Pasquali AKS, Pozzolo EM, Leandro ADS, Chiyo L, Baggio RA, et al. More than the eyes can see: the worrying scenario of canine leishmaniasis in the Brazilian side of the triple border. PLoS One. 2017;12(12):e0189182. doi:10.1371/journal.pone.0189182.

Tracogna MF, Lugo SF, Vázquez MLG, Fernández MS, Andriani ME, Presti SE, et al. Características clínicas y epidemiológicas de pacientes con paracoccidioidomicosis diagnosticados en un hospital de Resistencia, Chaco. *Rev Argent Microbiol*. 2019;51(2):144-7.

Trench FJP, Ritt AG, Gewehr TA, Leandro ADS, Chiyo L, Ritt-Gewehr M, et al. First report of autochthonous visceral leishmaniasis in humans in Foz do Iguaçu, Paraná State, Southern Brazil. *Ann Clin Cytol Pathol*. 2016;2(6):1041.

Venturini J, Fernandez NB, Macedo PM, Cavalcante RS, Caceres DH, Borges CL, et al. Paracoccidioidomycosis in the 21st century: challenges and milestones. PLoS Negl Trop Dis. 2026;20(1):e0013819. doi:10.1371/journal.pntd.0013819.

World Health Organization (WHO). Leishmaniasis [Internet]. Geneva: WHO; 2023 [cited 2023]. Available from: [who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis)

Yasmin H, Adhikary A, Al-Ahdal MN, Roy S, et al. Host–pathogen interaction in leishmaniasis: immune response and vaccination strategies. *Immuno* 2022, 2(1), 218-254.

6 CONCLUSÃO

A presente tese permitiu ampliar a compreensão da infecção por *Paracoccidioides* spp. em cães, ao integrar evidências da literatura científica e dados originais obtidos em área de relevância epidemiológica. De modo geral, os resultados confirmam que os cães estão frequentemente expostos a *Paracoccidioides* spp. em regiões endêmicas, o que evidencia a importância epidemiológica dessa infecção na espécie.

No âmbito do primeiro artigo, a revisão sistemática demonstrou que os cães são biologicamente suscetíveis à infecção por *Paracoccidioides* spp., conforme indicado por estudos experimentais, imunológicos, soropidemiológicos e relatos de casos naturais. Entretanto, a predominância de estudos sorológicos em relação à comprovação de doença ativa sugere que, na maioria das situações, os animais expostos desenvolvem respostas capazes de limitar a persistência do fungo. Esses achados sustentam o papel dos cães como sentinelas epidemiológicos, uma vez que a soropositividade observada reflete de maneira sensível a circulação ambiental do agente e sua distribuição geográfica.

No segundo artigo, o estudo conduzido em Foz do Iguaçu, Paraná, confirmou a endemicidade da leishmaniose visceral canina na região e demonstrou que a soropositividade para *Paracoccidioides* spp. ocorreu exclusivamente entre cães clinicamente sintomáticos e positivos para *Leishmania infantum*, sugerindo uma possível associação epidemiológica entre esses patógenos. Embora os resultados não permitam definir de forma conclusiva se essa associação decorre de coinfeção, reatividade cruzada ou compartilhamento de fatores ambientais de risco, os achados reforçam a hipótese de interação entre essas infecções em áreas de cocirculação.

Adicionalmente, a análise espacial demonstrou distribuição heterogênea dos cães soropositivos e a existência de agrupamentos localizados, evidenciando que a integração entre dados sorológicos e ferramentas espaciais pode auxiliar na identificação de áreas prioritárias para vigilância epidemiológica. Esse resultado responde diretamente ao objetivo de descrever a distribuição espacial dos animais soropositivos nas regiões urbanas de Foz do Iguaçu.

Em conjunto, os resultados obtidos permitem concluir que os cães constituem indicadores epidemiológicos relevantes da exposição ambiental a *Paracoccidioides* spp. e que sua avaliação pode fornecer subsídios importantes para a compreensão da ecoepidemiologia da PCM sob a perspectiva de Saúde Única. Além disso, a associação observada entre *Paracoccidioides* spp. e *Leishmania infantum* em cães de área endêmica reforça a necessidade de abordagens integradas de vigilância e de estudos adicionais que aprofundem a compreensão dessa interface epidemiológica.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, Sandro Rogério de. Infecções fúngicas. In: **Imunoensaios: fundamentos e aplicações**. [S. l.: s. n.], 2018.
- ARISTIZABAL, B. H. et al. Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses. **Medical Mycology**, Oxford, v. 40, n. 2, p. 169-178, 2002.
- BAGAGLI, Eduardo et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 58, n. 4, p. 505-512, 1998.
- BAGAGLI, Eduardo et al. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 165, n. 4-5, p. 197-207, 2008.
- BELITARDO, Donizeti Rodrigues et al. Detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in free-range domestic pigs (*Sus scrofa*). **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 177, n. 1-2, p. 91-95, 2014a.
- BELITARDO, Donizeti Rodrigues et al. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Mycoses**, v. 57, n. 4, p. 222-227, 2014b.
- BIALEK, R. et al. Small subunit ribosomal DNA sequence shows *Paracoccidioides brasiliensis* closely related to *Blastomyces dermatitidis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 38, n. 9, p. 3190-3193, 2000.
- BOWSER, Natasha H.; ANDERSON, Neil E. Dogs (*Canis familiaris*) as sentinels for human infectious disease and application to Canadian populations: a systematic review. **Veterinary Sciences**, Basel, v. 5, n. 4, p. 83, 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Lista nacional de notificação compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública**. Brasília, DF, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/svs/notificacao-compulsoria/lista-nacional-de-notificacao-compulsoria-de-doencas-agravos-e-eventos-de-saude-publica>. Acesso em: 27 jun. 2022a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Situação epidemiológica de micoses endêmicas**. Brasília, DF, [2022]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/publico-geral/micoses-endemicas/situacao-epidemiologica>. Acesso em: 27 jun. 2022b.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. **Painel Leishmaniose Visceral Brasil**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, [s.d.]. Disponível em: <https://leishmanioses.aids.gov.br/>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, London, v. 392, n. 10151, p. 951-970, 2018.

CAMARGO, Z. P. et al. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 26, n. 10, p. 2147-2151, 1988.

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

CARRILLO, Eugenia; MORENO, Javier. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 128, n. 1-3, p. 67-70, 2009.

CARRILLO, Eugenia; MORENO, Javier; CRUZ, Israel. What is responsible for a large and unusual outbreak of leishmaniasis in Madrid?. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 12, p. 579-580, 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Clinical overview of leishmaniasis**. Atlanta: CDC, 2025. Disponível em: <https://www.cdc.gov/leishmaniasis/hcp/clinical-overview/>. Acesso em: 13 jul. 2025.

CHAVES, Alison Felipe Alencar et al. Updates in *Paracoccidioides* biology and genetic advances in fungus manipulation. **Journal of Fungi**, Basel, v. 7, n. 2, p. 116, 2021.

CHEN, Xing et al. Domestic dogs as sentinels of children lead exposure: multi-pathway identification and source apportionment based on isotope technique. **Chemosphere**, Oxford, v. 316, p. 137787, 2023.

COCIO, Tiago A. et al. Phylogenetic species of *Paracoccidioides* spp. isolated from clinical and environmental samples in a hyperendemic area of paracoccidioidomycosis in Southeastern Brazil. **Journal of Fungi**, Basel, v. 6, n. 3, p. 132, 2020a.

COCIO, Tiago Alexandre 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**, Ribeirão Preto, v. 43, n. 4, e20190301, 2020b.

CORTE, Andreia Corrêa et al. Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Paraná State, Brazil. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 164, n. 5, p. 225-228, 2007.

COUTINHO, Ziadir Francisco et al. Hospital morbidity due to paracoccidioidomycosis in Brazil (1998-2006). **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 20, n. 5, p. 673-680, 2015.

COUTINHO, Ziadir Francisco et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 5, p. 1441-1454, 2002.

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

DE CAMARGO, Z. P. et al. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for

immunodiffusion tests. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 26, n. 10, p. 2147-2151, 1988.

DE MACEDO, Priscila Marques et al. Clinical features and genetic background of the sympatric species *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides americana*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 13, n. 4, e0007309, 2019.

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

DE SOUZA SUGUIURA, Igor Massahiro et al. First report of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in fish. **Medical Mycology**, v. 58, n. 6, p. 737-743, 2020.

DE SOUZA SUGUIURA, Igor Massahiro; ONO, Mario Augusto. Compulsory notification of paracoccidioidomycosis: a 14-year retrospective study of the disease in the state of Paraná, Brazil. **Mycoses**, Berlin, v. 65, n. 3, p. 354-361, 2022.

DIAS, R. C. F. et al. Occurrence of anti-*Leishmania* spp. antibodies in domiciled dogs from the city of Foz do Iguaçu, state of Paraná, Brazil. In: **WORLD CONGRESS ON LEISHMANIOSIS**, 5., 2013, Porto de Galinhas. *Proceedings...* Porto de Galinhas: Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 2013. p. 875-876.

DÍAZ-SÁEZ, V. et al. High rates of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma nabiasi* infection in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in sympatric and syntrophic conditions in an endemic canine leishmaniasis area: Epidemiological consequences. **Veterinary parasitology**, v. 202, n. 3-4, p. 119-127, 2014.

DI-BLASI, Tatiana et al. *Lutzomyia longipalpis* TGF- β Has a Role in *Leishmania infantum chagasi* Survival in the Vector. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 71, 2019.

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

FERGUSON, Adam J. et al. The dog as a sentinel and animal model for coccidioidomycosis. **Medical Mycology**, Oxford, v. 62, n. 1, p. myad139, 2024.

FERREIRA, Jacqueline B. et al. Evaluation of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in dairy goats. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 176, n. 1-2, p. 95-99, 2013.

FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, London, v. 25, n. 1, p. 5-18, 1987.

GROSE, Elizabeth; TAMSITT, J. R. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, SA. **Sabouraudia**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 124-125, 1965.

HAHN, Rosane Christine et al. Paracoccidioidomycosis: current status and future

trends. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 35, n. 4, e00233-21, 2022.

HAHN, Rosane Christine et al. Randomly amplified polymorphic DNA as a valuable tool for epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 41, n. 7, p. 2849-2854, 2003.

HEGEDUS, Cristina et al. Pets, genuine tools of environmental pollutant detection. **Animals**, Basel, v. 13, n. 18, p. 2923, 2023.

HERR, Roger A. et al. Phylogenetic analysis of *Lacazia loboi* places this previously uncharacterized pathogen within the dimorphic Onygenales. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 39, n. 1, p. 309-314, 2001.

KILLICK-KENDRICK, R. et al. Possible origins of *Leishmania chagasi*. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 74, n. 5, p. 563-565, 1980.

KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. **Veterinary Pathology**, Washington, DC, v. 51, n. 2, p. 527-538, 2014.

LACAZ, Carlos da Silva. Passado, presente e futuro da paracoccidioidomicose. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 12, n. 1, p. 37-52, 1983.

LAINSON, Ralph; RANGEL, Elizabeth F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.

LEITE, Ingrid Gonçalves Costa et al. Comparison between PCR-RFLP and sequencing techniques in the analysis of *Paracoccidioides* spp. biodiversity: limitations and insights into species and variant differentiation. **Mycopathologia**, v. 189, n. 6, p. 97, 2024.

LOTH, Eduardo Alexandre et al. Occurrence of 102 cases of paracoccidioidomycosis in 18 months in the Itaipu Lake region, Western Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 636-637, 2011.

LUTZ, Adolpho. Uma micose pseudococcídica localizada na boca e observada no Brasil: contribuição ao conhecimento das hifoblastomicoses americanas. **Brasil-Médico**, Rio de Janeiro, v. 22, p. 121-124, 1908.

MARQUES-DA-SILVA, Silvia Helena et al. Case report: occurrence of *Paracoccidioides lutzii* in the Amazon region: description of two cases. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Deerfield, v. 87, n. 4, p. 710-714, 2012.

MARTÍN-SÁNCHEZ, J. et al. Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. **Veterinary parasitology**, v. 145, n. 3-4, p. 267-273, 2007.

MARTINEZ, Roberto. New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology. **Journal**

of Fungi, Basel, v. 3, n. 1, p. 1, 2017.

MATUTE, Daniel R. et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 23, n. 1, p. 65-73, 2006.

MENDES, Rinaldo Poncio et al. Paracoccidioidomycosis: current perspectives from Brazil. **The Open Microbiology Journal**, [s. l.], v. 11, p. 224-282, 2017.

MENDES-GIANNINI, Maria José Soares; MORAES, Rosangela Aparecida; RICCI, Terezinha Aparecida. Proteolytic activity of the 43,000 molecular weight antigen secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 384-385, 1990.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância em saúde no Brasil 2003|2019: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais. Boletim Epidemiológico**, Brasília, DF, [2019]. Disponível em: <http://www.rets.epsjv.fiocruz.br/biblioteca/vigilancia-em-saude-no-brasil-20032019-da-criacao-da-secretaria-de-vigilancia-em-saude>. Acesso em: 27 jun. 2022.

MOLINARI-MADLUM, E. E. W. I.; FELIPE, M. S. S.; SOARES, C. M. A. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis. **Medical Mycology**, Oxford, v. 37, n. 4, p. 269-276, 1999.

MORALES-YUSTE, Manuel; MARTÍN-SÁNCHEZ, Joaquina; CORPAS-LOPEZ, Victoriano. Canine leishmaniasis: update on epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 8, p. 387, 2022.

MOREIRA, William da Costa et al. Visceral leishmaniasis risk clusters on Brazil's borders: 2013 to 2022. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 59, e0020-2025, 2026.

MÓS, Eduardo do Nascimento; NETTO, Celeste Fava. Contribuição ao estudo da paracoccidioidomicose. I - Possível papel epidemiológico dos cães: estudo sorológico e anátomo-patológico. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 16, n. 3, p. 154-159, 1974.

MÓS, Eduardo do Nascimento; NETTO, Celeste Fava; SALIBA, A. M.; BRITO, T. Contribuição ao estudo da paracoccidioidomicose. II - Infecção experimental do cão. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 16, n. 4, p. 232-237, 1974.

NEGRONI, P. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente en el suelo argentino. **Prensa Médica Argentina**, Buenos Aires, v. 53, p. 2831-2832, 1966.

NIÑO-VEGA, G. A. et al. RFLP analysis reveals marked geographical isolation between strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, n. 6, p. 437-441, 2000.

OLIVEIRA, Gabriela G. et al. Serological evidence of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in chickens from Paraná and Mato Grosso do Sul States, Brazil. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 171, n. 3, p. 197-202, 2011.

OLIVEIRA, Gabriela G. et al. Serological survey of paracoccidioidomycosis in sheep. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 173, n. 1, p. 63-68, 2012.

OLIVEIRA, Gabriela Gonçalves de et al. Serological survey of paracoccidioidomycosis in cats. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 176, n. 3-4, p. 299-302, 2013.

ONO, M. A. et al. Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. **Medical Mycology**, Oxford, v. 39, n. 3, p. 277-282, 2001.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Leishmaniasis: epidemiological report in the Americas, December 2020**. Washington, DC, 2020. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53090>. Acesso em: 2020.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Visceral Leishmaniasis**. December 2025. Available from: <https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis/visceral-leishmaniasis>

PASQUALI, A. K. S. et al. Dispersion of *Leishmania (Leishmania) infantum* in central-southern Brazil: evidence from an integrative approach. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 13, n. 8, e0007639, 2019.

PETRONI, Tatiane Ferreira et al. Serological evidence of infection by *Paracoccidioides brasiliensis* in dogs with leishmaniasis. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 182, n. 9-10, p. 947-952, 2017.

PINHEIRO, Breno Gonçalves et al. Molecular tools for detection and identification of *Paracoccidioides* species: current status and future perspectives. **Journal of fungi**, v. 6, n. 4, p. 293, 2020.

PUCCIA, Rosana et al. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 53, n. 1, p. 199-206, 1986.

QUINNELL, Rupert J.; COURTENAY, Orin. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 136, n. 14, p. 1915-1934, 2009.

REIMÃO, Juliana Quero et al. Laboratory diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis: current and future methods. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1632, 2020.

RESTREPO, Angela. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 323-334, 1985.

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

RICHINI-PEREIRA, Virgínia Bodelão et al. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. **Medical Mycology**, Oxford, v. 46, n. 1, p. 35-40, 2008.

RODRIGUES-VENDRAMINI, Franciele Abigail Vilugron et al. Promising new antifungal treatment targeting chorismate synthase from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC, v. 63, n. 1, e01097-18, 2019.

SANO, Ayako et al. Detection of gp43 and ITS1-5.8S-ITS2 ribosomal RNA genes of *Paracoccidioides brasiliensis* in paraffin-embedded tissue. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, Tokyo, v. 42, n. 1, p. 23-27, 2001.

SAN-BLAS, Gioconda; NIÑO-VEGA, Gustavo; ITURRIAGA, Teresa. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Medical Mycology**, Oxford, v. 40, n. 3, p. 225-242, 2002.

SANTOS, Demilson Rodrigues dos; FERREIRA, A. C.; BISETTO JÚNIOR, A. The first record of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Paraná, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 45, n. 5, p. 643-645, 2012.

SBEGHEN, Mônica Raquel et al. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in small wild mammals. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 180, n. 5-6, p. 435-440, 2015.

SCARPINI, Sara et al. Visceral leishmaniasis: epidemiology, diagnosis, and treatment regimens in different geographical areas with a focus on pediatrics. **Microorganisms**, v. 10, n. 10, p. 1887, 2022.

SCHECHTMAN, Regina Casz; AZULAY, David Rubem. **Micologia médica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2022.

SHANKAR, Jata et al. Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 24, n. 2, p. 296-313, 2011.

SHIKANAI-YASUDA, Maria Aparecida et al. II consenso brasileiro em paracoccidioidomicose - 2017. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, DF, v. 27, n. esp., e0500001, 2018.

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, Brazil. **Medical Mycology**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 37-42, 1998.

SILVEIRA, L. H. et al. Occurrence of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in dairy cattle from Mato Grosso do Sul, Brazil. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 165, n. 6, p. 367-371, 2008.

SILVEIRA, L. H. et al. Serological detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in dogs with leishmaniasis. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 162, n. 5, p. 325-329, 2006.

SINGH, Om Prakash et al. Asymptomatic *Leishmania* infection: a new challenge for *Leishmania* control. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 58, n. 10, p. 1424-1429, 2014.

SOUZA, M. C. et al. Differences in reactivity of paracoccidioidomycosis sera with gp43 isoforms. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, London, v. 35, n. 1, p. 13-18, 1997.

SPLENDORE, A. Zymonematosi con localizzazione nella cavità della bocca, osservata in Brasile. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, Paris, v. 5, p. 313-319, 1912.

STOVER, E. P. et al. Estradiol-binding proteins from mycelial and yeast-form cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 51, n. 1, p. 199-203, 1986.

TATAGIBA, Luiza Sarmento et al. A case of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii* presenting sarcoid-like form. **Medical Mycology Case Reports**, Amsterdam, v. 19, p. 6-8, 2018.

TEIXEIRA, Marcus de Melo et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. **Medical Mycology**, Oxford, v. 52, n. 1, p. 19-28, 2014a.

TEIXEIRA, Marcus M. et al. *Paracoccidioides* species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 10, n. 10, e1004397, 2014b.

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

THEODORO, Raquel Cordeiro et al. Genus *Paracoccidioides*: species recognition and biogeographic aspects. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 5, e37694, 2012.

TRENCH, F. J. P. et al. First report of autochthonous visceral leishmaniasis in humans in Foz do Iguaçu, Paraná State, Southern Brazil. **Annals of Clinical Cytology and Pathology**, [s. l.], v. 2, n. 6, p. 1041, 2016.

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

UNTEREINER, Wendy A. et al. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. **Mycologia**, New York, v. 96, n. 4, p. 812-821, 2004.

VAZ, Adelaide J.; MACHADO, Isabel Daufenback; BUENO, Ednéia Casagrande. Imunoprecipitação. In: **Imunoensaios: fundamentos e aplicações**. [S. l.: s. n.], 2018.

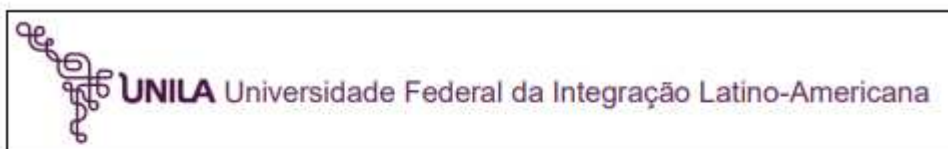
WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action**. Geneva: WHO, 2022.

APÊNDICE A - Ficha de Coleta de Dados

Dados do Proprietário												
Nome:					RG ou CPF:							
Endereço:					N°:							
Bairro:					Município:			UF:				
Ponto de Referência:												
Telefone:					E-mail:							
Dados do cão												
Nome:												
Sexo:		☐	Macho	☐	Fêmea	Idade:						
Raça:		☐	SDR	☐	Outra:							
Cor:		Peso:			Pelagem:		☐	Curta	☐	Média	☐	Longa
Cidade onde nasceu:												
☐		Animal recolhido da rua. Qual bairro?				Há quanto tempo?						
Cão se deslocou para outra cidade nos últimos 12 meses?						☐	Não	☐	Sim	Qual?		
Animal foi vacinado contra Leishmaniose?						☐	Não	☐	Sim			
Sinais Clínicos												
☐	Linfadenomegalia			☐	Descamação Furfurácea			☐	Atrofia de Massa			
☐	Onicogrifose			☐	Lesões Ulceradas							
☐	Alopecia			☐	Perda de Peso							
☐	Outros:											

ANEXO A

Parecer Comissão de Ética no Uso de Animais - UNILA



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – UNILA

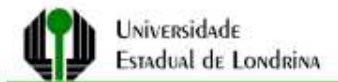
O projeto intitulado "Detecção de *Paracoccidioides spp* em animais de Foz do Iguaçu – PR", processo de número 004/2021, sob responsabilidade do professor doutor Kelvinson Fernandes Viana, está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais (Lei Nº 11.794).

Foz do Iguaçu, 23 de abril de 2021

Prof. Dr. Flávio Luiz Tavares
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais - UNILA

ANEXO B

Termo de Consentimento Livre Esclarecido



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: Detecção de *Paracoccidioides* spp. em animais de Foz do Iguaçu, PR

Nome da Pesquisadora Responsável: Açucena Veleh Rivas - CRBio 108352/07-D

Comitê de Ética: CEUA/UNILA

Objetivos do estudo: Realizar teste para detecção de anticorpos contra fungos do gênero *Paracoccidioides*, em amostras de sangue de cães e gatos; e dos fungos em amostras de punção de linfonodo (de animais com linfonodomegalia) e em amostras de órgãos (de animais eutanasiados). Para isso, parte do sangue coletado do animal durante a consulta para realização de outros exames, será destinada a esse estudo. Em caso de eutanásia do animal (indicada por outros motivos), serão coletados fragmentos de pulmão, baço e fígado para esse estudo. Caso o resultado do exame sorológico seja positivo: será coletada amostra de punção de linfonodo para análise da presença dos fungos; será fornecido um laudo para que o tutor possa buscar tratamento específico para o animal e entraremos em contato para investigar o possível local de contaminação do animal.

Potenciais riscos para os animais: A coleta de amostras para o estudo não oferece risco aos animais.

Benefícios: Identificar de forma gratuita se o animal teve contato com os fungos, que pode ser prejudicial à saúde e que, em caso positivo, receberá laudo para que possa ser realizado o tratamento correto (**o tratamento é responsabilidade do tutor**). Identificar em quais regiões da cidade pode haver a presença dos fungos em questão.

ESCLARECIMENTOS AO PROPRIETÁRIO SOBRE A PARTICIPAÇÃO DO ANIMAL NESTE ESTUDO

Sua autorização para a inclusão do seu animal neste estudo é **voluntária**. Seu animal poderá ser retirado do estudo, a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo a você e/ou a ele. A confidencialidade dos seus dados pessoais será preservada. Os membros da CEUA ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações, e nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares.

O Médico Veterinário responsável pelo seu animal será o André de Souza Leandro, inscrito no CRMV sob o número 04179. Além dele, a equipe da pesquisadora responsável Açucena Veleh Rivas também se responsabilizará pelo bem-estar do seu animal durante todo o período do estudo. Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com a pesquisadora principal pelo contato:

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, tutor(a)/responsável legal pelo animal _____, declaro que fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo/projeto, seus riscos e benefícios ao animal pelo qual sou responsável. Fui também informado(a) que posso retirar meu animal do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do meu animal identificado, a seguir, neste estudo.

Nome do tutor/responsável legal pelo animal: _____

CPF ou RG: _____

Telefone: () _____ E-mail: _____

Identificação do animal

Nome:		Nº de identificação:
Espécie: () Cão () Gato	Raça:	Sexo: () Fêmea () Macho

Este documento será assinado em **duas vias**, sendo que uma via ficará comigo e outra com a Pesquisadora responsável.

Foz do Iguaçu/PR, ____/____/____

Pesquisadora Responsável
Açucena Veleh Rivas
CRBio 108352/07-D

Assinatura do(a) tutor(a)