

**INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ**

---

**ATILIO SERSUN CALEFI  
THAIS BASTOS ZANATA  
KAUÊ CACHUBA DE ABREU  
WILLIAN LUIZ DA CUNHA  
ANDRESSA MARIA RORATO  
MARIO AUGUSTO ONO**

**AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO DE MAMÍFEROS DE PEQUENO PORTE  
NÃO-VOADORES SILVESTRES (ORDEM DIDELPHIMORPHIA E  
RODENTIA) POR PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS EM UMA  
RESERVA AMBIENTAL DO ESTADO DO PARANÁ**

---

Londrina  
2011

---

**ATILIO SERSUN CALEFI  
THAIS BASTOS ZANATA  
KAUÊ CACHUBA DE ABREU  
WILLIAN LUIZ DA CUNHA  
ANDRESSA MARIA RORATO  
MARIO AUGUSTO ONO**

**AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO DE MAMÍFEROS DE PEQUENO PORTE  
NÃO-VOADORES SILVESTRES (ORDEM DIDELPHIMORPHIA E  
RODENTIA) POR PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS EM UMA  
RESERVA AMBIENTAL DO ESTADO DO PARANÁ**

Projeto para avaliação através do Instituto Ambiental do Paraná para concessão de licenças para pesquisas científicas em unidade de conservação, a ser desenvolvido na Reserva Particular do Patrimônio Natural Monte Sinai, Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Ciências Patológicas.

Orientador: Mario Augusto Ono

---

Londrina

2011

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	4
2. Objetivos.....	7
3. Justificativa.....	7
4. Resultados Esperados da Pesquisa.....	7
5. Apoio Financeiro.....	8
6. Materiais e Métodos.....	8
7. Cronograma de Desenvolvimento.....	12
8. Referências Bibliográficas.....	13

## 1 INTRODUÇÃO

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é o causador da Paracoccidioidomicose, uma micose humana sistêmica descrita pela primeira vez no Brasil há um século (LUTZ, 1908; SOARES, 2008). É uma doença limitada aos países da América Latina, e no Brasil é a oitava causa de óbito entre as doenças infecciosas e parasitárias (COUTINHO et al., 2002), sendo que a maioria dos casos tem sido reportada nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste (BRUMMER, 1993; BLOTTA, 1993).

*Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo termo dimórfico, que à 25°C, apresentam-se na forma de micélio com colônias brancas, aderentes ao meio, com hifas finas, septadas e esporos terminais ou intercalares. À temperatura de 37°C apresenta-se na forma de levedura, com células globosas com múltiplos brotamentos (BRUMMER, 1993).

Acredita-se que a infecção ocorra por inalação de propágulos do fungo provenientes do solo, seu provável habitat (ALBORNOZ, 1971; BAGAGLI, 2008). Ao atingirem o pulmão, os propágulos convertem-se para a forma de levedura, provocando lesões granulomatosas. A partir do pulmão pode ocorrer disseminação para qualquer outro órgão e tecido como fígado, baço, linfonodos, pele, sistema nervoso central, mucosas, testículos e adrenais (LACAZ, 1982; BERNARD, 2008; COSTA, 2005; FERRAZ, 2001; SCULLY, 1992; BRUMMER, 1993; PEDROSO, 2009).

A PCM pode ser classificada como PCM–Infecção e PCM–Doença. A PCM–Infecção acomete indivíduos de ambos os sexos, aparentemente saudáveis, que residem ou residiram em áreas endêmicas. É caracterizada pela ausência de sinais clínicos e reação intradérmica positiva para paracoccidioidina. (FRANCO, 1987).

A PCM–doença acomete principalmente trabalhadores rurais do sexo masculino, com idade média de 40 anos. A forma crônica ocorre em mais de 90% dos pacientes. A paracoccidioidomicose progride de forma lenta e o período de incubação pode durar meses ou anos. A forma aguda ou juvenil é caracterizada por um período curto de incubação e por envolvimento do sistema reticuloendotelial (LONDERO, 1983).

Por não ser uma doença de notificação compulsória, a prevalência e incidência da doença é difícil de ser determinada (FERREIRA-DA-CRUZ, 1987).

O diagnóstico definitivo da PCM pode ser realizado por meio de exame micológico e isolamento de fluidos broncoalveolares, material de lesões, fluido cefalorraquidiano, ou biópsias de tecidos (LACAZ, 1982). Em consequência do tempo requerido para o isolamento do fungo de indivíduos que apresentem sinais clínicos, têm sido empregados

com maior frequência, ensaios sorológicos, como imunodifusão em gel, ELISA, Western Blot, para um diagnóstico mais rápido (CANO, 1986; COSTA, 2010; CAMARGO, 2008; CAMARGO, 1994; CAMARGO, 1984; SILVA, 2003). Outro recurso diagnóstico para a detecção do fungo seria o emprego do PCR, apresentando maior sensibilidade e especificidade, porém de maior custo (GOMES, 2000; RICHINI-PEREIRA et al., 2008).

Devido a composição estrutural antigênica complexa do *P. brasiliensis*, tem sido empregado para o imunodiagnóstico da PCM a detecção de uma glicoproteína de 43 kDa (gp43) (TRAVASSOS, 1995). A gp43 é o principal antígeno utilizado no imunodiagnóstico e em estudos soroepidemiológicos da PCM.

Embora vários avanços tenham ocorrido no estudo da paracoccidiodomicose, a eco-epidemiologia dessa doença não está bem esclarecida. Acredita-se que o habitat do fungo seja o solo, todavia, poucos isolamentos foram realizados por essa fonte, sendo diversas tentativas infrutíferas (NEGRONI, 1966; MONTEIRO, 1996; SILVA-VERGARA, 1998).

Ono et al (2002) observaram que vários agrotóxicos inibem o crescimento do *P. brasiliensis* “in vitro”. Considerando os altos níveis de agrotóxicos utilizados nas culturas de importância econômica o isolamento do fungo poderia ser dificultado pela presença desses produtos no solo.

Devido à dificuldade do isolamento do *P. brasiliensis* a partir do solo, diversos pesquisadores tentam buscar alternativas para a descoberta do habitat do fungo. Uma abordagem possível seria a detecção de animais susceptíveis a infecção que funcionariam como possíveis marcadores epidemiológicos (CANTEROS, 2010; RICHINI-PEREIRA, 2008).

Estudos demonstraram a existência do desenvolvimento da paracoccidiodomicose em animais como o cão, tatu e recentemente o gato e bicho-preguiça (ONO et al., 2003; NAIFF, 1986; BAGAGLI, 1998; GONZALEZ, 2010; TREJO-CHAVEZ, 2011). Outras espécies de animais foram estudadas com o intuito de melhor compreender a interação fungo-hospedeiro-ambiente, como primatas, gambás, equinos, bovinos e aves (GREER, 1977; SILVEIRA, 2008; SILVA-VERGARA, 2001; CORTE, 2007; CORTE et al., 2009; OLIVEIRA, 2010).

O conhecimento da interação do *P. brasiliensis* com animais silvestres pode contribuir para determinação de sua eco-epidemiologia, bem como determinar espécies sentinelas ao aparecimento da doença.

O presente estudo tem como objetivo avaliar a infecção de mamíferos de pequeno

porte não-voadores silvestres (ordem Didelphimorphia e Rodentia) pelo fungo *P. brasiliensis* por meio de ensaios moleculares, na Reserva Particular do Patrimônio Natural Monte Sinai em Mauá da Serra, Paraná.

## 2 OBJETIVOS

### GERAL

Detectar possíveis casos de paracoccidioomicose-doença em animais silvestres de uma Reserva Particular do Estado do Paraná.

### ESPECÍFICOS

Detectar anticorpos para *P. brasiliensis* por ELISA, imunodifusão radial dupla e western-blot em amostras de sangue de animais silvestres.

Detectar antígeno de *P. brasiliensis*, por meio de ELISA de captura, em amostras de sangue de animais silvestres.

Realizar ensaio de PCR para detecção de *P. brasiliensis* em amostras de tecido de animais silvestres.

Tentativa de isolamento do *P. brasiliensis* a partir de amostras de sangue e tecido de animais silvestres.

## 3 JUSTIFICATIVA

O Estado do Paraná apresenta o maior número de casos de paracoccidioomicose do Sul do país.

Isolado a partir de amostras de solo ou de outras amostras contaminadas com solo, sugerem que o *P. brasiliensis* tenha um ciclo de vida como saprófita no solo (NEGRONI, 1966; TERCARIOLI, 2007; FRANCO, 2000). Os animais possuem um papel importante no monitoramento das micoses, especula-se que animais em contato freqüente com solo possam ser indicadores da presença do fungo no ambiente.

O presente estudo visa esclarecer aspectos da eco-epidemiologia do fungo, sendo importantes para a melhor compreensão do modo de infecção e fatores de risco.

## 4 RESULTADOS ESPERADOS

Serão formados recursos humanos altamente qualificados por meio de sistema de Pós-graduação, com a participação de alunos de doutorado, mestrado e especialização, além da participação de alunos da graduação em trabalhos de iniciação científica e trabalhos de conclusão de curso.

Praticamente não há estudos sobre paracoccidiodomicose em animais silvestres. O presente estudo possibilitará o esclarecimento das melhores técnicas para o diagnóstico como para o estudo epidemiológico da paracoccidiodomicose nas espécies animais estudadas. O projeto permitirá a formação de recursos humanos altamente qualificados para atuar em estudos com animais silvestres.

Ao final do projeto espera-se esclarecer a participação das diferentes espécies de animais estudadas na eco-epidemiologia da paracoccidiodomicose por meio de estudos de soroepidemiologia, epidemiologia molecular e dos possíveis isolamentos de *P. brasiliensis* a partir de espécies ainda não confirmadas como hospedeiros do patógeno.

## **5 APOIO FINANCEIRO**

O presente trabalho será financiado pelo Instituto Monte Sinai, km 302 BR-376, município de Mauá da Serra, Estado do Paraná e pela Fundação Araucária, chamada nº 14/2009 – “Programa de Apoio à Pesquisa Básica e Aplicada” – Modalidade C – Protocolo 17311 – Trabalho intitulado: “Avaliação de infecção de animais silvestres por *Paracoccidoides brasiliensis* em uma reserva ambiental do Estado do Paraná”. Coordenador: Mario Augusto Ono. Universidade Estadual de Londrina – UEL.

## **6 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **6.1 ÁREA DE ESTUDO:**

A RPPN (Reserva Particular do Patrimônio Natural) Monte Sinai [23°56'09" S e 51°08'49" O] está situada no Município de Mauá da Serra, km 302 da Rodovia do Café (BR-376), no Estado do Paraná, distante em torno de 310 km de Curitiba. Esta unidade de conservação foi criada em 2006, objetivando a preservação de uma área de mata nativa.



Localiza-se na Serra do Cadeado, divisão da Bacia do rio Ivaí e da Bacia do rio Tibagi, totalizando uma área de 593,14 ha. Faz parte do Planalto de Apucarana com altitude variando de 800 a 1.125 m na escarpa. Além disso, está inserida nos domínios da Floresta Ombrófila Mista e Floresta Estacional Semidecidual (VELOSO et al., 1991). Segundo a classificação de Köppen, o clima na região é do tipo Cfb: temperado propriamente dito com temperatura média no mês mais frio abaixo de 18°C (mesotérmico), verões frescos e temperatura média no mês mais quente abaixo de 22°C, sem estação seca definida. A precipitação média anual é de 1400 a 1600 mm e a temperatura média anual é de 18 a 19°C (IAPAR, 2002).

Atualmente a área da RPPN e as propriedades de seu entorno são formadas por fragmentos florestais de mata nativa (mais de 1000 ha), plantações de *Pinus* sp. (em torno de 150 ha) e *Eucalyptus* sp. (aproximadamente 150 ha) e áreas para o pasto e agricultura (em torno de 80 ha) (Dados retirados das matrículas dos imóveis). O presente estudo utilizará áreas com fragmentos florestais de mata nativa e plantações de *Pinus* sp. e *Eucalyptus* sp.

## 6.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS:

Para a captura de pequenos mamíferos não-voadores serão utilizadas armadilhas do tipo Sherman (430x125x145mm), Tomahawk (450x210x210mm e 900x210x210) e serão instaladas armadilhas de queda, do tipo pitfall. As amostragens serão mensais e a cada fase amostral as armadilhas serão dispostas em transectos, ficando três noites consecutivas com revisões diárias. As armadilhas serão posicionadas no solo (70%) e sub-bosque (30%) com distância entre armadilhas de 10m. A isca será composta de banana, fubá, sardinha, paçoca, óleo de fígado e essência de baunilha, buscando-se generalizar a captura das diferentes espécies de mamíferos de pequeno porte não-voadores.

Os animais capturados, pela metodologia descrita, fazem parte do projeto "Pequenos Mamíferos Não-Voadores (Ordem Rodentia e Didelphimorphia) da RPPN Monte Sinai e entorno, Mauá da Serra, Serra do Cadeado, Estado do Paraná", (SISBIO nº 30025), o presente estudo só utilizará animais tombados para coleção científica de mastozoologia da Universidade Federal do Paraná(CCMZ).

Será coletada amostra de sangue, com material estéril e animal anestesiado ( 60mg de cetamina + 16mg de xilazina, ambas/kg, via IP), e vísceras (fígado, baço,

pulmões, rins e coração) com animal eutanasiado empregando exsanguinação por secção de veia cava e arteria abdominal. Os procedimentos de eutanásias seguirão Resolução nº714 de 20 de Junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária e diretrizes recomendadas pela Associação Americana de Medicina Veterinária.

Devido a dificuldade de obtenção de materiais biológicos de animais silvestres, outros órgãos, como sistema gastro intestinal, cérebro e parte do sistema músculo esquelético será coletado e armazenado para posteriores pesquisas de outros agentes etiológicos de importância em Medicina Veterinária e/ou Saúde Pública com a finalidade de pesquisa científica.

### 5.3 ENSAIOS IMUNOLÓGICOS

#### 6.3.1 ELISA indireto

Placas de ELISA, fundo chato, serão sensibilizadas com gp43. Após as lavagens e bloqueio serão adicionados soros dos animais, seguido de incubação. Após lavagens será adicionado conjugado Proteína A-peroxidase ou Proteína G-peroxidase dependendo da espécie de animal. Após as lavagens e incubações será adicionado o substrato/cromógeno. A reação será bloqueada e a análise será feita em leitora de ELISA a 450nm.

#### 6.3.2 ELISA quantitativo para gp43

Placas de ELISA, fundo chato, serão sensibilizadas com IgG de coelho anti-gp43. Após as lavagens e bloqueio serão adicionados soros a serem testados, seguido de incubação. Após lavagens será adicionado anticorpo monoclonal anti-gp43, seguido de incubação. Após lavagens adiciona-se conjugado anti-IgG de camundongo-peroxidase. Após as lavagens e incubação será adicionado substrato/cromógeno. A reação será bloqueada e a análise será feita em leitora de ELISA a 450nm. A concentração de gp43 será determinada a partir de uma curva padrão.

#### 6.3.3 Imunodifusão radial dupla

Lâminas de microscopia serão adicionadas de 3,5ml de ágar 1% em PBS. Após a

gelificação serão feitos orifícios. No orifício central será adicionado o exoantígeno e nos orifícios periféricos o soro a ser testado.

#### 6.3.4 Western-blot

Exoantígeno de *P. brasiliensis* será submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5%. Após a corrida eletroforética o gel será colocado em contato com a membrana de nitrocelulose, e submetido à transferência. Após bloqueio e incubação com os soros a serem testados a membrana será lavada e incubada com conjugado anti-IgG-peroxidase específico para cada espécie. A revelação será feita com substância substrato/cromógeno e a reação interrompida com água destilada.

#### 6.4 PCR PARA DETECÇÃO DE *P. brasiliensis* EM AMOSTRAS DE TECIDOS

As amostras de tecidos serão submetidos a extração de DNA como descrito por Corredor et al. (1999). A detecção de *P. brasiliensis* será realizada por meio de reação de Nested PCR, segundo Richini-Pereira et al. (2008), utilizando os primers: outer ITS4 (5-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3) e ITS5 (5-GGAAGTAAAAGTCGTAACAACG-3), temperature de annealing de 60°C, e inner PbitSE (5-GAGCTTTGACGTCTGAGACC-3) e PbitSR (5-AAGGGTGTGATCGAGAGAG-3), temperature de annealing de 62°C.4. Isolamento de *P. brasiliensis* de material biológico Amostras dos tecidos coletados serão semeados em Ágar Sabouraud com cloranfenicol, seguido de incubação a 37°C por 6 semanas. As amostras também serão submetidas a exame à fresco e a exame histopatológico (colorações H.E. e Grocott), para detecção do fungo.

#### 6.5 ISOLAMENTO DE *P. brasiliensis* DE MATERIAL BIOLÓGICO

Amostras dos tecidos coletados serão semeados em Ágar Sabouraud com cloranfenicol, seguido de incubação a 37°C por 6 semanas. As amostras também serão submetidas a exame à fresco e a exame histopatológico (colorações H.E. e Grocott), para detecção do fungo.

#### 6.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBORNOZ, M. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, Oxfordshire, Inglaterra, 9:248-253, 1971.

BAGAGLI, E. et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasyus novencinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Méd. Hyg.** 58(4):505-512, 1998.

BAGAGLI, E.; THEODORO R. C. ; BOSCO, S. M. G. ; MCEWEN, J. G. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, 165:197–207, 2008.

BERNARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, 165:209–221, 2008.

BLOTTA, M. H. S.; CAMARGO, Z. P. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n. 3, p. 671-676, 1993.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: An update. **Clinical Microbiology**, Washington, 6(2)89-117, 1993.

CAMARGO, Z. P et al. Enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) in the paracoccidioidomycosis. Comparision with counter immunoelectrophoresis and erythro-immunoassay. **Mycopathologia**, 81: 31-7, 1984.

CAMARGO, Z. P. et al. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* Exoantigens for Immunodiffusion Tests. **Journal of clinical microbiology**, 26(10)2147-2151, 1988.

CAMARGO, Z. P. et al. Monoclonal Antibody Capture Enzyme Immunoassay for Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* Antibodies in Paracoccidioidomycosis. **Journal of clinical microbiology**, 32(10):2377-2381, 1994.

CAMARGO, Z. P. Serology of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, 165:289–302, 2008.

CANO, L. E. et. al. An evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantification os antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, 24(6): 467-475, 1986.

CANTEROS. C. E. et al. Agentes de micosis endêmicas em una área rural de Argentina: estudio seroepidemiológico em perros. **Revista Iberoamericana de Micologia**, 27(1):14–19, 2010.

CORTE, A. C. et al. Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Paraná State, Brasil. **Mycopatologia**, 164:225-228, 2007.

CORTE, E. N. ITANO, R. L. FREIRE, *et al.*, Detecção de anticorpos para *Paracoccidioides brasiliensis* em cavalos da região norte do Estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**.

30 (2):431-436, 2009.

CORREDOR, G. G. et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. **Revista Iberoamericana de Micologia**, Bilbao, 16: 216-220, 1999.

COSTA, M. A. B. et al. Manifestação extrapulmonar da Paracoccidioidomicose. **Radiologia Brasileira**, 38 (1): 45-52, 2005.

COSTA, P. F. et al. Characteristics of Environmental *Paracoccidioides brasiliensis* Isolates. **Mycopathologia**, 169:37-46, 2010.

COUTINHO, Z. F. et al. Mortalidade por paracoccidioidomicose no Brasil (1980-1995). **Caderno de Saúde Pública**, 18(5): 1441-1454, 2002.

FERRAZ, E.; CELLA, W.; ROCHA, E.; CALDATO, R. Paracoccidioidomicose primária de pálpebra e conjuntiva. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, 64:259-61, 2001.

FERREIRA-DA-CRUZ, M. F.; WANKE, B.; GALVÃOCASTRO, B. Prevalence of paracoccidioidomycosis in hospitalized adults in Rio de Janeiro. *Mycopathologia*, Den Haag, Holanda, v.97, p.61-64, 1987.

FRANCO, M. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification on its clinical forms. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, 20:129-133, 1987.

FRANCO, M., BAGAGLI, S., SCAPOLIO and DA SILVA LACAZ. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. **Medical mycoly** v.38, n. 3, pp. 185-191, 2000.

GOMES, G. M. ; CISALPINO, P. S. ; TABORDA, C. P. ; CAMARGO, Z. .P. PCR for Diagnosis of Paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, 38(9):3478-3480, 2000.

GONZALEZ, J. F., N. A. MONTIEL, et al. "First report on the diagnosis and treatment of encephalic and urinary paracoccidioidomycosis in a cat." **J. Feline. Med. Surg.** 12(8): 659-662, 2010.

GREER, D. L.; BOLANÓS, B. Role of Bats in the ecology of *Paracoccidioides brasiliensis* in the intestinal tract of frugivorous bat, *Artibeus lituratus*. **Sabouraudia**, Oxfordshire, v.15, p.273-283, 1977.

IAPAR - INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANA. Cartas climáticas básicas do Estado do Paraná. **IAPAR/Curitiba**, 2002.

LACAZ, C. S. Aspectos clínicos gerais. Formas polares de paracoccidioidomicose. In: DEL NEGRO, G.; LACAZ, C. S.; FIALHO, A. M. **Paracoccidioidomycosis**. São Paulo: Sarvier – EDUSP, 1982.

LONDERO, A.T.; MELLO, I.S. Paracoccidioidomycosis in childhood. A critical review.

**Mycopathologia**, Den Haag, Holanda, 82:49-55, 1983.

LUTZ, A. Uma micose pseudo-coccidica localizada na boca e observada no Brasil: contribuição ao conhecimento das hypho-blastomycoses americanas. *Brasil – Medico*, Rio de Janeiro, v.22, p.121, 1908.

MONTEIRO, M. R. et al. Isolation of fungi from nature in the region of Botucatu, State of Sao Paulo, Brazil, an endemic area of Paracoccidioidomycosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 91(6):665-70, 1996.

NAIFF, R. D. et al. Paracoccidioidomicose enzootica em tatus (*Dasyurus novemcinctus*) no Estado do Para. **Rev Inst Med Trop**, Sao Paulo, 28:19–27, 1986.

NEGRONI, P. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente en el suelo Argentino. **Pren Med Argent**, v.53, pp. 2381–2382, 1966.

OLIVEIRA, G. G. et al. Serological evidence of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in chickens from Paraná and Mato Grosso do Sul states, Brazil. **Mycopathologia**, doi 10.1007/s11046-010-9366-6, 2010.

ONO, M. A. et al. Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by pesticides: Is this a partial explanation for the difficulty in isolating this fungus from the soil? **Medical Mycology**, 40:493–499, 2002.

ONO, M. A. et al. Experimental paracoccidioidomycosis in dogs. **Medical Mycology**, 41:265/268, 2003.

PEDROSO, V. S. P. et al. Paracoccidioidomicose com comprometimento do sistema nervoso central: revisão sistemática da literatura. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 42 (6):691-697, 2009.

PEREIRA M, VIANNA GO. A propósito de um caso de blastomycose (Piohemia blastomycótica). *Archivos Brasileiros de Medicina*, 1:63-83, 1911.

RICHINI-PEREIRA, V. B. et al. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. **Medical Mycology**, 46(1)35-40, 2008.

SCULLY, C.; ALMEIDA, O. P. Orofacial manifestations of the systemic mycoses. **J. Oral Pathol. Med.**, 21: 289-94, 1992.

SILVA, S. H. M. et al. Detection of Circulating gp43 Antigen in Serum, Cerebrospinal Fluid, and Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients with Paracoccidioidomycosis. **Journal of clinical microbiology**, 41(8):3675–3680, 2003.

SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R.; CHADU, A. et al. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, state of Minas Gerais, Brazil. **J. Med. Vet. Mycol.**, 36: 37-42, 1998.

SILVA-VERGARA, M. L. et al. The marsupial *Didelphis albiventris* is an improbable host of *Paracoccidioides brasiliensis* in na endemic area of paracoccidioidomycosis in Minas

Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 96, p. 771-772, 2001.

SILVEIRA, L. H. et al. Occurrence of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in Dairy Cattle from Mato Grosso do Sul, Brasil. ***Mycopathologia***, 165:367–371, 2008.

SOARES, C. M. A. et al. A Centennial: Discovery of *Paracoccidioides brasiliensis*. ***Mycopathologia***, 165:179–181, 2008.

TERÇARIOLI, G R., BAGAGLI, E., REIS, G. M., THEODORO, R. C., BOSCO, S. M. G., MACORIS, S. A. G. and RICHINI-PEREIRA, V. B. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soli: growth ability, conidia production and molecular detection. ***BMC microbiology***, v. 7, pp. 92, 2007.

TRAVASSOS, L.R. et al. Biochemistry and molecular biology of the main diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. ***Arch Med Res***, 26: 297-307, 1995.

TREJO-CHAVEZ, A., R. RAMIREZ-ROMERO, et al. (2011). Disseminated paracoccidioidomycosis in a Southern two-toed sloth (*Choloepus didactylus*). ***J Comp Pathol***. 144(2-3): 231-234, 2011.

VELOSO, H.P. ; RANGEL-FILHO, A.L.R.R.; LIMA, J.C.A. Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística/IBGE**, Rio de Janeiro, 1991.