



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU**

Izabella Cristina Mastromoro

**Identificação de Biomarcadores da Paracoccidioidomicose Humana
por Técnicas de Espectrometria de Massas**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica).

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Estela de Oliveira Lima

Botucatu
2022

IZABELLA CRISTINA MASTROMORO

Identificação de Biomarcadores da
Paracoccidioidomicose Humana por Técnicas de
Espectrometria de Massas

Monografia apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestra em Pesquisa e Desenvolvimento
(Biotecnologia Médica).

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Estela de Oliveira Lima

Botucatu
2022

Autorizo a divulgação deste trabalho para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Mastromoro, Izabella Cristina.

Identificação de biomarcadores da paracoccidiodomicose humana por técnicas de espectrometria de massas / Izabella Cristina Mastromoro. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Estela de Oliveira Lima

Capes: 40101096

1. Marcadores bioquímicos. 2. Espectrometria de massa.
3. Paracoccidiodomicose. 4. Metabolômica.

Palavras-chave: Biomarcadores; Metabolômica;
Paracoccidiodomicose.

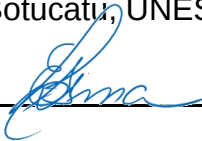
Izabella Cristina Mastromoro

Identificação de Biomarcadores da Paracoccidioidomicose Humana por Técnicas de Espectrometria de Massas

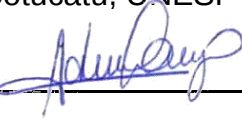
Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica).

Banca Examinadora

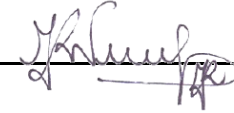
Prof^a. Dr^a. Estela de Oliveira Lima Instituição: Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP

Julgamento: Aprovada Assinatura: 

Prof^a. Dr^a. Adriana Camargo Ferrasi Instituição: Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP

Julgamento: Aprovada Assinatura: 

Prof^a. Dr^a. Maruska do Rocio Neufert Fernandes Instituição: Medicina, UNIFEBE

Julgamento: Aprovada Assinatura: 

Botucatu, 31 de maio de 2022

In memoriam a Pedro Pereira de Souza.

*Avô, pai, amigo e o melhor homem que tive o
prazer e honra de ter como família.*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por toda saúde, sabedoria e discernimento concedido neste longo caminho durante toda a minha vida. Agradeço a Nossa Senhora Aparecida por toda intercessão, amparo, proteção e benção concedida, por acalmar e guiar meu coração aos melhores caminhos.

Agradeço a minha Mãe Rosenilda Pereira de Souza por todo cuidado, todo empenho e esforço realizado para me tornar a pessoa que sou hoje, por ser meu exemplo e por ter me apoiado e me incentivado neste e em todos os meus outros sonhos, obrigada por ser a primeira pessoa a acreditar em mim e me incentivar dos primeiros passos a tudo mais que foi feito em minha vida.

Agradeço a minha irmã Rafaella Mastromoro por sempre ter me apoiado, motivado e inspirado a ser melhor e ser exemplo, por sempre ter me amparado quando precisei e por dividir a vida comigo desde sempre.

Agradeço as minhas melhores amigas Carol, Camila e Amanda que sempre me apoiaram, incentivaram, compreenderam as ausências e sempre que possível estiveram presentes.

Agradeço minha professora, orientadora de graduação e amiga Patrícia Carvalho Garcia por todo carinho, apoio, incentivo, atenção, confiança desde o início da minha vida acadêmica e por ser um exemplo de profissional e pessoa.

Agradeço a minha orientadora, Dra. Estela de Oliveira Lima, por toda paciência ao me ensinar inúmeras vezes, pela imensa dedicação e por acreditar em mim quando eu mesma descreditei, tenho imenso orgulho por ter feito essa jornada toda ao seu lado, pessoa e profissional incrível digna de imensa admiração (principalmente por dominar tanto química, metabolômica e esses afins super complexos).

Agradeço as avaliadoras da banca, Prof^a Dr^a Adriana Camargo Ferrasi e Dr^a Maruska do Rocio Neufert Fernandes, por disponibilizarem seu tempo e todo seu conhecimento para contribuir com este trabalho e por todas as melhorias.

Agradeço a todos os envolvidos neste projeto, ao laboratório Innovare e Clínica

Médica que possibilitaram esta parceria para o desenvolvimento do mesmo e a todos os funcionários que direta ou indiretamente contribuíram imensamente.

Agradeço a todos os indivíduos que participaram do estudo, sem vocês nada seria possível.

“Eu creio em mim mesmo. Creio nos que trabalham comigo, creio nos meus amigos e creio na minha família. Creio que Deus me emprestará tudo que necessito para triunfar, contanto que eu me esforce para alcançar com meios lícitos e honestos. Creio nas orações e nunca fecharei meus olhos para dormir, sem pedir antes a devida orientação a fim de ser paciente com os outros e tolerante com os que não acreditam no que eu acredito. Creio que o triunfo é resultado de esforço inteligente, que não depende da sorte. Creio que tirarei da vida exatamente o que nela colocar. Serei cauteloso quando tratar os outros, como quero que eles sejam comigo. Prestarei o melhor serviço de que sou capaz, porque jurei a mim mesmo triunfar na vida, e sei que o triunfo é sempre resultado do esforço consciente e eficaz”

(Napoleon Hill).

RESUMO

A paracoccidioidomicose é uma importante micose sistêmica que pode ser frequentemente diagnosticada erroneamente, uma vez que os principais métodos diagnósticos são a microscopia direta e as técnicas sorológicas, cuja precisão deixa a desejar. Portanto, há uma urgência por métodos diagnósticos mais precisos. Amostras de soro humano de pacientes com paracoccidioidomicose (grupo PB) e voluntários saudáveis foram submetidas à preparação e análise por espectrometria de massa de alta resolução. Esses dados foram avaliados estatisticamente com análise multivariada dos escores PLS-DA e VIP. Para cada biomarcador eleito foram propostos metabólitos correspondentes utilizando a base de dados METLIN e revisão de literatura. Um mapa de calor também foi projetado para observar a distribuição de cada biomarcador de acordo com a condição do sujeito. Além disso, uma curva ROC e sua matriz de confusão foram construídas com os biomarcadores mais importantes. A partir da análise, foram eleitos 9 biomarcadores séricos para o grupo PB, representados pelas relações massa/carga de: 909,7, 565,6, 623,3, 567,1, 910,7, 663,6, 959,7, 666,5, 621,3. As curvas ROC apresentaram acurácias de 98,1% e 96,2% quando testadas com esses 9 biomarcadores e os 5 mais importantes, respectivamente, apresentando sensibilidade acima de 85% e especificidade acima de 94%. Considerando a necessidade de métodos diagnósticos mais assertivos na paracoccidioidomicose, apresentamos novos biomarcadores séricos altamente precisos na discriminação de indivíduos infectados, que representam potenciais marcadores séricos de diagnóstico para paracoccidioidomicose.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose, Biomarcadores séricos, Diagnóstico, Espectrometria de massa.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis is an important systemic mycosis that might be frequently misdiagnosed, once the main diagnostic methods are direct microscopy and serological techniques, whose accuracy leaves to be desired. Therefore, there is an urgency for more accurate diagnostic methods. Human serum samples from Paracoccidioidomycosis patients (PB group) and healthy volunteers were submitted to preparation and analysis through high-resolution mass spectrometry. These data were statistically evaluated with a multivariate analysis of PLS-DA and VIP scores. For each elected biomarker it was proposed corresponding metabolites using METLIN database and literature review. A heatmap was also designed to observe the distribution of each biomarker according to the subject condition. In addition, a ROC curve and its confusion matrix were built with the most important biomarkers. From the analysis, 9 serum biomarkers were elected for PB group, represented by mass/charge ratios of: 909.7, 565.6, 623.3, 567.1, 910.7, 663.6, 959.7, 666.5, 621.3. The ROC curves showed accuracies of 98.1% and 96.2% when tested with these 9 biomarkers and the 5 most important, respectively, showing sensitivity above 85% and specificity above 94%. Considering the necessity for more assertive diagnostic methods in paracoccidioidomycosis, we present new serum biomarkers highly accurate in discriminating infected individuals, which represent potential serum diagnostic markers for paracoccidioidomycosis.

Keywords: Paracoccidioidomycosis, Serum biomarkers, Diagnosis, Mass spectrometry.

LISTA DE TABELAS

Table 1 – Identification of the selected biomarkers for CT and PB groups	48
---	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Representação da distribuição geográfica da Paracoccidioidomicose no Brasil...15

CAPÍTULO 2

Figure 1 – Partial least square-discriminant analysis (PLS-DA) score plot generated by CT (control group) and PB (paracoccidioidomycosis group) mass spectra data comparison showing clustering of samples from the same group, with data on positive ion mode 45

Figure 2 – Heatmap presenting the frequency of each marker, including isotopes, according to groups' samples..... 46

Figure 3 – Accuracy analysis of Paracoccidioidomycosis' most discriminant biomarkers through ROC curves testing..... 46

Figure 4 – Accuracy analysis of isolated or combined Paracoccidioidomycosis' most discriminant biomarkers through ROC curves testing..... 47

Figure 5 – Box plots of the 2 most promising PB diagnostic biomarkers (a. 656.6; b. 567.1) according to original m/z frequency (left box plot) and normalized frequency (right box plot) in samples from both groups (CT: red boxes; PB: green boxes). 47

SUMÁRIO

RESUMO.....	VIII
ABSTRACT	IX
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE FIGURAS	XI
CAPÍTULO 1	13
1 INTRODUÇÃO	13
2 JUSTIFICATIVA	24
3 OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo Geral	25
3.2 Objetivos Específicos	25
4 REFERÊNCIAS	26
CAPÍTULO 2	32
1. INTRODUCTION	34
2. MATERIALS AND METHODS	35
3. RESULTS	36
4. DISCUSSION	38
5. CONCLUSION	39
6. REFERENCES	41
FIGURES AND CAPTIONS	45
TABLES AND CAPTIONS	48
7. ANEXO I	49

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Dentre as várias doenças fúngicas que afetam os seres humanos, a paracoccidioidomicose (PCM) é uma importante micose sistêmica predominante na América Latina (RESTREPO, 1985). O primeiro relato da doença foi feito por Adolfo Lutz em 1908, em que descreve aspectos histopatológicos, clínicos e micológicos da nova doença, a qual ele denominou como micose pseudococcídica (LUTZ, 1908).

A PCM é uma infecção causada principalmente pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, e se manifesta principalmente como uma pneumopatia de curso crônico associada a lesões cutâneas e mucosas. Se não tratada, a infecção pode levar ao desenvolvimento de quadros graves e até letais, acometendo pulmões, pele, órgãos linfóides e fígado (COUTINHO et al., 2002).

Embora seja pequena a proporção de indivíduos que desenvolve alguma manifestação clínica quando expostos ao fungo, a PCM representa um importante problema de Saúde Pública para os países endêmicos, pois apresenta um elevado potencial incapacitante para os indivíduos infectados, sobrecarregando os sistemas públicos de atendimento ao paciente. Além do impacto no serviço de saúde, surgem também os impactos econômico e social, uma vez que a maioria dos indivíduos são acometidos pelas manifestações clínicas ainda na fase mais produtiva da vida, entre 30 e 50 anos de idade (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006a). Devido à cronicidade, ao tratamento de longa duração e às sequelas causadas pela doença, o indivíduo passa a apresentar incapacidade para o trabalho e sua qualidade de vida cai consideravelmente.

A PCM é causada por espécies fúngicas do gênero *Paracoccidioides*: *P.*

brasiliensis e *P. Lutzii* (TEIXEIRA et al., 2009). *P. brasiliensis* é um fungo saprófita (decompositor) presente no solo, e caracterizado como termodimórfico, ou seja, em temperatura ambiente (26°C) se apresenta sob a forma filamentosa, caracterizada pela presença de hifas delgadas, hialinas, septadas e com formação de conídios (CARBONELL; RODRIGUEZ, 1968). Entretanto, quando cultivado à temperatura de 35 - 37°C ou em vida parasitária, o patógeno assume a forma de levedura, com paredes celulares espessas, birrefringentes e multinucleadas (FRANCO; SANBLAS, 1994; MOREIRA, 2008).

O dimorfismo térmico está associado à patogenicidade do fungo, pois cepas que não apresentam essa transformação morfológica não são capazes de se multiplicar no hospedeiro (MARESCA; KOBAYASHI, 2000). O fato de que a temperatura é o fator que estimula a modificação do estado filamentoso em leveduriforme torna o *P. brasiliensis* um modelo acessível para estudos moleculares e bioquímicos associados ao dimorfismo.

Recentemente, análises filogenéticas, comparações morfológicas e estudos de genômica de diferentes isolados de *P. brasiliensis* permitiram a identificação de uma nova espécie de fungo do gênero *Paracoccidioides*, o *Paracoccidioides lutzii*, também termodimórfico (DE MELO TEIXEIRA et al., 2014; MATUTE et al., 2006; THEODORO et al., 2012). Essa nova espécie também pode causar PCM, entretanto os casos relacionados à nova espécie têm sido mais prevalentes nas regiões Centro-oeste e Norte do Brasil.

Doenças fúngicas têm afetado cerca de 1,2 bilhões de pessoas no mundo todo, sendo que aproximadamente 2.000.000 de pessoas morrem por infecções fúngicas ao ano (DENNING; BROMLEY, 2015). A PCM, doença endêmica nos países da América Latina, atinge principalmente o Brasil, Colômbia, Venezuela e Argentina,

países em que há maior número de casos de PCM. Destes, 80% têm origem no Brasil, principalmente nas regiões sul, sudeste e centro-oeste. Segundo dados fornecidos pelo Ministério da saúde, esta patologia representa uma entre as dez principais causas de morte tratando-se de doenças infecciosas e parasitárias que são crônicas e recorrentes no Brasil (BRASIL, 2022). Até os dias atuais, a notificação dos casos de PCM no Brasil não é obrigatória, o que dificulta a análise epidemiológica exata da prevalência da doença no país. A figura a seguir retrata a distribuição geográfica da paracoccidioidomicose no Brasil.

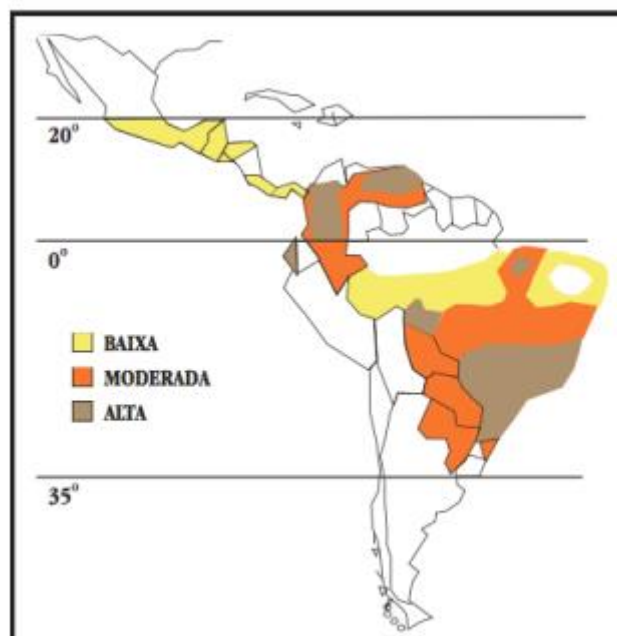


Figura 1: Distribuição geográfica da PCM (Fonte: adaptada de Rosa Junior et al., 2018).

No entanto, com base em inquéritos epidemiológicos e estudos de casos, estima-se que a taxa de incidência anual na população brasileira variam de 0,71 caso a 3,7 casos a cada 100 mil habitantes. Ainda assim, a PCM corresponde à 8ª causa de morte por doenças infecciosas crônicas, sendo que, no Brasil chegou a alcançar uma média anual de 168 mortes por ano no período entre 1996 e 2006 (SHIKANAI-

YASUDA, 2018).

O principal fator de risco para a infecção é a atividade profissional ligada ao manejo agrícola. Em se tratando de um microrganismo presente no solo, atividades em que haja manipulação de solo contaminado, como terraplenagem, práticas de jardinagem, preparo de solo, dentre outras, contribuem para a contaminação de trabalhadores da zona rural (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006b).

O número de casos de PCM entre populações indígenas tem sido bem pequeno, pois essas tribos baseiam sua subsistência na caça e na pesca (FORJAZ et al., 1999). Diferentemente dos índios, os europeus e japoneses que migraram para o Brasil no início do século XX iniciaram o manejo do solo com atividades agrícolas voltadas principalmente para a cultura de café, o que alterou a epidemiologia da doença, sendo que 38% dos casos de PCM inicialmente identificados eram de imigrantes ligados à agricultura no estado de São Paulo (ALMEIDA F, LACAZ CS, 1946; DE MATOS et al., 2012).

Atualmente, por se tratar de uma infecção associada a atividades agrícolas, acomete principalmente trabalhadores da zona rural de áreas endêmicas, com idade entre 30 e 60 anos, sendo que 90% dos afetados são do sexo masculino. Entre os fatores de alto risco para a PCM estão: higiene precária, desnutrição, tabagismo e alcoolismo (FRANCO, 1987; SILVA-VERGARA et al., 2000; VILLA et al., 2000).

Estas condições, comumente observadas nessa população, têm importante influência na transformação do estado de infecção para uma doença manifesta, pois interferem na capacidade de defesa do organismo hospedeiro. Ao se manifestar clinicamente, os pacientes são encaminhados a centros de saúde especializados e dão início a um longo tratamento, o qual pode se tornar até permanente, dependendo da gravidade e de recidivas (MARTINEZ, 2010;PIRES DE CAMARGO; DE FRANCO,

2000).

A principal via de contaminação por fungos do gênero *Paracoccidioides* é a inalação de propágulos ou conídios fúngicos dispersos no ar sob a forma de aerossol, sendo que a doença pode afetar tanto humanos quanto animais. A partir do momento em que o fungo se aloja nos pulmões (sítio primário da infecção), algumas vias de sinalização são ativadas pela temperatura corporal do hospedeiro e o fungo filamentosos se transforma em sua forma patogênica leveduriforme (FRANCO, 1987; MCEWEN et al., 1987).

Após a inalação dos propágulos, estes podem ser destruídos por células fagocíticas do parênquima pulmonar ou podem se multiplicar gerando um foco de infecção primário. Em indivíduos imunocompetentes, as lesões podem regredir de forma espontânea, caracterizando a forma assintomática ou subclínica da doença, aquela que afeta a maioria das pessoas infectadas por *P. brasiliensis*. Entretanto, alguns indivíduos podem desenvolver a doença sintomática, a qual se apresenta sob diferentes formas clínicas, dependendo da susceptibilidade do hospedeiro, da virulência da cepa e das condições ambientais (MCEWEN et al., 1987).

A PCM pode manifestar-se sob duas formas: i) aguda/subaguda (forma juvenil), cujas manifestações são mais graves, com lesões disseminadas e acometimento de crianças e jovens adultos; e ii) crônica (forma adulta), que afeta principalmente homens adultos e acomete a mucosa oral, as vias aéreas e provoca lesões pulmonares (BOCCA et al., 2013; MARQUES, 2013; MARTINEZ, 2015).

A forma juvenil da PCM se desenvolve em poucas semanas ou meses, é mais severa e responde por elevadas taxas de mortalidade, pois leva à hipertrofia do sistema reticuloendotelial. Os pacientes em geral apresentam linfadenomegalia, manifestações digestivas, hepatoesplenomegalia, envolvimento ósteo-articular e

manifestações cutâneas (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006b). Já a forma adulta da doença representa cerca de 90% dos casos de PCM e se desenvolve lentamente, podendo levar de meses a anos para se manifestar. Nesse caso, a primeira manifestação da micose é a redução da função pulmonar, que pode ser acompanhada de sintomas como fraqueza, emagrecimento, febre, tosse e dispneia (WANKE; AIDÉ, 2009). A partir do momento em que há disseminação da infecção para outros órgãos e tecidos, surgem lesões em mucosas, pele, linfonodos e glândulas adrenais. Os principais sinais e sintomas clínicos são dor ao mastigar e engolir, sialorréia e até mesmo caquexia, quando o indivíduo demora muito a procurar assistência médica (LONDERO, 1986).

A forma clínica da doença está diretamente relacionada com o padrão de resposta imune que esse indivíduo apresenta diante da infecção, sendo que a principal defesa do hospedeiro contra o fungo é a ativação da resposta imune predominantemente celular. Pacientes cujas manifestações clínicas são mais brandas apresentam um predomínio de resposta imune celular, em que as citocinas como IFN- γ , IL-2 (padrão Th1) prevalecem. Esses pacientes apresentam a formação de granulomas densos, compactos e com baixa quantidade de células fúngicas (BAVA et al., 1991). Por outro lado, pacientes que manifestam a forma clínica mais severa da PCM apresentam a formação de granulomas frouxos, grande quantidade de células leveduriformes, baixa produção de citocinas Th1 e um predomínio de citocinas Th2, como IL-10 (MOSCARDI-BACCHI; BRUMMER; STEVENS, 1994; TAPIA et al., 1991). Esse desequilíbrio na produção de citocinas pode influenciar negativamente na resposta imune do hospedeiro, reduzindo tanto a atividade microbicida quanto a capacidade de apresentação de antígenos pelos macrófagos (BORGES-WALMSLEY et al., 2002).

O método diagnóstico considerado padrão-ouro para a PCM consiste na visualização microscópica, identificação e isolamento de células fúngicas características de *Paracoccidioides spp.* A melhor e mais rápida forma de estabelecer o diagnóstico é a análise direta de amostras clínicas, que em geral correspondem a secreções do trato respiratório, urina, LCR, pus de gânglios, biópsia, raspado e crostas de lesões ulceradas. Ao microscópio óptico devem-se observar células fúngicas globosas, com dupla parede refringente bem definida, rodeadas por vários brotos esféricos. Essas análises podem ser realizadas tanto diretamente a partir de fluidos biológicos, quanto a partir de cultura de material biológico, embora esta última seja mais demorada. A biópsia e análise histopatológica também podem ser realizadas, mas apenas quando o local de coleta permitir e for o menos agressiva possível. Nesse caso, colorações especiais são utilizadas para análise de granulomas teciduais e identificação de células típicas multibrotantes, ou seja, células esféricas rodeadas de brotamentos esféricos ou em forma de limão (BRUMMER et al., 1993; RESTREPO; MONCADA, 1978).

Embora esses sejam os métodos mais indicados para o diagnóstico de certeza da PCM, a detecção do patógeno em amostras biológicas é dificultada em razão da presença de poucas estruturas patognomônicas ou até mesmo devido ao estado crítico do paciente, impedindo a coleta do material biológico (FERREIRA DA-CRUZ et al., 1990). Além disso, análises histológicas podem levar ao diagnóstico errôneo, uma vez que as formas fúngicas encontradas podem ser confundidas com outros patógenos, como *Histoplasma capsulatum*.

O diagnóstico padrão-ouro baseado na identificação de estruturas fúngicas, visualiza diretamente as células características em amostras biológicas no microscópio, a pesquisa do fungo no escarro era realizada através de análise das

amostras simples e fresca em lâmina e lamínula, posteriormente realizou-se clareamento a base de potássio ou soda para melhorar a sua sensibilidade. Em estudo realizado por Moreto, a sensibilidade do exame micológico direto realizado em diferentes amostras clínicas foi de 74,5% semelhante as taxas descritas na literatura, porém quanto a especificidade trata-se de um parametro de difícil identificação nesta técnica, devido a morfologia fúngica ser semelhante a outras espécies o que dificulta a correta identificação e diagnóstico (MORETO et al, 2011).

Para os casos em que não é possível observar estruturas fúngicas a partir de amostras biológicas, várias técnicas sorológicas vêm surgindo, dentre elas estão a Imunodifusão Dupla em Gel de Agarose-ID (DE CAMARGO et al., 1988, 2003), Dotblot (KAMIKAWA; VICENTINI, 2015; TABORDA; CAMARGO, 1994), ELISA (CAMARGO et al., 1984; DE CAMARGO et al., 1984), Western-blot (BLOTTA; CAMARGO, 1993) e aglutinação em látex (RESTREPO; MONCADA, 1978).

Esses métodos são amplamente utilizados para o diagnóstico sorológico, bem como para o acompanhamento do tratamento da PCM, baseando-se na detecção de anticorpos circulantes no soro dos pacientes. Entretanto, esse tipo de análise nem sempre é possível, principalmente para casos em que o paciente apresenta imunossupressão, na qual os níveis de anticorpos estão muito baixos ou até mesmo ausentes. Além disso, as técnicas sorológicas podem apresentar resultados que não correspondem à clínica do indivíduo, como é o caso da aplicação das mesmas em amostras de indivíduos doentes que já foram tratados. Nesse caso, os anticorpos podem permanecer no soro do paciente por muitos meses depois, o que dificulta a diferenciação entre uma infecção recente, uma recidiva, ou apenas reminiscências de uma infecção anterior (SAN-BLAS; NIÑOVEGA; ITURRIAGA, 2002).

Além de técnicas sorológicas, técnicas moleculares também vêm ganhando

espaço entre os diferentes métodos de diagnóstico para PCM, objetivando principalmente a identificação e diferenciação entre espécies fúngicas (GOLDANI; MAIA; SUGAR, 1995; GOMES et al., 2000; SANDHU et al., 1997). Por exemplo, Nested PCR tem sido uma técnica desenvolvida para detectar fragmentos de DNA específicos de *P. brasiliensis*, tendo como alvo uma sequência do gene do principal antígeno desse patógeno, a glicoproteína gp43 (43kDa) (BIALEK et al., 2000). Embora sejam técnicas ainda não implementadas para o diagnóstico laboratorial de rotina da PCM, apresentam grande potencial para tal, entretanto são procedimentos dispendiosos e que demandam pessoal treinado e altamente capacitado para a execução dos mesmos.

Com base nas pesquisas que vêm sendo realizadas, é possível afirmar que a caracterização molecular dos fungos patogênicos do gênero *Paracoccidioides spp.* com a utilização de ferramentas ômicas é de grande importância para a identificação de moléculas chave e vias metabólicas características desses patógenos. A partir dessas elucidações é possível traçar formas de: i) interferir no curso da infecção, melhorando os medicamentos disponíveis; e até mesmo ii) aprimorar os métodos diagnósticos que vêm sendo desenvolvidos, a partir da identificação de moléculas mais específicas. Para isso, um dos campos de pesquisa que vêm ganhando espaço na área da saúde é a metabolômica.

O DNA e suas respectivas sequências de pares de bases nitrogenadas, já estão bem esclarecidas e existe um enorme número de genomas que estão disponíveis ao domínio público. Sendo assim, os pesquisadores atualmente buscam fazer a conexão dos genes com as suas respectivas funções, relacionando assim o genótipo com o fenótipo. A necessidade de compreender a função dos genes descobertos recentemente fomentou a análise sistemática dos graus de expressão

de RNAm, proteínas e metabólitos, e o catalogamento total destes componentes originou vários “OMAs” (genoma, proteoma e metaboloma). A compreensão desses componentes bem como de suas interações permite analisar os sistemas biológicos e a partir desta análise é possível avaliar a condição atual dos indivíduos e estágios de doenças (KIM et al., 2016).

O estudo completo do metaboloma ou seja, intermediários de baixo peso molecular, não proteicos, sintetizados endogenamente e que estão presentes em uma célula representando o produto final da expressão gênica é denominado Metabolômica. Assim, a partir deste estudo surgiram subáreas como a glicômica e a lipidômica (HARKEWICZ; DENNIS, 2011). Ao estudar o ponto mais próximo ao fenótipo, a metabolômica se desenvolve como uma ferramenta funcional da genômica. Sendo assim, combinando a metabolômica, genômica, transcriptômica e proteômica podemos fornecer uma excelente série de ferramentas que permitem estudar as mudanças fenotípicas (NAVAS-IGLESIAS; CARRASCO- PANCORBO; CUADROS-RODRÍGUEZ, 2009).

Muitos esforços para catalogar “omas” enfatizam células eucarióticas ou modelos comuns de organismos como *Escherichia coli*. Patógenos clinicamente importantes, com genomas que se diferenciam substancialmente destes dois modelos, estão começando a ser categoricamente sistematizados incluindo *Candida albicans*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma spp.*, *Leishmania donovani* e *Mycobacterium tuberculosis* (LAYRE; BRANCH MOODY, 2013). Os diferentes metabólitos presentes em cada um dos patógenos abrem novos campos de investigação para a metabolômica. Uma investigação sistemática dos metabólitos particulares que diferenciam os patógenos de espécies relacionadas permite a identificação de marcadores chave que podem vir a ser utilizados em exames

diagnósticos (LAYRE; BRANCH MOODY, 2013; LOIZIDES-MANGOLD, 2013).

Um dos estudos mais recentes em metabolômica na área da saúde foi o estudo com imprinting de pele de pacientes com hanseníase, no qual se identificaram moléculas lipídicas diferentes em comparação com a pele de indivíduos saudáveis (LIMA et al., 2015). Nesse caso, os pesquisadores conseguiram identificar uma molécula proveniente do principal antígeno específico de *Mycobacterium leprae*, a molécula Phtiocerol (parte do antígeno PGL1_phenolic glycolipid-I). O próximo passo do estudo é a validação da molécula como marcador específico e de fácil identificação em indivíduos em diferentes fases da doença.

Dentre os estudos em Paracoccidioidomicose para identificação de biomarcadores, um trabalho brasileiro apresentou associação de análises metabolômicas e aprendizado de máquina, no qual foram selecionados 15 biomarcadores, dentre eles uma micotoxina, esfingolipídeos, triacilgliceróis e prenil lipídeos, os quais, em conjunto apresentam potencial para diagnóstico da doença. Entretanto, o trabalho sugere o uso de técnicas avançadas de Inteligência artificial, o que para aplicação rápida e de ampla abrangência pode não ser tão acessível quanto um teste rápido (LIMA et al., 2020).

Portanto, a partir de estudos de metabolômica é possível aprimorar o conhecimento molecular em relação a diferentes tipos de doenças, dentre elas doenças infecciosas, nas quais o patógeno pode apresentar moléculas próprias e diferenciais em relação ao hospedeiro. Assim, abrem-se novas perspectivas para o diagnóstico, bem como o tratamento de diferentes doenças, principalmente aquelas negligenciadas, que precisam de mais atenção em países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil.

2. JUSTIFICATIVA

A paracoccidioidomicose (PCM), micose que pode atingir elevados índices de letalidade, pode ter seu diagnóstico clínico confundido com outros processos infecciosos e ter seu tratamento realizado de forma não assertiva. Embora existam novas metodologias diagnósticas sendo desenvolvidas, o método considerado padrão-ouro ainda é baseado na visualização e identificação de estruturas fúngicas em amostras do paciente, cuja sensibilidade e especificidade deixam a desejar. Deve-se portanto abrir novas possibilidades para o desenvolvimento de métodos mais sensíveis e específicos. Dessa forma, a caracterização de moléculas típicas da doença a partir de amostras biológicas de fácil acesso pode auxiliar no desenvolvimento de um método diagnóstico rápido e mais preciso, possibilitando o tratamento correto e mais rápido do indivíduo, o que leva à redução da letalidade e melhora da qualidade de vida do paciente.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Análise de biomarcadores de baixo peso molecular diferencialmente expressos em indivíduos infectados com *Paracoccidioides spp.* visando aplicação futura em técnicas diagnósticas.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Identificação de biomarcadores presentes em amostras de pacientes com paracoccidioidomicose, diferencialmente expressos quando em comparação com indivíduos saudáveis;

3.2.2. Avaliação do potencial diagnóstico dos biomarcadores mais discriminantes do grupo com Paracoccidioidomicose.

4. Referências

Almeida F., Lacaz C. S. Dados estatísticos sobre a granulomatose paracoccidióica (blastomicose sul-americana ou paracoccidioidomicose). **RevBras Med.**, 3 (2), 91–94, (1946).

Ambrósio A. V. A., et al. Paracoccidioidomicose (doença de Lutz-Splendore-Almeida): propedêutica complementar, diagnóstico diferencial, controle de cura. **Rev Médica Minas Gerais** 24, 81–92 (2014). <https://doi.org/10.5935/2238-3182.20140021>.

Bava, A. J. et al. Lymphocyte Subpopulations and Cytokine Production in Paracoccidioidomycosis Patients. **Microbiology and Immunology**, 35 (3), 167– 174 (1991).

Benton H. P., et al. An interactive cluster heat map to visualize and explore multidimensional metabolomic data. **Metabolomics** 11, 1029–34 (2015).

Bialek, R. et al. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a nestedPCR assay. **Journal of clinical microbiology**, 38 (8), 2940–2 (2000).

Blotta, M. H.; Camargo, Z. P. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Journal of clinical microbiology**, 31 (3), 671–6 (1993).

Borges-Walmsley, M. I. et al. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends in Microbiology**, 10 (2), 80–87 (2002).

Brasil. Ministério da Saúde, Governo Federal. Paracoccidioidomicose. Publicado em 20/11/2020 17h01 Atualizado em 19/04/2022 15h57. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/p/paracoccidioidomicose-1#:~:text=O%20que%20%C3%A9%20Paracoccidioidomicose%3F,cr%C3%B4nicas%20e%20recorrentes%2C%20no%20pa%C3%ADs> Acesso em 31 mai 2022.

Brummer, E. et al. Paracoccidioidomycosis: an Update. **Clinical Microbiology Reviews**, 6 (2), 89–117 (1993).

Camargo M. E., et al. Immunoenzymatic absorption test for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol** 20, 103–8 (1984).

Cano L. E., Restrepo A. Predictive value of serologic tests in the diagnosis and follow-up of patients with paracoccidioidomycosis. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 29, 276–83

(1987). <https://doi.org/10.1590/S0036-46651987000500003>.

Carbonell, L. M.; Rodriguez, J. Mycelial Phase of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitidis*: an Electron Microscope Study 37 Downloaded from **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**. [s.l: s.n.]. Disponível em: . Acesso em: 4 jan. 2020.

Cocchi M, et al. Chemometric Methods for Classification and Feature Selection. **Compr. Anal. Chem.**, 82, Elsevier; 265–99 (2018). <https://doi.org/10.1016/BS.COAC.2018.08.006>.

Coutinho, Z. F., et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). Cad Saúde Pública / Ministério Da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, **Esc Nac Saúde Pública** 18, 1441–54 (2002). <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2002000500037>.

de Camargo Z. P., et al. Simplified method for producing *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for use in immunodiffusion tests. **Med Mycol** 41,539–42 (2011).

de Camargo, Z. et al. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. **Journal of clinical microbiology**, 26 (10), 2147–51 (1988).

de Camargo, Z. P. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the paracoccidioidomycosis - Comparison with counterimmunoelectrophoresis and erythro-immunoassay. **Mycopathologia**, 88 (1), 31–37 (1984).

de Camargo, Z. P. et al. Simplified method for producing *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for use in immunodiffusion tests. **Medical Mycology**, 41 (6), 539–542 (2003).

de Matos, W. B. et al. Paracoccidioidomycose no Estado do Maranhão, Brasil: Aspectos geográficos e clínicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 45 (3), 385–389, (2012).

de Melo Teixeira, M. et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: Biological and clinical implications. **Medical Mycology**, 52 (1) 19–28 (2014).

Del Negro G. M., Garcia N. M., et al. The sensitivity, specificity and efficiency values of some serological tests used in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 33, 277–80 (1991). <https://doi.org/10.1590/S0036-46651991000400006>.

Denning, D. W.; Bromley, M. J. How to bolster the antifungal pipeline. **Science**, 347 (6229), 1414–1416 (2015).

Ferreira-da-Cruz, M. F. et al. Study of antibodies in paracoccidioidomycosis: Follow-up of patients during and after treatment. **Medical Mycology**, 28 (2), 151– 157 (1990).

Franco, M.; San-Blas, G. Biochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* Dimorphism. In: **Paracoccidioidomycosis**. [s.l.] CRC Press, 49–66 (1994).

Franco, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis **Medical Mycology** (1987). Disponível em: . Acesso em: 4 jan. 2020

Forjaz, M. H. et al. Paracoccidioidomycosis in Brazilian Indians of the Suruí tribe: clinical-laboratory study of 2 cases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 32 (5), 571–575, (1999).

Goldani, L. Z.; Maia, A. L.; Sugar, A. M. Cloning and nucleotide sequence of a specific DNA fragment from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, 33 (6), 1652–1654 (1995).

Gomes, G. M. et al. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, 38 (9), 3478–3480 (2000).

Héberger K. Chemoinformatics-multivariate mathematical-statistical methods for data evaluation. **Med Appl Mass Spectrom** 141–69 (2008). <https://doi.org/10.1016/B978-044451980-1.50009-4>.

Hoo Z. H., et al. What is an ROC curve? **Emerg Med J** 34, 357–9 (2017). <https://doi.org/10.1136/EMERMED-2017-206735>.

Kamikawa, C. K.; Vicentini, A. P. Dot-Blot Methodology for Rapid Diagnosis of Paracoccidioidomycosis Caused by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Infectious Diseases & Therapy**, 3 (6) (2015).

Kim, S. J. et al. Understanding metabolomics in biomedical research. **Endocrinology and Metabolism**, 31 (1), 7–16 (2016).

Harkewicz, R.; Dennis, E. A. Applications of Mass Spectrometry to Lipids and Membranes. **Annual Review of Biochemistry**, 80 (1), 301–325, (2011).

Layre, E.; Branch, D. Lipidomic profiling of model organisms and the world's major pathogens **Biochimie Elsevier B**, 2013.

Lima, E. D. O. et al. Skin Imprinting in Silica Plates: A Potential Diagnostic Methodology for Leprosy Using High-Resolution Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, 87 (7), 3585–3592 (2015).

Lima, E. A. et al. Metabolomics and Machine Learning Approaches Combined in Pursuit for More Accurate Paracoccidioidomycosis Diagnose. **American society of microbiology**, 5, (3), (2020).

Loizides-Mangold, U. On the future of mass-spectrometry-based lipidomics **FEBS Journal**, (2013).

Londero, A. T. Paracoccidioidomycose: I. Patogenia, formas clínicas, manifestações pulmonares e diagnóstico **J. pneumol**, 41–57 (1986).

Lutz, A. Uma micose pseudococídica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hifoblastomicoses americanas. **Brasil Med**, 22, 121–124, (1908).

Maresca, B.; Kobayashi, G. S. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. **Contributions to microbiology** (2000).

Martinez, R. Paracoccidioidomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease Paracoccidioidomycose: a dimensão do problema de uma doença negligenciada. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 43 (4), 2010 (2010).

Martinez, R. Epidemiology of paracoccidioidomycosis. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, 57 (19), 11-20 (2015).

Matute, D. R. et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Molecular Biology and Evolution**, 23 (1), 65–73, (2006).

Mcewen, J. G. et al. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **Medical Mycology**, 25 (3), 165–175, (1987).

Melo C. F. O. R., et al. Serum metabolic alterations upon ZIKA infection. **Front Microbiol** 8, (2017) <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01954>.

Melo C. F.O.R., et al. Corrigendum: Serum metabolic alterations upon Zika infection [Front. Microbiol., 8, (2017) (1954)] doi: 10.3389/fmicb.2017.01954. **Front Microbiol** 2017;8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02373>.

Mendes R. P., et al. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. vol. 11. (2017). <https://doi.org/10.2174/1874285801711010224>.

Moreira, A. P. V. Paracoccidioidomicose: histórico, etiologia, epidemiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos. **Boletim Epidemiológico Paulista**, 5, 11–24 (2008).

Moreto T. C., et al. Accuracy of routine diagnostic tests used in paracoccidioidomycosis patients at a university hospital. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 105,473–8 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.03.001>.

Moscardi-Bacchi, M.; Brummer, E.; Stevens, D. A. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: Inhibition by activated phagocytes. **Journal of Medical Microbiology**, 40 (3), 159– 164 (1994).

Navas-Iglesias, N.; Carrasco-Pancorbo, A.; Cuadros-Rodrigues, L. From lipids analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. **Part II: Analytical lipidomics. TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, 28 (4), 393–403 (2009).

Pires de Camargo, Z.; de Franco, M. F. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Revista Iberoamericana de Micologia**, (2000).

Polo T. C. F., Miot H. A. Aplicações da curva ROC em estudos clínicos e experimentais. **J Vasc Bras** 19, 1–4 (2020). <https://doi.org/10.1590/1677-5449.200186>.

Restrepo, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia**, 23 (5), 323–34 (1985).

Restrepo, M. A.; Moncada, L. H. Una prueba de latex en lamina para el diagnóstico de la paracoccidioidomicosis. **Bol.Of. Sanit.Panam.**, 84, 520–531 (1978).

San-Blas, G.; Niño-Vega, G.; Iturriaga, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: Molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Medical Mycology**, 40 (3), 225–242 (2002).

Sandhu, G. S. et al. Molecular detection and identification of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of clinical microbiology**, 35 (7), 1894–6 (1997).

Shikanai-Yasuda M. A., et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Rev Soc Bras Med Trop** 50, 715–40 (2017). <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0230-2017>.

Shikanai-Yasuda M. A., et al. Consenso em paracoccidioidomicose Guideliness in paracoccidioidomycosis. **Rev Soc Bras Med Trop** 39, 297–310 (2006).

Silva-Vergara, M. L. et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Medical Mycology**, 38 (3), 193–199, (2000).

Šimundić A-M. Measures of Diagnostic Accuracy: Basic Definitions. **EJIFCC** 19, 203–11 (2009).

Taborda, C. P.; Camargo, Z. P. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by dot immunobinding assay for antibody detection using the purified and specific antigen gp43. **Journal of clinical microbiology**, 32 (2), 554–6 (1994)

Tapia, F. J. et al. Leukocyte immunophenotypes in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood of paracoccidioidomycosis, sarcoidosis and silicosis. **Histology and Histopathology**, 6 (3), 395–402 (1991).

Teixeira, M. M. et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 52 (2), 273– 283 (2009).

Theodoro, R. C. et al. Genus *Paracoccidioides*: Species Recognition and Biogeographic Aspects. **PLoS ONE**, 7 (5), e37694 (2012).

Villa, L. A. et al. Central nervous system paracoccidioidomycosis. Report of a case successfully treated with itraconazol. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, 42 (4), 231–234 (2000).

Wanke, B.; Aidé, M. A. Capítulo 6 - paracoccidioidomicose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, 35 (12), 1245–1249 (2009).

CAPÍTULO 2

Title: Serum biomarkers profile as potential diagnostic tools for human paracoccidioidomycosis

Authors: Izabella Cristina Mastromoro^a, Camila Mika Kamikawa^b, Rodrigo Ramos Catharino^c, Adriana Pardini Vicentini^b, Estela de Oliveira Lima^a

^a Department of Internal Medicine, Botucatu Medical School, São Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil

^b Laboratory of Mycosis Immunodiagnosis—Immunology Section, Adolfo Lutz Institute, São Paulo, SP, Brazil

^c Innovare Biomarkers Laboratory, School of Pharmaceutical Sciences, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

Corresponding author: Estela de Oliveira Lima

Highlights:

- Paracoccidioidomycosis serum metabolites detected by metabolomics;
- A set of 9 biomarkers provided a ROC curve with AUC = 0.962;
- The 2 most discriminant biomarkers presented an accuracy of over 90%;
- Unveiled 2 serum biomarkers with high potential as targets for diagnosis.

Abstract

Background: Paracoccidioidomycosis might be frequently misdiagnosed, once the main diagnostic methods are direct microscopy and serological techniques, whose accuracy leaves to be desired. Therefore, there is an urgency for more accurate diagnostic methods.

Methods: Human serum samples from Paracoccidioidomycosis patients (PB group) and healthy volunteers were submitted to preparation and analysis through high-resolution mass spectrometry. These data were statistically evaluated with multivariate analysis of PLS-DA and VIP scores. For each elected biomarker it was proposed corresponding metabolites using METLIN database and literature review. A heatmap was also designed to observe the distribution of each biomarker according to the subject condition. In addition, a ROC curve and its confusion matrix were built with the most important biomarkers.

Results: From the analysis, 9 serum biomarkers were elected for PB group, represented by mass/charge ratios of: 909.7, 565.6, 623.3, 567.1, 910.7, 663.6, 959.7, 666.5, 621.3. The ROC curves showed accuracies of 98.1% and 96.2% when tested with these 9 biomarkers and the 5 most important, respectively, showing sensitivity above 85% and specificity above 94%.

Conclusions: Considering the necessity for more assertive diagnostic methods in paracoccidioidomycosis, we present new serum biomarkers highly accurate in discriminating infected individuals, which represent potential serum diagnostic markers for paracoccidioidomycosis.

Keywords: Paracoccidioidomycosis, Serum biomarkers, Diagnosis, Mass spectrometry.

1. Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM) consists of an infection caused by a dimorphic fungus from the *Paracoccidioides* genus and manifests itself mainly as a pneumopathy associated with cutaneous and mucosal lesions which might progress to systemic disease, with granulomatous injuries. If untreated, the infection can lead to the development of severe and even lethal conditions, affecting lungs, skin, lymphoid organs, and liver [1].

Epidemiological data show that PCM is an endemic disease in Latin American countries and the most affected countries are Brazil, Colombia, Venezuela, and Argentina. Brazil is responsible for about 80% of these infections, which are concentrated especially in the south, southeast, and center-west regions. To this date, the notification of PCM cases in Brazil is not mandatory, what hinders an accurate epidemiological analysis of its exact prevalence in the country [2]. Considering Brazil's economy is strongly based on agriculture, it's important to evaluate the correlation between PCM incidence and *Paracoccidioides* spp. mechanism of infection. The main risk factor for infection is the management of soil, especially associated with professional activity in agriculture. Handling contaminated soil contributes to the infection of rural workers in endemic areas, generally aged between 30 and 60 years, and 90% of those affected are male [3].

The diagnostic method considered the gold standard for PCM consists of the direct microscopic visualization, identification and isolation of fungal cells characteristic of *Paracoccidioides* spp. However, this analysis can lead to misdiagnosis, since the fungal forms can be confused with other pathogens due to fungal morphology similarity to other species, which hinders the correct identification and diagnosis [4]. There is still the indirect diagnosis through serological tests, which present low sensitivity and may also be affected by cross reactions with other fungi, such as *Aspergillus* spp. and *Histoplasma* spp [5,6].

In face of the actual diagnostic scenario, it is important to unveil new PCM biomarkers that present potential to be used in more accurate and new diagnostic approaches, especially from less invasive biological sources, such as blood. The present work aimed to achieve a PCM biomarkers profile from serum samples through metabolomics analysis. For that, high-resolution mass spectrometry was the technique of choice, and it provided 9 potential biomarkers which presented accuracy of over 95%, showing that the proposed technique was able to elucidate new PCM biomarkers in serum samples with high indexes of sensitivity and specificity. Thus, the results corroborates that the use of metabolomics is of great importance for the identification of key molecules of fungal infections, such as

paracoccidioidomycosis, and new perspectives are opened for diagnosis, which need more attention in Latin America countries, especially Brazil.

2. Materials and Methods

2.1. Participants and ethics

The work was conducted 10 healthy volunteers (Control Group - CT) and 25 patients with Paracoccidioidomycosis previously diagnosed and evaluated by serological method, from the serum bank of the Adolfo Lutz Institute. The subjects were selected from both sexes and aged between 18 and 80 years.

2.2. Sample collection and preparation

Total blood was collected in EDTA-coated tubes, centrifuged at 3,000 rpm, for 5 minutes; next, serum aliquots were stored at -80°C until use. Previously the analysis, serum samples were thawed to ambient temperature and then, 20 μL of each serum sample was diluted in a mixture of Tetrahydrofuran (200 μL) and Methanol (780 μL), homogenized, and centrifuged 3,500 rpm (5 minutes). Next, 50 μL of the supernatant was solubilized into Methanol (q.s. 500 μL), homogenized and submitted to chemical ionization with formic acid (0.1%), according to Melo et al., 2017 [7,8].

2.3. Mass spectrometry and data analysis

After preparation and ionization, samples were directly injected by an electro-spray ionization (ESI) source and analyzed by an ESI-LTQ-XL-Orbitrap Discovery mass spectrometer (Thermo Scientific), with mass range of 500 – 1000 m/z , analyzed in the positive ion mode. The mass spectrometry analysis was performed in partnership with the Innovare Biomarkers Laboratory from the University of Campinas - UNICAMP.

The mass spectrometric data were extracted in format of mass/charge ratio (m/z) according to relative abundance, which was submitted to statistical analysis using the online platform MetaboAnalyst 4.0 (<https://www.metaboanalyst.ca>). Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA) and VIP scores (Variable Importance in Projection) were the statistical metrics used to select the 10 most discriminant chemical markers (m/z values) between CT and PB groups. For that it was established a threshold of VIP Score > 2.5 . The distribution of the selected biomarkers in the different groups was evaluated through a heatmap, built using Ward's algorithm and the Euclidean distance calculation.

Intending to select biological candidates for each elected biomarker, METLIN (Mass Spectral Database) and Lipid Maps were the free online databases used to identify

metabolites from mass/charge values and possible associated adducts, with a threshold error limit of 10 ppm.

All the most important selected PCM markers were submitted to ROC curve analysis, built according to the linear support vector machine (SVM) algorithm. Initially, all the selected biomarkers were tested altogether, and next, different combinations were tested to identify the most important ones. On these analyses it was possible to calculate AUC (Area Under the Curve), sensitivity and specificity, what guided us to define the best potential candidates for PCM diagnosis from now on.

3. Results

3.1 PB and CT groups comparative analysis for discrimination of biomarkers

Figure 1 shows the Scores plot obtained from the PLS-DA analysis, in which is possible to observe the clear distinction between CT and PB groups, what indicates that the method was able to select discriminant biomarkers for each group. To obtain the most important biomarkers for PB and CT group, VIP score graphic was generated (Supplementary material – Figure S1). Considering VIP score > 2.5, the first 10 biomarkers were selected for each group.

3.2 Biomarkers distribution according to the samples from both groups

To better visualize the distribution of biomarkers according to their frequency in the samples, a heatmap was built (Figure 2). On this graphic, the PB markers show higher intensities in infected samples when compared to CT ones, and the opposite is true for CT biomarkers.

3.3 Biomarkers identification

The biomarkers extraction from the mass spectra was standardized to detect m/z values with the first decimal point. Therefore, the exact masses of each marker were checked on the experimental spectra, where the isotopes were also verified (Table S1), and then the exact mass for each m/z value was defined, as shown in Table 1. After the verification of exact experimental mass to define the biological molecule with greater assertiveness, we could propose some identifications for each m/z value, except for the biomarkers represented by $m/z = 621.3$, $m/z = 666.5$, $m/z = 974.6$ and $m/z = 689.1$, which were considered unknown (Table 1). The 7 CT group biomarkers that we could identify are

represented by 2 Sterols (Cholesterol and Steryl ester), 4 Glycerophospholipids and 1 peptide. Differently, the PB group presented increased diversity of metabolic categories, where we could observe 1 very long chain Fatty acid/ester, 1 Peptide, 1 Glycerolipid composed containing odd chain fatty acids, 1 Glycerophospholipid, 2 Sterols (Sterol sulfate and Ergosterols) and 1 Prenol lipid.

3.4 Biomarkers' accuracy analysis

A first ROC curve was built with all the 9 PB biomarkers, excluding the isotope $m/z = 622.3$, and it is demonstrated by Figure 3. Through this analysis it was possible to identify the sensitivity and specificity for the markers, allowing the analysis of those abundantly expressed in the PB group. The area under the curve represents the accuracy of the tested markers.

In this first analysis performed through the ROC curve (Figure 3 A), the AUC obtained corresponded to 0.981 (95% CI: 0.946 - 0.998), what demonstrates high accuracy and indicates the 9 selected markers present good diagnostic performance. The confusion Matrix allowed the calculation of sensitivity and specificity values, corresponding to 92% and 96%, respectively.

Aiming to reduce the number of targets for disease prediction, new evaluations of accuracy were performed, and we tested different combination of biomarkers. First, the authors choose to evaluate the first five most discriminant markers from PB group. For this, a new ROC curve was built, as shown in Figure 3 B, with the following biomarkers: 909.7, 565.6, 623.3, 567.1 and 910.7. In this second analysis, the AUC presented a result of 0.962 (95% CI: 0.934 - 0.986), sensitivity of 86% and specificity of 94%, demonstrating good accuracy, even with fewer biomarkers.

Next, we evaluated the minimal number of biomarkers among the 5 most discriminant ones which were able to present the best accuracy (Figure 4). Each biomarker was evaluated isolated or in combination, and the best isolated biomarkers were represented by m/z 567.1 and 565.6, with AUC of 0.845 and 0.811, respectively (Figure 4d and 4b). Therefore, we performed ROC curve test with these last 2 biomarkers and obtained an AUC of 0.918 (95% CI 0.862 – 0.961), as exposed in figure 4f. Intending to confirm the significance of these two molecules, we generated their graphical relative quantitation, according to the imputed values of m/z and respective abundancies from the mass spectral data (Figure 5).

4. Discussion

Considering PCM importance, especially in low-income countries, it is observed that there is an urgent demand for more assertive, faster, and cost-effective techniques. The gold-standard method traditionally applied, the direct optical microscopy, has left to be desired in parameters of sensitivity (74.5%) and specificity (hard to define due to the morphological similarity with other fungi) [9,4]. Besides microscopy, some serological tests have been considered, such as the complement fixation test, whose sensitivity rate can range from 69.5% to 93% and specificity also ranges from 96.7% to 100%; however, it presents a high rate of cross-reactivity and complexity to perform [10,11,12]. Another serological methodology is ELISA, which presents some advantages regarding reagents lastingness and ease implementation; for that, sensitivity reaches values of 96% to 100%, however, the high rate of cross-reactions with histoplasmosis, cryptococcosis, aspergillosis and lacaziosis undermine test' specificity [13,9].

Some proposals are focusing on development of molecular biology-based methods, intending to identify and differentiate fungal species, but these techniques are not standardized for use in diagnostic routines for public health services in endemic areas of PCM [8,4].

Due to the paracoccidioidomycosis diagnostic accuracy issues, in this work we aimed to search for new markers that present potential as targets for more assertive diagnostic tests. To this end, metabolomics was the tool of choice and provided m/z values which, selected by statistical analysis, were able to properly differentiate CT and PB groups, what represents the ability to discriminate healthy and sick individuals [14,15].

The elected biomarkers presented VIP score > 2.5 , what indicates these molecules are important features in discrimination of groups, once it is recommended that markers be able to differentiate groups with at least VIP Score = 1.0 [16]. This importance becomes clear when the Heatmap is observed, once it is clear the differences in abundance found between the markers in the different groups, as well as their distribution in the samples [17].

Considering these differences, the statistical power for each set of biomarkers was calculated through ROC curve analyzes, which is frequently used to assess markers' accuracy according to the parameters of sensitivity and specificity they may exhibit if used in a diagnostic test [18]. As a statistical tool, the objective is to estimate the predictive power of a model ensuring that it can detect the maximum possible amount of true positive results while minimizing false positive results [19]. The AUC value ranges from 0.0 to 1.0, i.e. from 0% to 100%; the higher the AUC, the better the model's classification power [19].

Accordingly, our data showed accuracy extremely high when the 9 PB biomarkers were evaluated together. However, intending to define the better biomarkers for PCM diagnosis propose, the ROC curve tests revealed that a minimum of two specific markers, 567.1 and 565.6, when evaluated together, were responsible for a good accuracy of over 90%.

These results show that, even only 2 biomarkers from the PB group presented an accuracy considered very good, and these metabolites are promising candidates for use in development of new and more assertive diagnostic methods.

5. Conclusion

Considering the demand for more assertive PCM diagnostic methods, this study presents new serum biomarkers identified in paracoccidioidomycosis that presented high accuracy in discriminating infected individuals, with sensitivity and specificity rates relatively high compared to previously used methods. Therefore, this work presented potential molecular targets with high chances of success that, after validation, open new possibilities for their application in development of new diagnostic tests for paracoccidioidomycosis.

Acknowledgments

This work was supported by the Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel (CAPES) and by São Paulo Research Foundation (FAPESP) which provided the fellowship for E.D.O.L. [Grant No. PNPD: 1578388] and for R.R.C. [Process no. 2018/14657-5], respectively.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Author Contributions

EOL and ICM performed mass spectrometry experiments. APV and CMK performed biofluid collection and selection. EOL and ICM analyzed the data, prepared the figures, and wrote the paper. RRC and APV revised the manuscript. R.R.C. provided infrastructure and methodological support. EOL and RRC designed the study, managed the group, and supervised the research.

Funding Source

This work was supported by the Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel (CAPES) and by São Paulo Research Foundation (FAPESP) which provided the fellowship for E.D.O.L. [Grant No. PNPd: 1578388] and for R.R.C. [Process no. 2018/14657-5], respectively.

Ethical Approval statement

The present study was approved by the Ethics Committee on Research of the institutions involved: Sao Paulo State University (Protocol 1.850.251), University of Campinas (Protocol 1.827.470) and Adolfo Lutz Institute (Protocol CTC-IAL 25-N/2021).

6. REFERENCES

- 1 Restrepo, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia*, v.23, n. 5, p. 323–34, out. 1985.
- 2 Lutz, A. Uma micose pseudococídica localizada na boca e observada no Brasil:41 40 contribuição ao conhecimento das hifoblastomicoses americanas. *Brasil Méd*, v. 22, p. 121–124, 1908.
- 3 Coutinho, Z.F. et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980- 1995). *Cadernos de saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública*,v. 18, n.5, p. 1441–1454, 2002.
- 4 Shikanai-Yasuda, M.A. et al. Consenso em paracoccidioidomicose Guideliness in paracoccidioidomycosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39,n. 3, p. 297–310, 2006a.
- 5 Teixeira, M.M. et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 52, n. 2, p. 273– 283, ago. 2009.
- 6 Carbonell, L.M.; Rodriguez, J. Mycelial Phase of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitidis*: an Electron Microscope Study 37 Downloaded from JOURNAL OF BACTERIOLOGY. [s.l: s.n.]. Disponível em: Acesso em: 4 jan. 2020.
- 7 Franco, M.; San-Blas, G. Biochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* Dimorphism. In: *Paracoccidioidomycosis*. [s.l.] CRC Press, 1994. p. 49–66.
- 8 Moreira, A.P.V. Paracoccidioidomicose: histórico, etiologia, epidemiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos. *Boletim Epidemiológico Paulista*, v. 5, p. 11–24, 2008. Schneider, R. Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer. *Cancer*, v. 26, n. 2, p. 419–426, 1970.
- 9 Maresca, B.; Kobayashi, G.S. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. *Contributions to microbiology*, 2000.
- 10 De Melo Teixeira, M. et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: Biological and clinical implications. *Medical Mycology*, v. 52, n. 1, p. 19–28, 2014
- 11 Matute, D.R. et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Molecular Biology and Evolution*, v. 23, n. 1, p. 65–73, jan. 2006.
- 12 Theodoro, R.C. et al. Genus *Paracoccidioides*: Species Recognition and Biogeographic Aspects. *PLoS ONE*, v. 7, n.5, p. e37694, 30 may 2012.
- 13 Denning, D.W.; BROMLEY, M. J. How to bolster the antifungal pipeline. *Science*, v. 347, n.6229, p. 1414–1416, 27 mar. 2015.
- 14 Shikanai-Yasuda, M.A. et al. Consenso em paracoccidioidomicose Guideliness in paracoccidioidomycosis.*Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2018.
- 15 Forjaz, M.H. et al. Paracoccidioidomycosis in Brazilian Indians of the Suruí tribe: clinical-laboratory study of 2 cases. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 32, n. 5, p. 571–575, 1999.
- 16 Almeida, F. Lacaz C.A. Dados estatísticos sobre a granulomatose paracoccidióica (blastomicose sul-americana ou paracoccidioidomicose). *RevBras Med.*, v. 3, n. 2, p. 91–94, 1946.

- 17 De Matos, W.B. et al. Paracoccidioidomicose no Estado do Maranhão, Brasil: Aspectos geográficos e clínicos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 45, n. 3, p. 385–389, maio 2012.
- 18 Franco, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. Medical Mycology, jan. 1987. Disponível em: Acesso em: 4 jan. 2020.
- 19 Silva-Vergara, M.L. et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. Medical Mycology, v. 38, n. 3, p. 193–199, 2000.
- 20 Villa, L.A. et al. Central nervous system paracoccidioidomycosis. Report of a case successfully treated with itraconazol. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 42, n. 4, p. 231–234, 2000.
- 21 Martinez, R. Paracoccidioidomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease Paracoccidioidomicose: a dimensão do problema de uma doença negligenciada. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 43, n. 4, p. 2010, 2010.
- 22 Pires de Camargo, Z.; De Franco, M.F. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. Revista Iberoamericana de Micologia, 2000.
- 23 McEwen, J.G. et al. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. Medical Mycology, v. 25, n. 3, p. 165–175, 1987.
- 24 Bocc, A.L. et al. Paracoccidioidomycosis: Eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. Future Microbiology, set. 2013.
- 25 Marques, S.A. Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical, diagnostic e terapêutica. Annual Brazilian Dermatology, v. 88, n. 5, p. 700–711, 2013.
- 26 Martinez, R. Epidemiology of paracoccidioidomycosis. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v. 57, n. 19, p. 11–20, Sep, 2015.
- 27 Wanke, B.; Aidé, M.A. Capítulo 6 - paracoccidioidomicose. Jornal Brasileiro de Pneumologia, v. 35, n. 12, p. 1245–1249, 2009.
- 28 Londero, A.T. Paracoccidioidomicose: I. Patogenia, formas clínicas, manifestações pulmonares e diagnóstico. J. pneumol, p. 41–57, 1986.
- 29 Bava, A.J. et al. Lymphocyte Subpopulations and Cytokine Production in Paracoccidioidomycosis Patients. Microbiology and Immunology, v. 35, n.3, p. 167–174, mar. 1991.
- 30 Moscardi-Bacchi, M.; et al. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: Inhibition by activated phagocytes. Journal of Medical Microbiology, v. 40, n. 3, p. 159–164, 1994.
- 31 Tapia, F.J. et al. Leukocyte immunophenotypes in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood of paracoccidioidomycosis, sarcoidosis and silicosis. Histology and Histopathology, v. 6, n. 3, p. 395–402, jul. 1991.
- 32 Borges-Walmsley, M.I. et al. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. Trends in Microbiology, v. 10, n. 2, p. 80–87, 2002.
- 33 Brummer, E. et al. Paracoccidioidomycosis: an Update. Clinical Microbiology Reviews, v. 6, n.2, p. 89–117, 1993.
- 34 Restrepo, M.A.; Moncada, L. H. Una prueba de latex en lamina para el diagnóstico de la paracoccidioidomicosis. Bol. Sanit. Panam., v. 84, p. 520–531, 1978.
- 35 Ferreira-da-Cruz, M.F. et al. Study of antibodies in paracoccidioidomycosis: Follow-up of

patients during and after treatment. *Medical Mycology*, v. 28, n. 2, p. 151– 157, 1990.

36 Moreto, T.C. et al. Acurácia dos exames diagnósticos de rotina utilizados em pacientes com paracoccidioidomicose em um hospital universitário. *Transações de royal society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 105, p. 473-478, 2011.

37 De Camargo, Z.P. et al. Simplified method for producing *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for use in immunodiffusion tests. *Medical Mycology*, v. 41, n. 6, p. 539–542, 2003.

38 Kamikawa, C.K.; Vicentini, A.P. Dot-Blot Methodology for Rapid Diagnosis of Paracoccidioidomycosis Caused by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Infectious Diseases & Therapy*, v.03, n. 06, 2015.

39 Taborda, C.P.; Camargo, Z.P. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by dot immunobinding assay for antibody detection using the purified and specific antigen gp43. *Journal of clinical microbiology*, v. 32, n. 2, p. 554–6, fev. 1994.

40 Camargo, M.E. et al. Immunoenzymatic absorption test for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Journal of clinical microbiology*, v. 20, n. 1, p. 103–8, jul. 1984.

41 Blotta, M.H.; 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. 671–6, mar. 1993.

42 San-Blas, G.; et al. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: Molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Medical Mycology*, v. 40, n. 3, p. 225–242, 2002.

43 Goldani, L.Z.; et al. Cloning and nucleotide sequence of a specific DNA fragment from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 6, p. 1652–1654, 1995.

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

45 Sandhu, G.S. et al. Molecular detection and identification of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of clinical microbiology*, v.35, n. 7, p. 1894–6, jul. 1997

46 Bialek, R. et al. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a nested PCR assay. *Journal of clinical microbiology*, v. 38, n.8, p. 2940–2, aug. 2000.

47 Kim, S.J. et al. Understanding metabolomics in biomedical research. *Endocrinology and Metabolism*, v. 31, n. 1, p. 7–16, 2016.

48 Harkewicz, R.; Dennis, E.A. Applications of Mass Spectrometry to Lipids and Membranes. *Annual Review of Biochemistry*, v. 80, n. 1, p. 301–325, 7 jul. 2011.

49 Navas-Iglesias, N.; et al. From lipids analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part II: Analytical lipidomics. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 28, n.4, p. 393–403, 2009.

50 Layre, E.; Branch M. D. Lipidomic profiling of model organisms and the world's major pathogens *Biochimie Elsevier B*, 2013.

51 Loizides-Mangold, U. On the future of mass-spectrometry-based lipidomics. *FEBS Journal*, jun. 2013.

52 Lima, E.D.O. et al. Skin Imprinting in Silica Plates: A Potential Diagnostic Methodology for Leprosy Using High-Resolution Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, v. 87, n. 7, p. 3585–3592, 2015.

53 Lima, E.A. et al. Metabolomics and Machine Learning Approaches Combined in Pursuit for More Accurate Paracoccidioidomycosis Diagnose. *American society of microbiology*, v. 5,

n. 3, mai/jun, 2020.

Figures and captions:

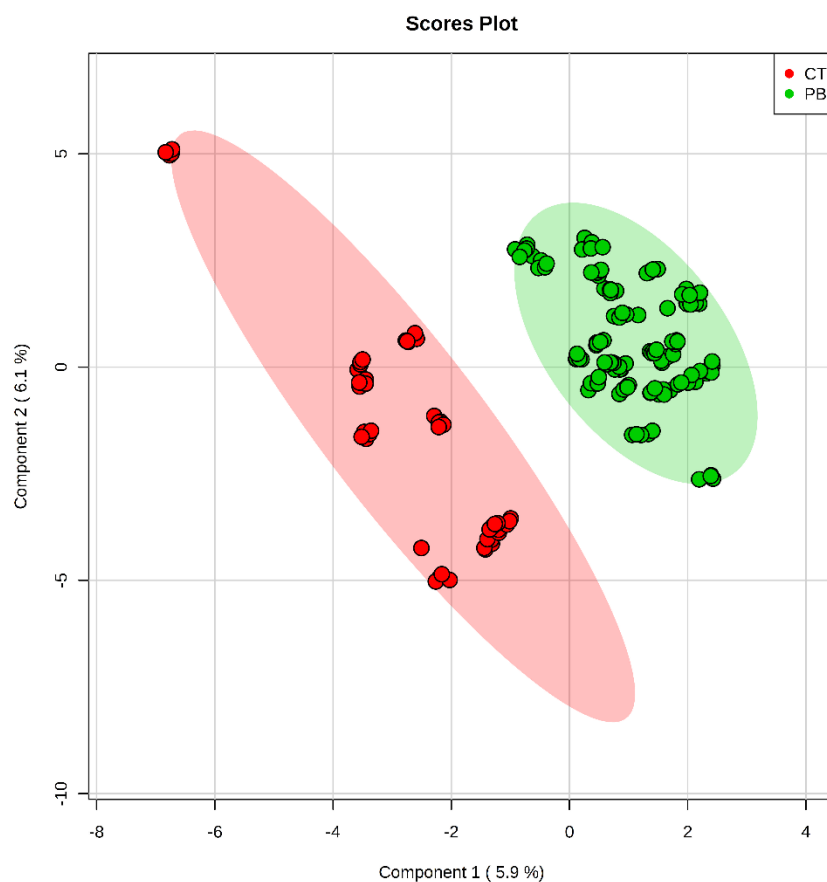


Figure 1: Partial least square-discriminant analysis (PLS-DA) Score plot generated by CT (control group) and PB (paracoccidioidomycosis group) mass spectra data comparison showing clustering of samples from the same group, with data on positive ion mode.

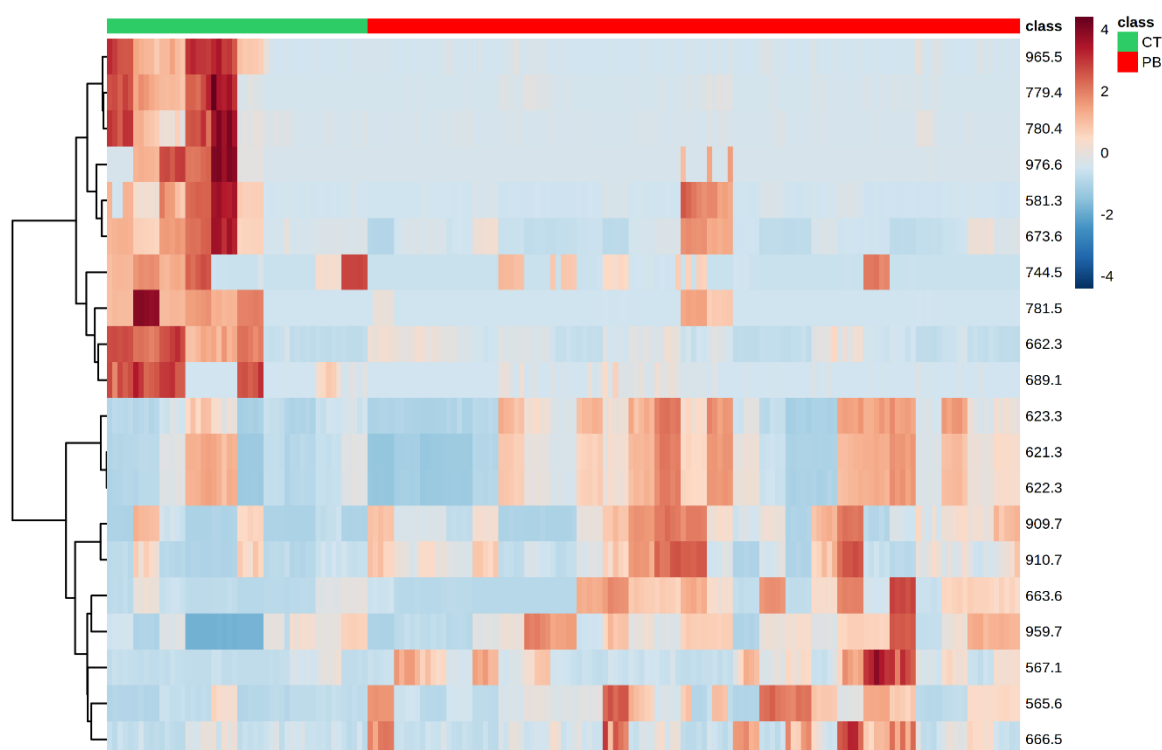


Figure 2: Heatmap presenting the frequency of each marker, including isotopes, according to groups' samples. In general, PB markers are more concentrated in PB samples, and the same is also observed for CT markers.

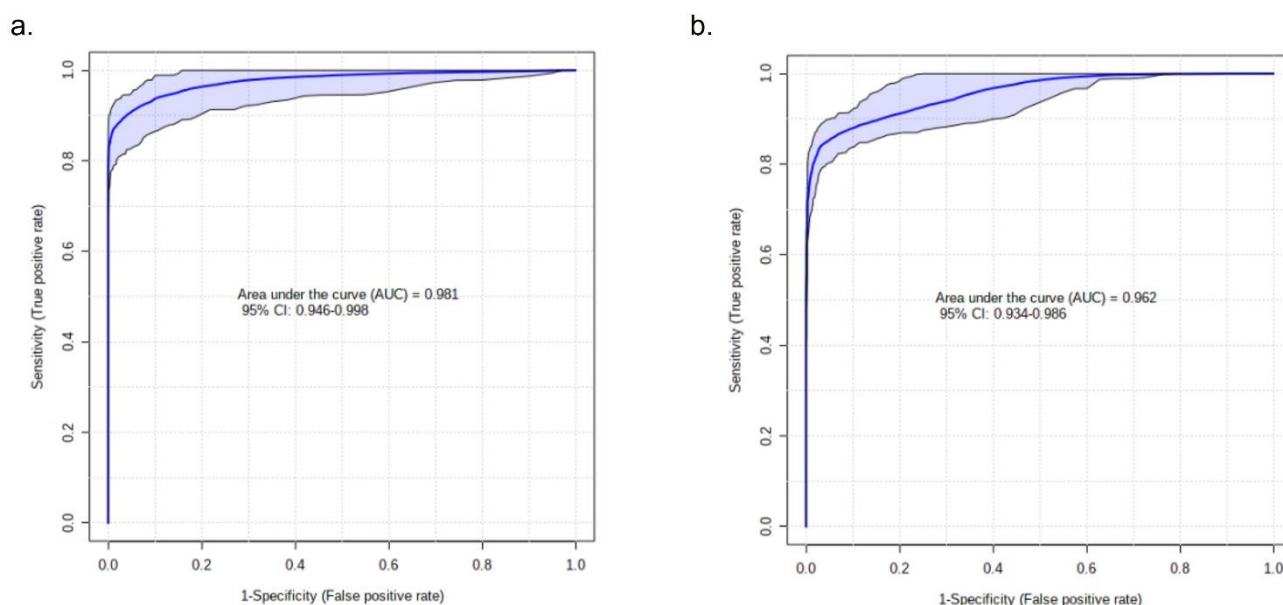


Figure 3: Accuracy analysis of Paracoccidioidomycosis' most discriminant biomarkers through ROC curves testing. (a.) ROC curve generated with the 9 most discriminant PB biomarkers; (b.) ROC curve generated with the 5 most discriminant PB biomarkers.

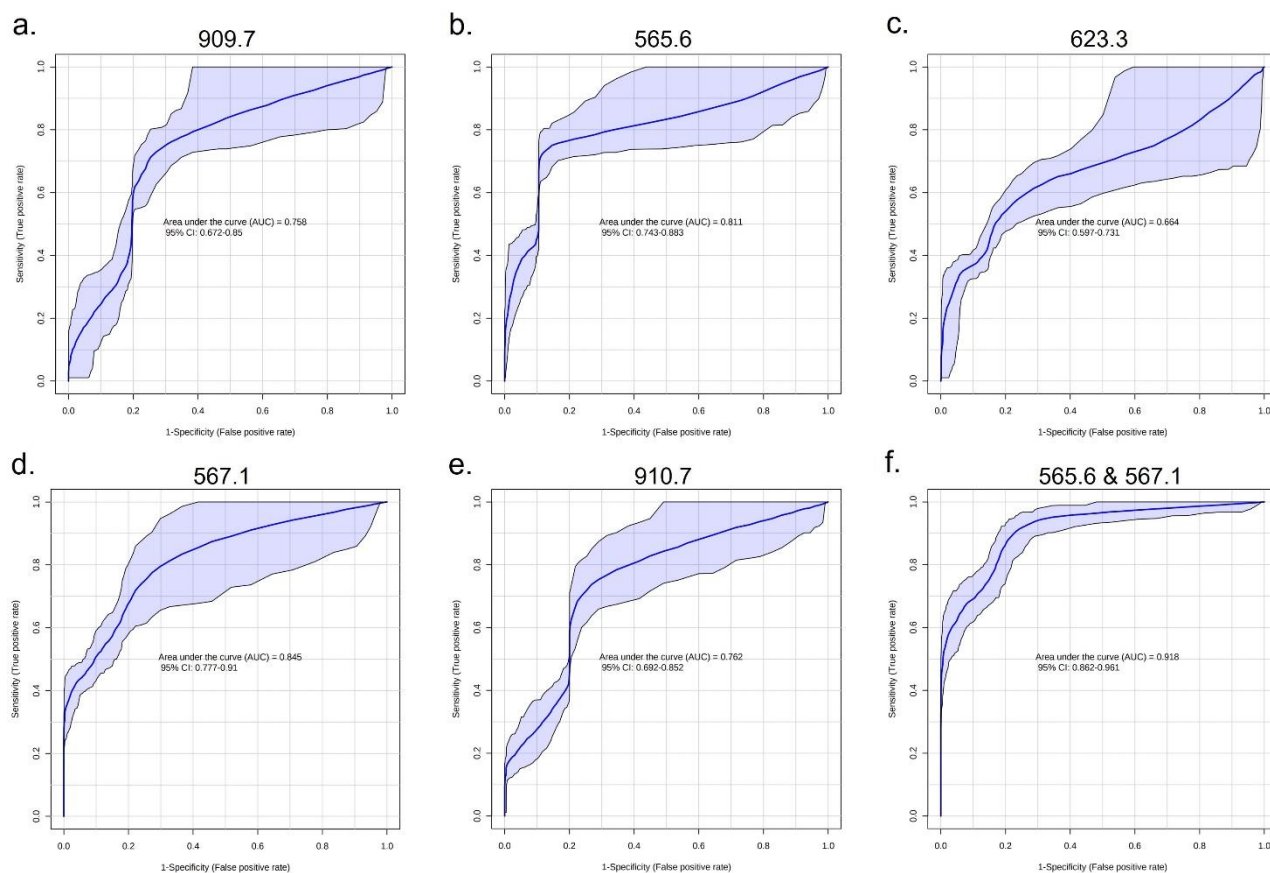


Figure 4: Accuracy analysis of isolated or combined Paracoccidioidomycosis' most discriminant biomarkers through ROC curves testing. ROC curves generated with the following PB biomarkers: (a.) m/z 909.7; (b.) m/z 565.6; (c.) m/z 623.3; (d.) m/z 567.1; (e.) m/z 910.7; (f.) m/z 565.6 and 567.1.

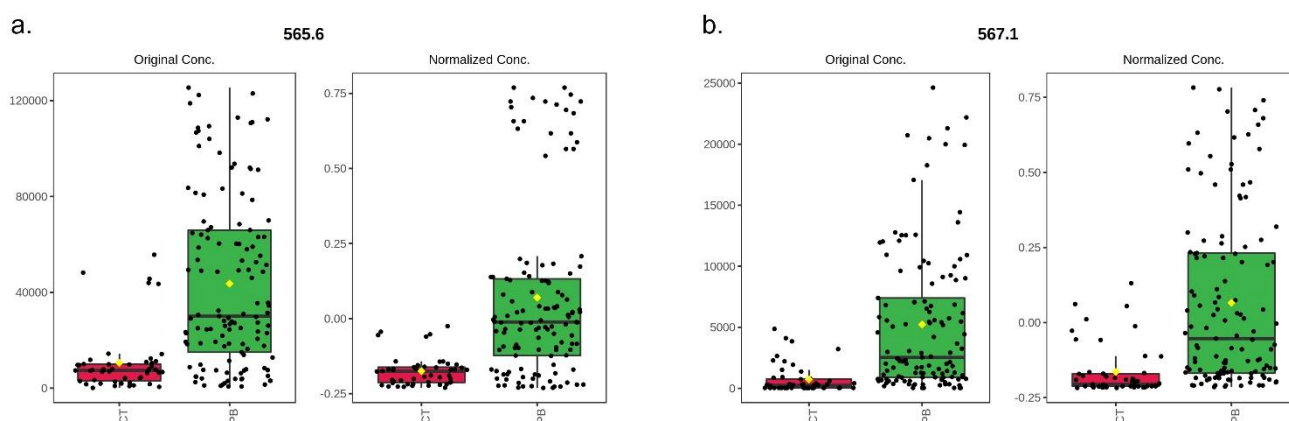


Figure 5. Box plots of the 2 most promising PB diagnostic biomarkers (a. 656.6; b. 567.1) according to original m/z frequency (left box plot) and normalized frequency (right box plot) in samples from both groups (CT: red boxes; PB: green boxes). Yellow diamond (): mean frequency for that biomarker in the correspondent group; Black line: median frequency for that biomarker in the correspondent group.

Tables and captions:

Classification	Exact mass	Theoretical mass	Metabolite	ID	Error (ppm)	Molecular Formula	Adduct	VIP Score	
CT	Sterol	673.6242	673.6287	20:2 Campesterol ester	MID103395	6.68	C ₄₈ H ₈₂ O ₂	[M+H-H ₂ O] ⁺	4.6
			Lanosteryl oleate	MID57688					
	Glycerophospholipid	779.4036	779.4049	PA (40:10)	MID81997	1.66	C ₄₃ H ₆₅ O ₈ P	[M+K] ⁺	4.0
	Unknown	974.6918	-----	-----	-----	-----	-----	-----	3.8
	Unknown	689.1931	-----	-----	-----	-----	-----	-----	3.7
	Glycerophospholipid	965.5918	965.5880	PI (P-42:4)	MID81163	-3.93	C ₅₁ H ₉₁ O ₁₂ P	[M+K] ⁺	3.8
	Peptide	659.3195	659.3188	Lys Trp Tyr Tyr and isomers	MID175078	-1.06	C ₃₅ H ₄₂ N ₆ O ₇	[M+H] ⁺	3.8
	Glycerophospholipid	744.4936	744.4939	PE (P-36:5)	MID62165	0.40	C ₄₁ H ₇₂ NO ₇ P	[M+Na] ⁺	3.4
	Glycerophospholipid	581.3944	581.3925	PC(20:1)	MID39642	-3.26	C ₂₈ H ₅₄ NO ₈ P	[M+NH ₄] ⁺	3.4
Sterol	781.5994	781.5977	16:3-Glc-Cholesterol	MID103345	-2.17	C ₄₉ H ₈₀ O ₇	[M+H] ⁺	3.4	
PB	Fatty Acid	565.5963	565.5918	2,4,6,8-tetramethyl-tetratriacontanoic acid	MID34690	-7.95	C ₃₈ H ₇₆ O ₂	[M+H] ⁺	3.2
				Octatriacontanoic acid	MID4222				
	Fatty ester			Docosyl-palmitate	MID46544				
	Peptide	623.3486	626.3487	Leu Ala Arg Glu Leu	MID264872	0.16	C ₂₆ H ₄₈ N ₈ O ₈	[M+Na] ⁺	3.0
	Glycerolipid	909.6941	909.6943	TGs <i>Odd chain</i>	MID37174	0.21	C ₅₈ H ₉₄ O ₆	[M+Na] ⁺	3.3
	Sterol	567.1490	567.1507	Estriol 3-sulfate 16-glucuronide	MID61671	2.99	C ₂₄ H ₃₂ O ₁₂ S	[M+Na] ⁺	3.0
				MID60254					
	Glycerophospholipid	910.7664	910.7629	PC(46:1)	MID60222	-3.84	C ₅₄ H ₁₀₆ NO ₈ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	2.8
				MID60030					
				MID59999					
	Sterol	663.6051	663.6075	Lanosteryl palmitoleate	MID57689	3.61	C ₄₆ H ₇₈ O ₂	[M+H] ⁺	2.7
			Fecosteryl oleate (ergosterol)	MID57716					
			Episteryl oleate (ergosterol)	MID57712					
	Prenol lipid	958.6945	958.6895	Beta-D-Mannosylphosphodecaprenol	MID66123	-5.21	C ₅₆ H ₉₃ O ₉ P	[M+NH ₄] ⁺	2.7
Unknown	621.3525	-----	-----	-----	-----	-----	-----	2.6	
Unknown	666.5450	-----	-----	-----	-----	-----	-----	2.6	

Table 1: Identification of the selected biomarkers for CT and PB groups Legend: aMETLIN ID; Identification code in METLIN database, # (número de carbonos: ligações duplas). Isomers with the same m/z were excluded. Abbreviations: PA, phosphatidic acid; PI, phosphatidylinositol; PE, phosphatidylethanolamine; PC, phosphatidylcholine; TGs, triacylglycerides.

7. ANEXO I

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Title: Serum biomarkers profile as potential diagnostic tools for human paracoccidioidomycosis

Authors: Izabella Cristina Mastromoro^a, Camila Mika Kamikawa^b, Rodrigo Ramos Catharino^c, Adriana Pardini Vicentini^b, Estela de Oliveira Lima^a

^a Department of Internal Medicine, Botucatu Medical School, São Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil

^b Laboratory of Mycosis Immunodiagnosis—Immunology Section, Adolfo Lutz Institute, São Paulo, SP, Brazil

^c Innovare Biomarkers Laboratory, School of Pharmaceutical Sciences, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

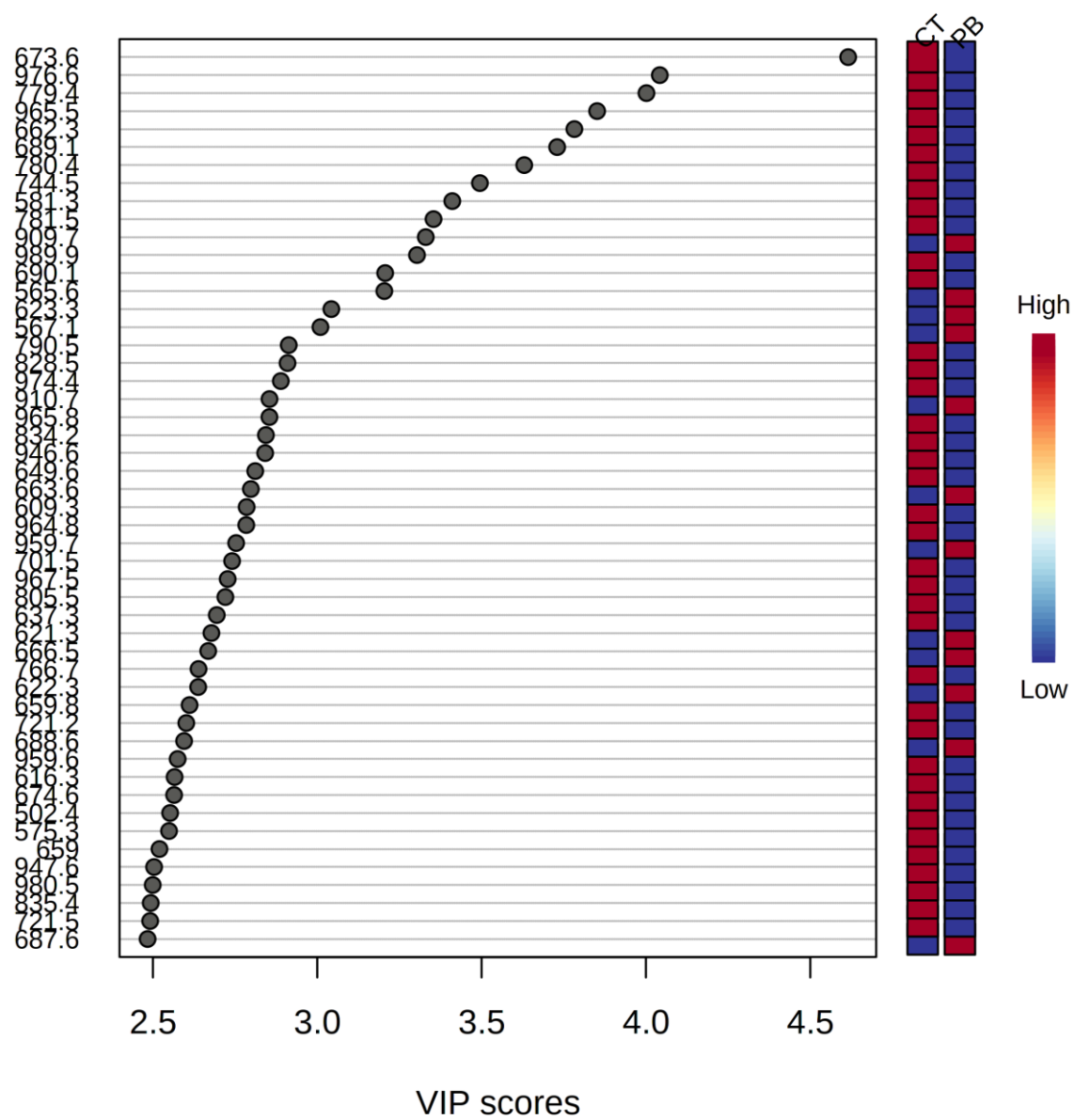


Figure S1: Score plot generated from the analysis of the mass-to-charge ratios detected in the 500-1000 m/z mass range by the PLS-DA method, comparing the CT (control) and PB (paracoccidioidomycosis) groups.

CT		PB	
<i>m/z</i>	Massa Exata	<i>m/z</i>	Massa Exata
673.6	673.6967	909.7	909.7727
976.6*	974.6918	565.6	565.5963
779.4 [#]	<u>779.4036</u>	623.3	623.3486
689.1	689.1931	567.1	567.1490
965.5	965.5918	910.7	910.7664
662.3	662.3288	663.6	663.6051
780.4*. [#]	<u>779.4036</u>	959.7*	958.6945
744.5	744.4936	621.3 [#]	<u>621.3525</u>
581.3	581.3950	666.5	666.5450
781.5	781.5994	622.3*. [#]	<u>621.3525</u>

Table S1: Markers for CT (control) and PB (paracoccidioidomycosis) groups and their corresponding experimental exact masses.

*, Markers' exact mass that corresponds to isotopes;

[#], Selected markers whose isotope is present in the list of markers with VIP Score > 2.5, and whose exact masses correspond to the same biomarker (underlined).