

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**APLICAÇÃO DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM
TRANSFORMADA DE FOURIER PARA DIAGNÓSTICO DA
PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

ALESSANDRA KOEHLER

Porto Alegre

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**APLICAÇÃO DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM
TRANSFORMADA DE FOURIER PARA DIAGNÓSTICO DA
PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

ALESSANDRA KOEHLER

Orientadora: Prof.^a Dra. Maria Lúcia Scroferneker

Coorientador: Prof. Dr. Valeriano Antonio Corbellini

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Porto Alegre

2024

CIP - Catalogação na Publicação

Koehler, Alessandra
Aplicação de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier para diagnóstico da paracoccidioidomicose / Alessandra Koehler. -- 2024. 231 f.
Orientadora: Maria Lúcia Scroferneker.

Coorientador: Valeriano Antonio Corbellini.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. paracoccidioidomicose. 2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier. 3. diagnóstico. 4. titulação de anticorpos. I. Scroferneker, Maria Lúcia, orient. II. Corbellini, Valeriano Antonio, coorient. III. Título.

Tudo depende da hora

Fruto, semente e flor

Mas o sonho de mudar o mundo

Ao menos muda o sonhador

- Humberto Gessinger, em *Estranho Fetiche*

Agradecimentos

À minha orientadora Maria Lúcia Scroferneker, por acreditar no meu potencial e por ter me apresentado a temática da paracoccidiodomicose, assunto pelo qual me apaixonei.

Ao meu coorientador Valeriano Antonio Corbellini, cujo amplo conhecimento na área de espectroscopia no infravermelho me inspirou a seguir nessa área.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da UFRGS, pela oportunidade de realização deste doutorado.

À Universidade de Santa Cruz do Sul, por fornecer espaço físico e estrutura para realização dessa pesquisa.

À Universidade Estadual Paulista (UNESP), em especial ao Dr. Rinaldo Poncio Mendes, que forneceu as amostras necessárias a essa pesquisa.

Aos pacientes do Serviço de Doenças Infecciosas da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), sem os quais este estudo não seria possível.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Ministério da Saúde que, através da Chamada CNPq/MS-SCTIE-Decit Nº 22/2019 (Pesquisas sobre doenças transmissíveis e negligenciadas), financiaram a realização deste estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo.

Aos meus colegas do Laboratório de Fungos Patogênicos do ICBS/UFRGS, pela parceria; em especial, ao meu colega de doutorado Paulo Cezar de Moraes, pela amizade, ajuda e pelos aprendizados em conjunto.

À minha mãe, Margareth Koehler, e à minha irmã, Carolina Koehler, pelo amor e apoio e por sempre estarem me aguardando de braços abertos em Santa Cruz do Sul.

Em especial, agradeço ao meu marido Vilmar Fontanive Junior, meu parceiro de vida, que nunca deixou de acreditar em mim, me incentivando e apoiando ao longo dessa jornada. Sem a sua presença e amor, tudo teria sido muito mais difícil.

Por fim, dedico esta tese a todos os acometidos pela paracoccidiodomicose, para os quais eu desejo que, em um futuro breve, a doença seja mais bem atendida pelas políticas públicas de saúde.

RESUMO

Introdução: a paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose granulomatosa crônica endêmica da América Latina, com maior ocorrência no Brasil. A PCM é causada pelos fungos termodimórficos do gênero *Paracoccidioides*, cujo habitat mais provável é o solo, onde eles se encontram na forma de micélio. A doença é adquirida pela inalação de propágulos fúngicos e, nos pulmões, ocorre a transformação na forma de levedura. A partir dos pulmões, qualquer órgão ou sistema pode ser afetado, pois a PCM é uma doença polimórfica. O “padrão ouro” para diagnóstico é a visualização do fungo em amostras clínicas. A sorologia também é frequentemente utilizada, como ferramenta diagnóstica auxiliar e para classificar a severidade da doença, monitorar a efetividade do tratamento e indicar a cura do paciente. Entretanto, os métodos diagnósticos usuais apresentam limitações.

Objetivo: Desenvolver novos métodos diagnósticos para a PCM baseados em espectroscopia FTIR e análises quimiométricas.

Métodos: Foram analisadas 224 amostras de soro do repositório da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP). Destas, 132 amostras eram de pacientes com PCM, diagnosticados a partir da visualização do fungo em amostras clínicas, além da realização de imunodifusão dupla em gel de ágar (IDD) com titulação de anticorpos. As outras 92 amostras constituíram o grupo controle: 50 amostras de indivíduos saudáveis e 42 amostras de pacientes com outras micoses sistêmicas (24 de aspergilose, 10 de criptococose e 8 de histoplasmose). As amostras foram analisadas no espectrômetro Spectrum 400 FTIR/FTNIR (Perkin-Elmer, Inc., Waltham, USA) acoplado a um acessório de reflectância total atenuada (ATR). Uma alíquota de 1 μL de cada amostra foi depositada no cristal do equipamento, e a leitura foi realizada na forma líquida e na forma desidratada (secagem por 1 minuto em ar corrente a 60-65 °C). Os espectros foram adquiridos em triplicata na faixa de 4000 a 650 cm^{-1} . As análises quimiométricas foram realizadas nos softwares Pirouette 4.5 (Infometrix, Bothell, USA) e The Unscrambler® X 10.4 (Camo Analytics, Bedford, USA). Os espectros foram pré-tratados e dois algoritmos diferentes foram propostos para diagnóstico da PCM: análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e análise discriminante linear (LDA). Também foi desenvolvido um modelo com a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) para realizar a predição dos títulos de anticorpos das amostras de soro dos pacientes com PCM. Para todas as modelagens, o conjunto de amostras foi dividido em conjunto de calibração e conjunto de validação externa.

Resultados: ambas as modelagens propostas para o diagnóstico da PCM (PLS-DA e LDA) obtiveram 100% de sensibilidade, especificidade e acurácia no conjunto de validação externa.

A modelagem PLS para predição dos títulos de anticorpos apresentou erro mínimo, com erro quadrático médio da previsão (RMSEP) igual a 0,0093 e coeficiente de determinação maior que 0,9999 no conjunto de validação externa.

Conclusão: nesta pesquisa, foram propostas duas aplicações da espectroscopia FTIR (diagnóstico e predição de títulos de anticorpos) que se mostraram promissoras para melhorar o manejo clínico de pacientes com PCM.

Palavras-chave: paracoccidiodomicose; espectroscopia no infravermelho; diagnóstico; titulação de anticorpos.

ABSTRACT

Background: Paracoccidioidomycosis (PCM) is a chronic granulomatous mycosis endemic to Latin America, with greater occurrence in Brazil. PCM is caused by thermodimorphic fungi of the genus *Paracoccidioides*, whose most likely habitat is soil, where they are found in the form of mycelium. The disease is acquired by inhalation of fungal propagules and, in the lungs, transformation occurs into the yeast form. Starting from the lungs, any organ or system can be affected, as PCM is a polymorphic disease. The “gold standard” for diagnosis is the visualization of the fungus in clinical samples. Serology is also frequently used as an auxiliary diagnostic tool and to classify the severity of the disease, monitor the effectiveness of treatment and indicate the patient's cure. However, the usual diagnostic methods have limitations.

Objective: Develop new diagnostic methods for PCM based on FTIR spectroscopy and chemometric analyses.

Methods: A total of 224 serum samples from the Botucatu Faculty of Medicine (UNESP) repository were analyzed. Of these, 132 samples were from patients with PCM, diagnosed through visualization of the fungus in clinical samples, in addition to performing double immunodiffusion in agar gel (IDD) with antibody titration. The other 92 samples constituted the control group: 50 samples from healthy individuals and 42 samples from patients with other systemic mycoses (24 from aspergillosis, 10 from cryptococcosis and 8 from histoplasmosis). Samples were analyzed on the Spectrum 400 FTIR/FTNIR spectrometer (Perkin-Elmer, Inc., Waltham, USA) coupled to an attenuated total reflectance (ATR) accessory. An aliquot of 1 μL of each sample was deposited on the equipment's crystal, and the reading was carried out in liquid form and in dehydrated form (drying for 1 minute in air current at 60-65 $^{\circ}\text{C}$). Spectra were acquired in triplicate in the range from 4000 to 650 cm^{-1} . Chemometric analyzes were performed using Pirouette 4.5 (Infometrix, Bothell, USA) and The Unscrambler® X 10.4 (Camo Analytics, Bedford, USA) software. The spectra were pre-treated and two different algorithms were proposed for PCM diagnosis: partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) and linear discriminant analysis (LDA). A partial least squares (PLS) regression model was also developed to predict antibody titers in serum samples from patients with PCM. For all modeling, the sample set was divided into a calibration set and an external validation set.

Results: Both models proposed for the diagnosis of PCM (PLS-DA and LDA) achieved 100% sensitivity, specificity and accuracy in the external validation set. PLS modeling to predict antibody titers showed minimal error, with a mean squared prediction error (RMSEP) equal to 0.0093 and a coefficient of determination greater than 0.9999 in the external validation set.

Conclusion: In this research, two applications of FTIR spectroscopy (diagnosis and prediction of antibody titers) were proposed and showed promise for improving the clinical management of patients with PCM.

Keywords: paracoccidioidomycosis; infrared spectroscopy; diagnosis; antibody titration.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estratégia de busca de estudos para o item 2.2 da revisão da literatura, utilizando o termo de busca “*paracoccidioidomycosis*”.

Tabela 2. Estratégia de busca de estudos para o item 2.3 da revisão da literatura.

Tabela 3. Frequência de órgãos/tecidos envolvidos em 1757 casos de paracoccidioidomicose, publicados em séries de casos de três países endêmicos: Brasil (N = 546), Venezuela (N = 745) e Argentina (N = 466).

Fonte: Peçanha et al. (2017) (111); Alvarado et al. (2021) (112); Giusiano et al. (2023) (113).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspectos morfológicos e clínicos das espécies de *Paracoccidioides* causadoras de paracoccidioidomicose (acima), e das causadoras de lobomicose (abaixo).

Fonte: adaptado de Vilela et al. (2023) (4).

Figura 2. Distribuição geográfica das espécies do gênero *Paracoccidioides*, baseada em relatos presentes na literatura.

Fonte: adaptado de Rodrigues et al. (2023) (24).

Figura 3. Morfologia de *P. brasiliensis* durante a transição de micélio para levedura. (A) Hifas; (B) Micélio em diferenciação; (C) Células leveduriformes em transformação; (D) Células leveduriformes. Barra: 10 μ M.

Fonte: Sturme et al. (2011) (28).

Figura 4. Morfologia de *Paracoccidioides* sp. (A) Aspecto da colônia na forma micelial; (B) Aspecto microscópico das hifas na forma micelial; (C) Aspecto da colônia na forma leveduriforme; (D) Aspecto microscópico das células leveduriformes, mostrando os padrões de “timão de navio” e “Mickey Mouse”. Barra: 20 μ M.

Fonte: A e B - Gomes (2017)- (30); C - autoria própria; D - foto com padrão “Mickey Mouse” é de autoria própria e com “timão de navio” é de Hahn et al. (2022) (6).

Figura 5. Propagação de *Paracoccidioides* spp. no meio ambiente.

Fonte: Shikanai-Yasuda et al. (2017) (8).

Figura 6. Indivíduo de tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*), características macroscópicas do isolado de *P. brasiliensis* isolado de seus tecidos, e características microscópicas das células leveduriformes isoladas de seus tecidos.

Fonte: Bagagli et al. (2021) (25).

Figura 7. Distribuição da paracoccidioidomicose na América Latina.

Fonte: adaptado de Griffiths et al. (2019) (2).

Figura 8. Distribuição geográfica de 901 casos de paracoccidioidomicose, publicados em 52 estudos no estado do Rio Grande do Sul, entre 1942 e 2023.

Fonte: adaptado de Koehler, Scroferneker (2024) (86).

Figura 9. Esquema da história natural/patogênese da interação entre *Paracoccidioides* spp. e o hospedeiro humano, mostrando os principais desfechos clínicos em negrito nos retângulos azuis. Os números nos parênteses indicam a frequência estimada de cada desfecho. Abreviações: SNC, sistema nervoso central

Fonte: autoria própria, elaborado a partir da tradução de esquema de Benard (2020) (105).

Figura 10. Classificação mais utilizada da paracoccidioidomicose, proposta em 1987.

Fonte: autoria própria, elaborado a partir da tradução de tabela de Franco et al. (1987) (106).

Figura 11. Nova classificação proposta para a paracoccidioidomicose, de acordo com revisão de Benard (2020).

Fonte: autoria própria, elaborado a partir de tradução de tabela de Benard (2020) (105).

Figura 12. Algumas manifestações clínicas da PCM. (A) Pulmões; (B) Mucosa bucal; (C) Pele; (D); Adrenais (E); Sistema nervoso central (F).

Fonte: A – Barreto et al. (2015) (114); B – Koehler et al. (2022) (96); C – de Macedo et al. (2017) (115); D – Wagner et al. (2016) (116); E – Hahn et al. (2022) (6); F – Hahn et al. (2022) (6).

Figura 13. Esquema do diagnóstico laboratorial da paracoccidioidomicose. Abreviaturas: LBA, lavado broncoalveolar; LCR, líquido cefalorraquidiano; HE, hematoxilina-eosina; PAS, ácido periódico de Schiff; ELISA, ensaio de imun absorção enzimática; IDD, imunodifusão dupla; WB, Western Blot.

Fonte: autoria própria, adaptado de Hahn et al. (2022) (6).

Figura 14. Exame histopatológico mostrando as células típicas de *Paracoccidioides* sp. (setas), com coloração de Grocott-Gomori (A) e PAS (B).

Fonte: Koehler et al. (2022) (96).

Figura 15. Teste de imunodifusão dupla em gel de ágar (IDD).

Fonte: Hahn et al. (2022) (6).

Figura 16. SDS-PAGE (do inglês *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) do exoantígeno de *P. brasiliensis* mostrando seu principal antígeno, a glicoproteína gp43, de 43.000 Da.

Fonte: Hahn et al. (2022) (6).

Figura 17. Eventos históricos importantes relacionados ao tratamento da paracoccidiodomicose (PCM).

Fonte: autoria própria, adaptado de Silva et al. (2020) (165).

Figura 18. O espectro eletromagnético.

Fonte: adaptado de Martí, González (181).

Figura 19. Tipos de interação da matéria com cada região do espectro eletromagnético.

Fonte: adaptado de Pavia et al. (2015) (182).

Figura 20. Regiões da radiação infravermelha: infravermelho próximo (NIR), infravermelho médio (MIR) e infravermelho distante (FIR). É dado destaque para a região de MIR, pela sua relevância em análises biológicas.

Fonte: Balan et al. (2019) (12).

Figura 21. Modos normais de vibração de estiramento e de dobramento de um grupo metileno.

Fonte: Pavia et al. (2015) (182).

Figura 22. Esquema do processo instrumental para obtenção de espectros no infravermelho.

Fonte: adaptado de Thermo Nicolet (184).

Figura 23. Esquema da espectroscopia no infravermelho por reflectância total atenuada (ATR).

Fonte: Souza, 2009 (186).

Figura 24. Espectro típico de uma amostra biológica, com destaque para a região de maior relevância, mostrando as atribuições biomoleculares dos picos.

Fonte: adaptado de Baker et al. (2014) (185).

Figura 25. Quimiometria: junção de dados de origem química com a matemática e a estatística.

Fonte: autoria própria, elaborado a partir de Ferreira, 2015 (188).

Figura 26. Exemplo de organização dos dados de espectroscopia FTIR em uma matriz **X**, com as amostras nas linhas e as variáveis nas colunas.

Fonte: autoria própria.

Figura 27. Efeito dos diferentes tipos de pré-processamento em espectros de infravermelho.

Fonte: adaptado de Morais et al. (2020) (189).

Figura 28. Efeito dos diferentes tipos de pré-processamento em espectros de infravermelho (continuação da Figura 27).

Fonte: adaptado de Morais et al. (2020) (189).

Figura 29. Exemplo ilustrativo das componentes principais (PC) na representação de uma lapiseira. A PC1 se encontra ao longo do eixo longitudinal, pois é a visão que oferece maior quantidade de informações (pois a lapiseira é mais longa do que espessa). A PC2 é perpendicular à PC1 e corresponde ao eixo transversal com a segunda maior quantidade de informações, pois inclui dados sobre o clipe e sobre as laterais da lapiseira. A PC3 é perpendicular à PC2, correspondendo ao eixo transversal com menos informações, mas que ainda assim é relevante, pois permite determinar se a lapiseira é redonda ou quadrada.

Fonte: Ferreira (2015) (188).

Figura 30. Representação esquemática da decomposição de uma matriz \mathbf{X} composta por N amostras e 3 variáveis. Nesse caso, a informação relevante foi incluída nas duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2), enquanto a terceira componente (PC3) incluiu apenas informações irrelevantes/aleatórias (resíduo).

Fonte: Ferreira (2022) (192).

Figura 31. Exemplo de gráficos de escores (A) e de pesos (B) de uma Análise de Componentes Principais (PCA) realizada com dados de espectroscopia FTIR. (A) A PC1 explica 83% da variância, e a PC2 explica 9%. É possível visualizar uma separação dos grupos verde (lado negativo) e azul (lado positivo) ao longo do eixo da PC1; (B) Gráfico de pesos de PC1. É possível visualizar algumas das bandas responsáveis por agrupar as amostras e separar os grupos azul e verde ao longo do eixo da PC1.

Fonte: adaptado de Sanchez et al. (2022) (196).

Figura 32. Exemplo de um dendrograma gerado a partir da Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA), com espectros de espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN). No caso, o estudo analisou amostras de vinagre, mostrando dois *clusters* com índice de similaridade muito baixo (aproximadamente 0,06), um deles composto por vinagres de vinho

e maçã, e outro composto por vinagre de álcool/agrin. Com um índice de similaridade maior (0,37), a HCA indicou três subgrupos: um dos vinagres de vinho, um dos vinagres de maçã e um dos vinagres de álcool/agrin.

Fonte: Boffo et al. (2009) (197).

Figura 33. Representação esquemática da elaboração de um modelo de regressão a partir de dados de espectroscopia FTIR. São coletadas amostras de referência, que têm sua propriedade de interesse (no caso, títulos de anticorpos) determinada por um método de referência. Os espectros são obtidos e então é elaborado um modelo matemático que relaciona \mathbf{X} e \mathbf{y} , o qual permite a previsão da propriedade de interesse em novas amostras desconhecidas.

Fonte: autoria própria, elaborado a partir de Ferreira (2015) (188).

Figura 34. Exemplo de resultado do método de regressão por quadrados mínimos parciais (PLS). O objetivo da análise era realizar a previsão do teor de melanina de isolados fúngicos. Os gráficos A e B mostram o conjunto de calibração, com os valores estimados versus os valores verdadeiros no gráfico A e o erro na concentração no gráfico B. Já os gráficos C e D mostram o conjunto de validação externa. Como pode ser observado, os erros de previsão foram baixos, com o modelo obtendo RMSEP de 0.0999 e R^2 de 0.9691, demonstrando sua ótima capacidade preditiva.

Fonte: Koehler et al. (2024) (202).

Figura 35. Esquema de uma matriz de confusão dos resultados de um modelo de classificação.

Fonte: autoria própria.

Figura 36. Comparação esquemática entre o método do k -ésimo Vizinho mais Próximo (KNN) (A) e o método SIMCA (*Soft Independent Modeling of Class Analogy*). Em (A), a classe é prevista através da distância entre as amostras, sendo possível atribuir apenas uma classe a cada amostra. Em (B), as classes são delimitadas por elipses de confiança, que podem se sobrepor, sendo possível que uma amostra pertença a nenhuma, a somente uma ou a mais de uma classe.

Fonte: autoria própria.

Figura 37. Classificação da amostra i pelo método KNN, em três classes possíveis: A, B ou C. Com dois vizinhos mais próximos, ela é considerada da classe B, pois houve um empate (um voto da classe B e um voto da classe B) e a menor distância é em relação à classe B. Já com

três vizinhos mais próximos, ela é considerada da classe C, pois recebe dois votos dessa classe e apenas um voto de B.

Fonte: Ferreira (2015) (188).

Figura 38. Limites das hipercaixas dos modelos SIMCA para duas classes hipotéticas. A classe C foi modelada com duas componentes principais, enquanto a classe D com apenas uma.

Fonte: Ferreira (2015) (188).

Figura 39. Exemplo de um gráfico de Coomans para um conjunto de dados com três classes (A, B e C). Estão sendo representados os desvios-padrão residuais calculados para as amostras nos modelos da classe A (eixo x) e da classe B (eixo y). De acordo com a posição das amostras em relação ao valores-limite, é possível determinar em quais classes elas foram aceitas pelo modelo.

Fonte: adaptado de Oliveri, Downey (2013) (205).

Figura 40. Resultado de uma modelagem de análise discriminante linear (LDA). As amostras representadas por pontos azuis foram classificadas como grupo controle, enquanto as representadas por pontos vermelhos foram classificadas como grupo exposto. Os círculos preenchidos são de amostras na validação cruzada, e os vazados são de amostras na validação externa. O modelo obteve acurácia de 87,5%.

Fonte: adaptado de Lasalvia et al. (2022) (198).

Figura 41. Organização dos dados para construção de modelo de classificação utilizando análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA).

Fonte: de Santana et al. (2020) (204).

Figura 42. (A) Gráfico de escores (VL1 vs. VL2) de um modelo de PLS-DA, mostrando as amostras do conjunto de calibração (círculos preenchidos) e do conjunto de validação (círculos vazados). Observa-se a separação dos grupos controle (azul) e exposto (vermelho); (B) Coeficiente de regressão do modelo com duas variáveis latentes, mostrando que as variáveis mais importantes são os números de onda de 780, 830, 1090 e 1058 cm^{-1} , aproximadamente.

Fonte: adaptado de Lasalvia et al. (2022) (198).

Figura 43. Resultado da classificação com um modelo de análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), com cinco variáveis latentes. Foram utilizadas amostras de plasma, lidas com espectroscopia FTIR e classificadas nos grupos doença ativa (classe 1) ou remissão (classe 0). No caso, está sendo mostrado o conjunto de calibração, que obteve acurácia de 93,6%, sensibilidade de 96,3% e especificidade de 90,9%.

Fonte: adaptado de Morris et al. (2021) (207).

Figura 44. Etapas para desenvolvimento de uma aplicação prática das análises quimiométricas supervisionadas. Para as não supervisionadas, desconsidera-se o item “método de referência”, pois nessas análises não são utilizadas variáveis dependentes.

Fonte: autoria própria, elaborado com base em Cozzolino (2020) (208).

Figura 45. Esquema da utilização clínica da espectroscopia no infravermelho para diagnóstico de doenças. Diversos biofluidos e outros materiais biológicos como células e tecidos podem ser obtidos, nos quais podem existir biomarcadores de patologias. Os espectros que contêm a “impressão digital” dessas amostras podem detectar essas diferenças e permitir a triagem e diagnóstico dos pacientes, a partir da análise com métodos matemáticos.

Fonte: autoria própria, elaborado a partir de Mitchell et al. (2014) (210).

Figura 46. Exemplo hipotético de um dispositivo de *point-of-care* (POC) *testing*. Nele, uma lanceta é utilizada para coletar uma pequena quantidade de sangue, o qual passa por uma microcentrífuga para separação do soro e do plasma. As amostras são direcionadas diretamente para um sensor interno, como um diamante de ATR, e uma fonte de luz promove a geração dos espectros. Os espectros são direcionados para uma base de dados centralizada, que permite seu pré-tratamento sua e classificação de forma automática. Baseado no resultado, um sinal luminoso é acionado, com luz verde (resultado normal), âmbar (sinais precoces de doença) ou vermelha (diagnóstico da doença).

Fonte: Mitchell et al. (2014) (210).

Figura 47. Marco conceitual da pesquisa realizada.

Fonte: autoria própria.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANNs	redes neurais artificiais
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
ATR	reflectância total atenuada
CFA	antígeno <i>cell-free</i>
CIE	contraimunoeletroforese
CLS	regressão por quadrados mínimos clássicos
DA	análise discriminante
DTN	doença tropical negligenciada
ELISA	ensaio de imunoabsorção enzimática
FIR	infravermelho distante
FTIR	espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
GMS	Grocott-Gomori
HCA	análise de agrupamentos hierárquicos
HE	hematoxilina-eosina
IDD	imunodifusão dupla em gel de ágar
KNN	<i>k</i> -ésimo vizinho mais próximo
KS	Kennard-Stone
LA	aglutinação do látex
LAMP	<i>Loop-Mediated Isothermal Amplification</i>

LBA	lavado broncoalveolar
LCR	líquido cefalorraquidiano
LD	discriminante linear
LDA	análise discriminante linear
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight</i>
MIR	infravermelho médio
MLR	regressão linear múltipla
MLSA	análise por sequências multilocus
MSC	correção multiplicativa de espalhamento
NIR	infravermelho próximo
OMS	Organização Mundial da Saúde
OSC	correção ortogonal de sinal
PAS	ácido periódico de Schiff
PC	componente principal
PCA	análise de componentes principais
PCM	paracoccidiodomicose
PCR	reação em cadeia da polimerase
PCR	regressão por componentes principais
PCR-RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
PLS	regressão por quadrados mínimos parciais

PLS-DA	análise discriminante por mínimos quadrados parciais
POC	<i>point-of-care</i>
qPCR	PCR em tempo real
R ²	coeficiente de determinação
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RMN	ressonância magnética nuclear
RMSECV	erro quadrático médio da validação cruzada
RMSEP	erro quadrático médio da previsão
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SIG	Sistema de Informação Geográfica
SIMCA	<i>Soft Independent Modeling of Class Analogy</i>
SNV	padronização normal de sinal
SVM	máquina de vetores de suporte
T _{bias}	viés
UV	ultravioleta
VL	variável latente
WB	<i>Western Blot</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações	25
2.2 Paracoccidiodomicose	27
2.2.1 Aspectos gerais e breve histórico	27
2.2.3 Agentes etiológicos: classificação, características e ecologia	28
2.2.4 Epidemiologia	36
2.2.5 Manifestações clínicas	40
2.2.6 Diagnóstico laboratorial	47
2.2.6.1 Diagnóstico micológico	48
2.2.6.1.1 Exame microscópico direto e cultivo	49
2.2.6.1.2 Citopatologia e histopatologia	49
2.2.6.2 Diagnóstico sorológico	50
2.2.6.3 Comparação entre os métodos diagnósticos usuais: micológico, citopatológico, histopatológico e sorológico	55
2.2.6.4 Outras tecnologias para diagnóstico	56
2.2.6.4.1 Diagnóstico molecular	56
2.2.6.4.2 Espectrometria de massa MALDI-TOF (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight</i>)	57
2.2.6.4.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	58
2.2.6.5 Definição de caso	58
2.2.7 Tratamento	58
2.2.7.1 Critério de cura	61
2.3 Espectroscopia no infravermelho	62
2.3.1 Aspectos gerais	62
2.3.2 Análises quimiométricas	69
2.3.2.1 Aspectos gerais e preparação dos dados	69
2.3.2.2 Análises quimiométricas não supervisionadas	76
2.3.2.3 Análises quimiométricas supervisionadas	82
2.3.2.3.1 Métodos de regressão	82
2.3.2.3.1 Métodos de classificação	88

2.3.2.4 Aplicação das análises quimiométricas.....	100
2.3.3 Uso no diagnóstico clínico.....	101
2.3.4 Uso na paracoccidioidomicose.....	104
3. MARCO CONCEITUAL	107
4. JUSTIFICATIVA	108
5. OBJETIVOS	109
5.1 Objetivo geral.....	109
5.2 Objetivos específicos	109
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
7. ARTIGOS.....	138
7.1 ARTIGOS PRINCIPAIS.....	138
ARTIGO 1: Using infrared spectroscopy of serum and chemometrics for diagnosis of paracoccidioidomycosis	139
ARTIGO 2: Antibody titer prediction from serum immunodiffusion test of patients with paracoccidioidomycosis using infrared spectroscopy and chemometrics	157
ARTIGO 3: Rapid classification of serum from patients with paracoccidioidomycosis using infrared spectroscopy, univariate statistics, and linear discriminant analysis (LDA)	177
7.2 ARTIGOS SECUNDÁRIOS	196
ARTIGO 1: Head and neck manifestations of paracoccidioidomycosis: A retrospective study of histopathologically diagnosed cases in two medical centers in southern Brazil	197
ARTIGO 2: Clinical-epidemiological characteristics of paracoccidioidomycosis and presence of <i>Paracoccidioides</i> spp. in the natural environment in Rio Grande do Sul, southern Brazil: an 81-year literature survey	210
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	228
9. PERSPECTIVAS.....	229
ANEXO 1 - STROBE Checklist.....	230

1. INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose granulomatosa crônica endêmica da América Latina. O país com maior ocorrência é o Brasil, que conta com pelo menos 80% dos casos, os quais se distribuem por todas as regiões geográficas (1). A PCM se enquadra nas características das doenças tropicais negligenciadas (DTNs), por afetar principalmente populações com vulnerabilidade social e econômica e não ser prioridade para o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos e terapêuticos (2). Além disso, apesar de ter grande ocorrência no Brasil, a PCM não integra a Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública, o que dificulta o conhecimento de sua epidemiologia (3).

Os agentes etiológicos da PCM são os fungos termodimórficos do gênero *Paracoccidioides*, com pelo menos cinco espécies do gênero que causam a doença: *P. brasiliensis*, *P. lutzii*, *P. americana*, *P. restrepiensis* e *P. venezuelensis* (4). A 25°C, no ambiente natural, esses fungos se apresentam na sua forma micelial, organizados em hifas septadas. Já a 37°C, quando se encontram no hospedeiro, a forma é leveduriforme (5). O habitat mais provável dos fungos do gênero *Paracoccidioides* é o solo, mas seu nicho exato ainda é incerto, devido à dificuldade de isolamento em amostras ambientais (6). No solo, em sua forma de micélio, são produzidos conídios e, pela inalação desses propágulos fúngicos, a doença é adquirida pelo ser humano. Nos pulmões, ocorre a conversão para a forma leveduriforme, transformação essencial para o estabelecimento da doença e para a sobrevivência do fungo no hospedeiro (7).

A PCM é uma doença polimórfica e, a partir dos pulmões, pode afetar qualquer órgão ou sistema do corpo humano. Na forma crônica da doença, que é a mais frequente, o maior acometimento ocorre nos pulmões, na mucosa das vias aerodigestivas superiores e na pele (8). A forma crônica da doença afeta principalmente adultos do sexo masculino, na faixa etária entre 30 e 60 anos. Já a forma aguda/subaguda, menos comum, predomina em criança, adolescentes e adultos jovens, com maior acometimento do sistema fagocítico-mononuclear (8). A confirmação de um caso de PCM se dá através da existência de manifestações clínicas típicas da doença, com a detecção de elementos fúngicos sugestivos de *Paracoccidioides* spp. em amostras clínicas (8). Seu diagnóstico precoce é essencial para evitar sequelas, como a fibrose pulmonar, além de garantir a efetividade do tratamento, reduzindo as taxas de morbidade e mortalidade (9).

O “padrão ouro” é o diagnóstico micológico da PCM, seja através de exame microscópico direto, cultivo, citopatologia ou histopatologia (10). Outra ferramenta diagnóstica auxiliar é a sorologia, principalmente com a detecção de anticorpos circulantes através da técnica de imunodifusão dupla em gel de ágar (IDD) (1). Apesar de serem os mais usuais, esses métodos apresentam limitações, exigindo profissionais experientes para análise dos exames, com o risco inerente de lidar com um fungo patogênico humano em ambiente laboratorial (10). Nesse contexto, novas tecnologias para o diagnóstico da PCM apresentam relevância, como as técnicas moleculares, a espectrometria de massa MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight*) e a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (11). Dentre estas técnicas, devido a suas vantagens, a última ganha destaque.

A espectroscopia FTIR permite a obtenção de uma “impressão digital” da amostra, o seu espectro vibracional, que possibilita a análise de toda a sua composição química. Ao ser acoplada com ferramentas matemáticas multivariadas (quimiometria), ela se torna uma ferramenta poderosa para o diagnóstico clínico de inúmeras doenças, pois as condições patológicas geram alterações estruturais e funcionais no organismo que são refletidas em alterações nos espectros vibracionais (12). Dentre as vantagens da espectroscopia FTIR, cita-se a alta sensibilidade a alterações moleculares, sua natureza não invasiva e não destrutiva, a não geração de resíduos e a desnecessidade de reagentes e de preparo das amostras, além de ser simples, rápida de executar e apresentar custo acessível (12,13). No âmbito da PCM, essa técnica já foi proposta para seu diagnóstico (14). Porém, o estudo foi somente uma prova de conceito, necessitando de um maior desenvolvimento metodológico para comprovar seu potencial diagnóstico para a micose. Nesse contexto, considerando a natureza negligenciada da PCM e a importância do seu diagnóstico precoce, destaca-se a importância de novos estudos sobre a aplicação da espectroscopia FTIR no manejo clínico dessa micose.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

A revisão da literatura está focada em todos os aspectos relacionados à paracoccidiodomicose (PCM), com destaque para o diagnóstico. Além disso, é focada nos aspectos gerais da espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e das análises quimiométricas, com ênfase no uso de FTIR para diagnóstico de doenças infecciosas. A estratégia de busca envolveu as bases de dados PubMed, BVS e Embase, sem limites de data e idioma, englobando todos os estudos publicados até março de 2024. Também foram consultados alguns sites e livros relevantes para as temáticas desta tese (11 referências no total).

Para o item 2.2 (“Paracoccidiodomicose”) foi utilizada apenas a palavra-chave “paracoccidiodomycosis” para a busca nas bases de dados. Não foi considerado necessário elaborar a busca com palavras-chave mais específicas, pois não há uma quantidade muito grande de literatura publicada acerca da paracoccidiodomicose. Com a busca dessa maneira, foi possível englobar toda a literatura existente sobre a PCM que está disponível nessas bases de dados. Para possibilitar uma melhor análise, os artigos encontrados foram separados em categorias temáticas, conforme mostra a Tabela 1. Nessa tabela, também está demonstrado o quantitativo de artigos selecionados para a revisão da literatura no item 2.2.

Os artigos incluídos na revisão foram selecionados através de uma análise qualitativa, com leitura dos títulos e resumos, elencando os que mais se enquadravam na temática que objetivava-se discutir. Também foram analisados a revista e o ano de publicação, dando prioridade para artigos mais recentes publicados em periódicos de maior impacto na área.

Para o item 2.3 (“Espectroscopia no infravermelho”), por existir uma quantidade extensa de literatura publicada, foram utilizadas algumas estratégias de busca. Essas estratégias e o número de artigos encontrados, repetidos e incluídos estão apresentados na Tabela 2. Para esse item, os artigos foram buscados apenas nas bases de dados PubMed e Embase. A base BVS tem um enfoque mais regional na América Latina e Caribe, e foi incluída no item 2.2 devido ao fato da PCM ser endêmica na região. Como não havia interesse nesse enfoque para o item 2.3, essa base não foi considerada. Os critérios de inclusão dos artigos foram os mesmos citados para o item 2.2.

Tabela 1. Estratégia de busca de estudos para o item 2.2 da revisão da literatura, utilizando o termo de busca “*paracoccidioidomycosis*”.

Base de dados	Artigos encontrados	Artigos repetidos	Total sem repetidos	Categorias	Número de artigos em cada categoria	Total de artigos incluídos na revisão			
PubMed	2558	4942	4287	Agentes etiológicos	173	175			
				Associação com outras doenças	70				
				Casos em outros animais	42				
				Classificação clínica	2				
				Classificação da severidade	3				
				Diagnóstico	301				
				Diversos	92				
				Ecologia de <i>Paracoccidioides</i> spp.	51				
				BVS	3709		Epidemiologia	273	
								Fatores de risco/resistência	56
<i>Follow-up</i>	30								
Imunologia/patogenia	744								
Manifestações clínicas	296								
Manifestações clínicas experimentais	96								
Outras doenças	206								
Profilaxia/desenvolvimento de vacina	65								
Embase	2962							Relatos de caso	910
									Revisões/aspectos gerais
				Sequelas	21				
				Séries de casos – até 100 casos	221				
		Séries de casos – mais de 100 casos	35						
		Tratamento - clínico	92						
		Tratamento - experimental	186						
		Tratamento - revisões	119						

Tabela 2. Estratégia de busca de estudos para o item 2.3 da revisão da literatura.

Seção	Estratégias de busca/Base de dados		Artigos encontrados	Artigos repetidos	Artigos incluídos
	PubMed	Embase			
2.3.1 e 2.3.2	(fourier transform infrared spectroscopy[Title]) OR (vibrational spectroscopy[Title]) OR (infrared spectroscopy fingerprint[Title]) OR (infrared spectroscopy[Title]) <i>Filtro (Article type): Review</i>	'fourier transform infrared spectroscopy':ti OR 'vibrational spectroscopy':ti OR 'infrared spectroscopy fingerprint':ti OR 'infrared spectroscopy':ti <i>Filtro (Publication types): Review</i>	PubMed: 691 Embase: 696	524	22
2.3.3 e 2.3.4	("fourier transform infrared spectroscopy"[Title] OR "ftir"[Title] OR "spectroscopy"[Title]) AND ("diagnosis"[Title] OR "screening"[Title] OR "diagnosing"[Title] OR "infection"[Title])	('fourier transform infrared spectroscopy':ti OR 'ftir':ti OR 'spectroscopy':ti) AND ('diagnosis':ti OR 'screening':ti OR 'diagnosing':ti OR 'infection':ti)	PubMed: 1431 Embase: 1787	1228	33

2.2 Paracoccidioidomicose

2.2.1 Aspectos gerais e breve histórico

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença crônica granulomatosa endêmica na América Latina, do México até a Argentina. O maior número de casos ocorre no Brasil, e foi no país que foi feita a primeira descrição da PCM, pelo médico Adolpho Lutz, em 1908 (1,15). O médico descreveu as manifestações clínicas de dois pacientes acometidos por uma enfermidade até então desconhecida, além de isolar em cultivo os agentes etiológicos. Ele verificou que os fungos apresentavam natureza dimórfica, porém distinta de *Coccidioides immitis*. Assim, nomeou a nova enfermidade como hifoblastomicose pseudo-coccídica, para diferenciá-la da coccidioidomicose. Para o agente etiológico, Lutz não propôs nenhum nome (1,15,16).

Assim, nos anos seguintes, houve um esforço para melhor caracterização dos agentes etiológicos desta nova enfermidade. Em 1912, Alfonso Splendore obteve sucesso no isolamento do fungo, classificando-o como uma levedura do gênero *Zymonema* e propondo o nome *Zymonema brasiliensis*. Apenas em 1928 foi introduzido o gênero *Paracoccidioides*, por Almeida e Lacaz e, em 1930, Almeida propôs o nome da espécie como *Paracoccidioides brasiliensis*. A PCM já teve diversos nomes, como blastomicose sul-americana, doença de Lutz

e doença de Lutz-Splendore-Almeida. O nome “paracoccidioidomicose” foi oficializado apenas em 1971, no Simpósio Pan-Americano sobre a doença, realizado em Medellín, na Colômbia (1,6,16).

2.2.3 Agentes etiológicos: classificação, características e ecologia

Os agentes etiológicos da PCM são os fungos termodimórficos do gênero *Paracoccidioides* (Onygenales, Ascomycota), que pertence à família Ajellomycetaceae. Essa família de fungos inclui a maior parte dos fungos termodimórficos, que apresentam formas especializadas para sobreviver e se reproduzir em diferentes hospedeiros mamíferos. Exemplos de outros gêneros de relevância médica presentes na família Ajellomycetaceae são *Blastomyces* e *Histoplasma* (6,17).

Durante quase 100 anos, desde a descrição inicial da paracoccidioidomicose em 1908 (15), acreditava-se que o gênero *Paracoccidioides* era formado por uma única espécie: *Paracoccidioides brasiliensis*. Porém, características morfológicas não são as ideais para definição de espécies em fungos. Assim, com o advento dos métodos moleculares, descobriu-se uma grande variabilidade genética em isolados de *P. brasiliensis*. Inicialmente, em 2006, foram descritas as espécies filogenéticas S1, PS2 e PS3, pertencentes ao complexo de *P. brasiliensis*. Além disso, foi evidenciada uma possível diferenciação em S1 de isolados clínicos provenientes da Venezuela (18). Posteriormente, esses isolados foram separados de S1 e considerados como uma espécie filogenética diferente, denominada PS4 (19). Já em 2009, começaram a ser evidenciadas diferenças na composição antigênica de isolados de *P. brasiliensis* provenientes da região Centro-Oeste do Brasil (20). Isso levou à descoberta de uma nova espécie no complexo *P. brasiliensis*, inicialmente denominada “Pb01-like” e, posteriormente, denominada *P. lutzii* e considerada como uma nova espécie fora do complexo (21).

Em 2017, Turissini e colaboradores propuseram elevar as quatro espécies filogenéticas do complexo *P. brasiliensis* para o status taxonômico de espécie formalmente descrita. Assim, foram definidos os nomes *Paracoccidioides americana*, para a espécie filogenética PS2, *Paracoccidioides restrepiensis*, para a PS3, *Paracoccidioides venezuelensis*, para a PS4, e mantido o nome *Paracoccidioides brasiliensis* apenas para a S1 (22). Já a espécie *Paracoccidioides lutzii*, apesar de ter essa nomenclatura desde 2014, teve seu nome oficialmente validado em 2023 (4). Assim, considerando a taxonomia atual, é possível afirmar que a PCM é causada por cinco espécies diferentes do gênero *Paracoccidioides*. Cabe destacar também que,

além das espécies causadoras da PCM, o gênero *Paracoccidioides* também engloba duas espécies causadoras da lobomicose, que causam apenas lesões cutâneas e subcutâneas: *P. lobogeorgii* (ou *P. loboi*, nome antigo), que causa a doença em humanos, e *P. cetii*, que causa a doença em golfinhos. Apesar de inúmeras tentativas, ambas nunca foram cultivadas in vitro, o que impede um maior conhecimento de sua morfologia (4,23) (Figura 1).

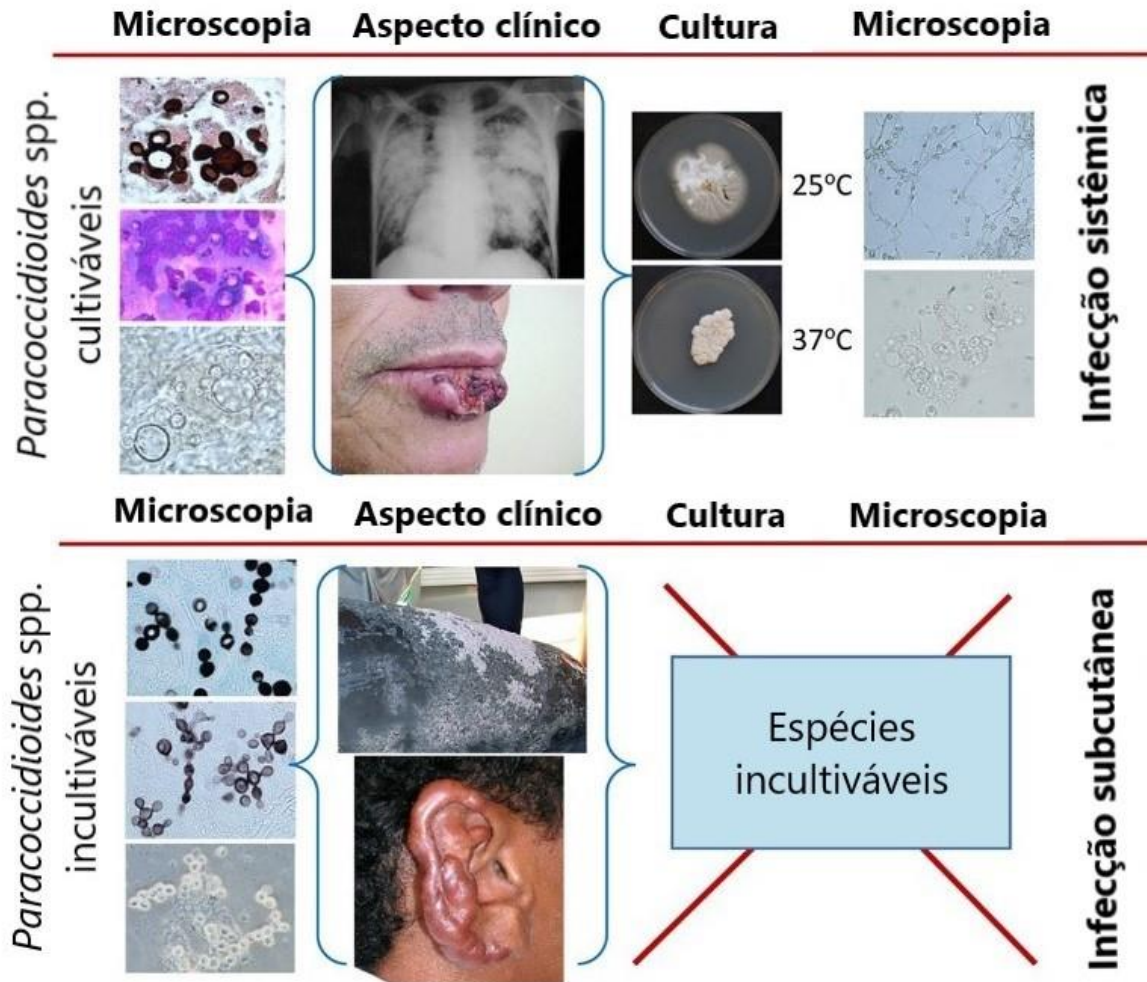


Figura 1. Aspectos morfológicos e clínicos das espécies de *Paracoccidioides* causadoras de paracoccidioidomicose (acima), e das causadoras de lobomicose (abaixo).

Fonte: adaptado de Vilela et al. (2023) (4).

P. brasiliensis é a espécie mais amplamente distribuída no continente sul-americano, seguida de *P. lutzii* e *P. americana*. Já *P. restrepiensis* e *P. venezuelensis* têm uma distribuição mais restrita, principalmente na Colômbia e Venezuela, respectivamente, com alguns casos esparsos na Argentina, Brasil, Peru e Uruguai. *P. lobogeorgii* ocorre principalmente na região amazônica, e *P. cetii* ao longo da costa do continente americano (24,25) (Figura 2). Porém, essa

distribuição pode não refletir completamente a realidade, pois não existem muitos estudos nos quais foi feito o isolamento de *Paracoccidioides* spp. em cultura, com posterior identificação molecular. Além disso, há uma grande diversidade genética no gênero *Paracoccidioides*, e o aprofundamento de estudos de sua filogenia pode revelar novas informações sobre sua distribuição geográfica (26,27).

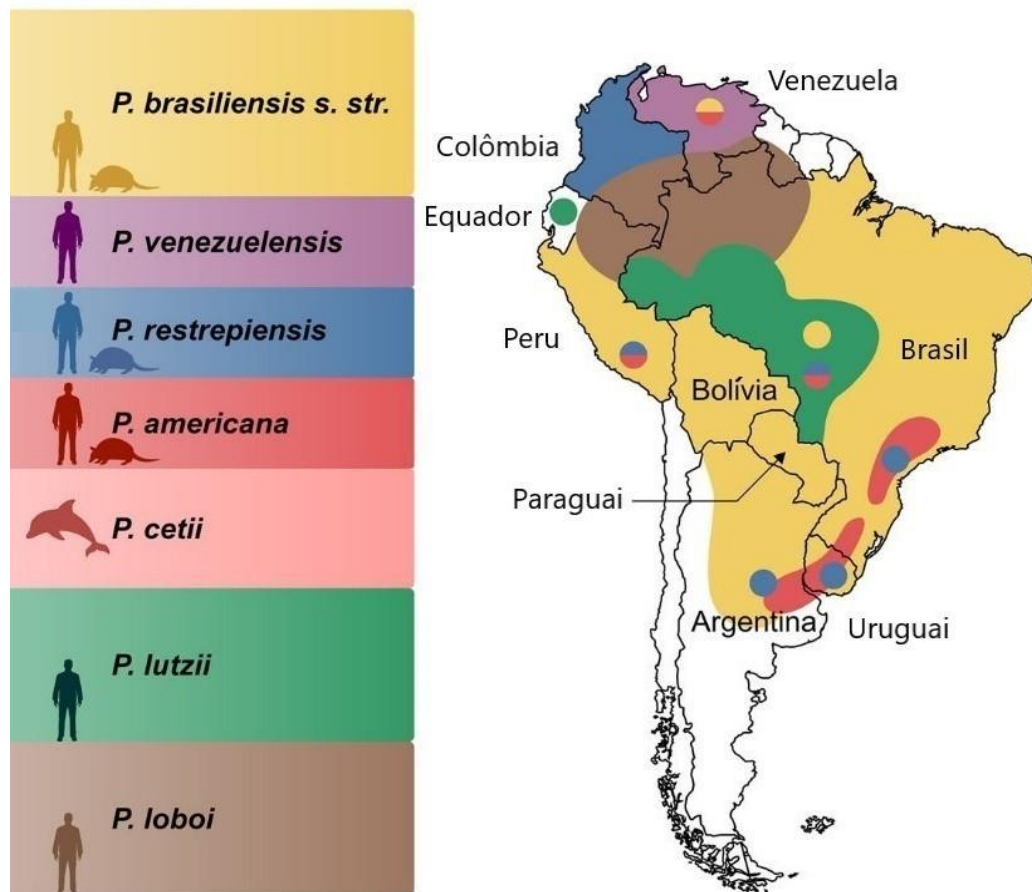


Figura 2. Distribuição geográfica das espécies do gênero *Paracoccidioides*, baseada em relatos presentes na literatura.

Fonte: adaptado de Rodrigues et al. (2023) (24).

Para fins de simplificação, nesta revisão da literatura, quando for utilizado o termo “*Paracoccidioides* spp.”, estará sendo feita referência apenas às espécies do gênero causadoras da PCM. Nestas, a característica mais marcante é o seu dimorfismo, que é a habilidade de desenvolver dois tipos de células vegetativas, na forma de hifas e leveduras, dependendo da temperatura (Figura 1). A 25 °C, o fungo apresenta células organizadas em hifas septadas e, a 37 °C, as células apresentam forma leveduriforme (5). Essa transformação apresenta diversas formas intermediárias (28), conforme pode ser observado na Figura 3.

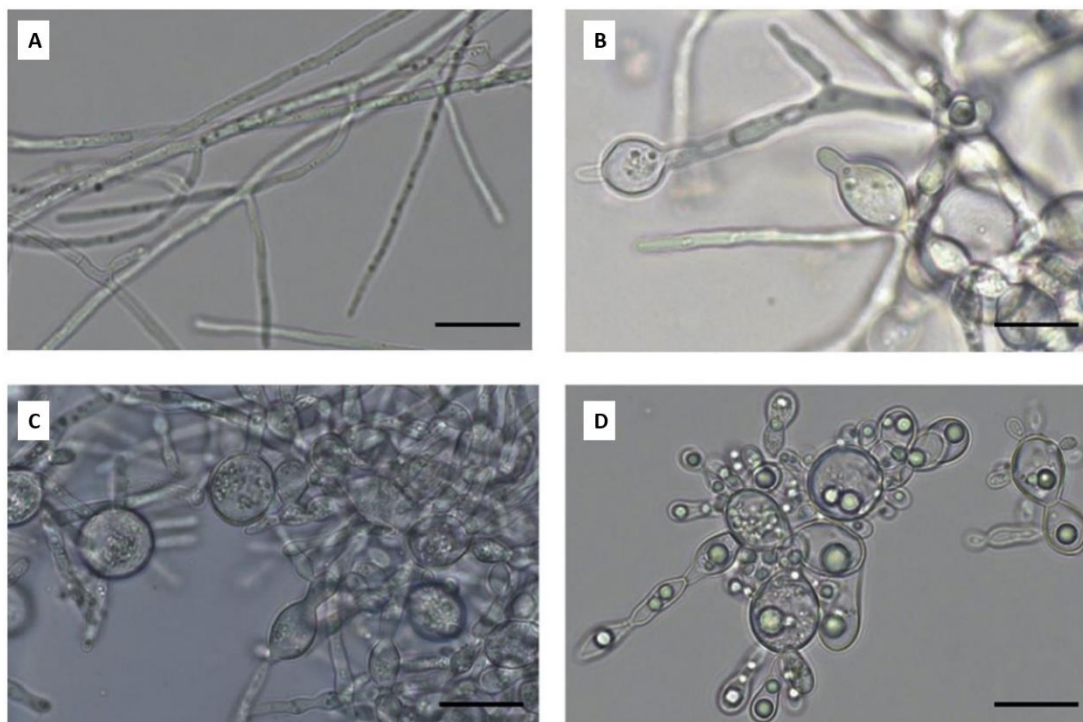


Figura 3. Morfologia de *P. brasiliensis* durante a transição de micélio para levedura. (A) Hifas; (B) Micélio em diferenciação; (C) Células leveduriformes em transformação; (D) Células leveduriformes. Barra: 10 μ M.

Fonte: Sturme et al. (2011) (28).

Na forma de micélio, o fungo apresenta células organizadas em hifas septadas, onde são produzidos conídios assexuais (5). A forma micelial cresce lentamente em meio de cultura a 25 °C, podendo levar de 15 a 30 dias para o surgimento de colônias. Seu formato é usualmente circular, com coloração branca a creme e superfície aveludada, apresentando pregas e dobras no centro (29,30) (Figura 4A). Quando observadas por microscopia óptica, as células são alongadas (1 a 3 μ M), septadas e multinucleadas (30) (Figura 4B).

A 37 °C, o fungo se apresenta na forma de células leveduriformes que se dividem por brotamento (5). A aparência das colônias é enrugada e cerebriforme, com cor esbranquiçada ou creme (Figura 4C). As células leveduriformes têm diâmetro de 6 a 30 μ M e apresentam uma parede celular espessa e birrefringente (6,29,30). O padrão típico da forma leveduriforme é a formação de células-mãe grandes cercadas por diversas células-filhas. O aspecto é semelhante a um “timão de navio” ou “roda de leme”, pela sua semelhança com o aparelho utilizado para conduzir embarcações (31). Quando o brotamento é duplo, o padrão também é conhecido por “Mickey Mouse” (1) (Figura 4D).

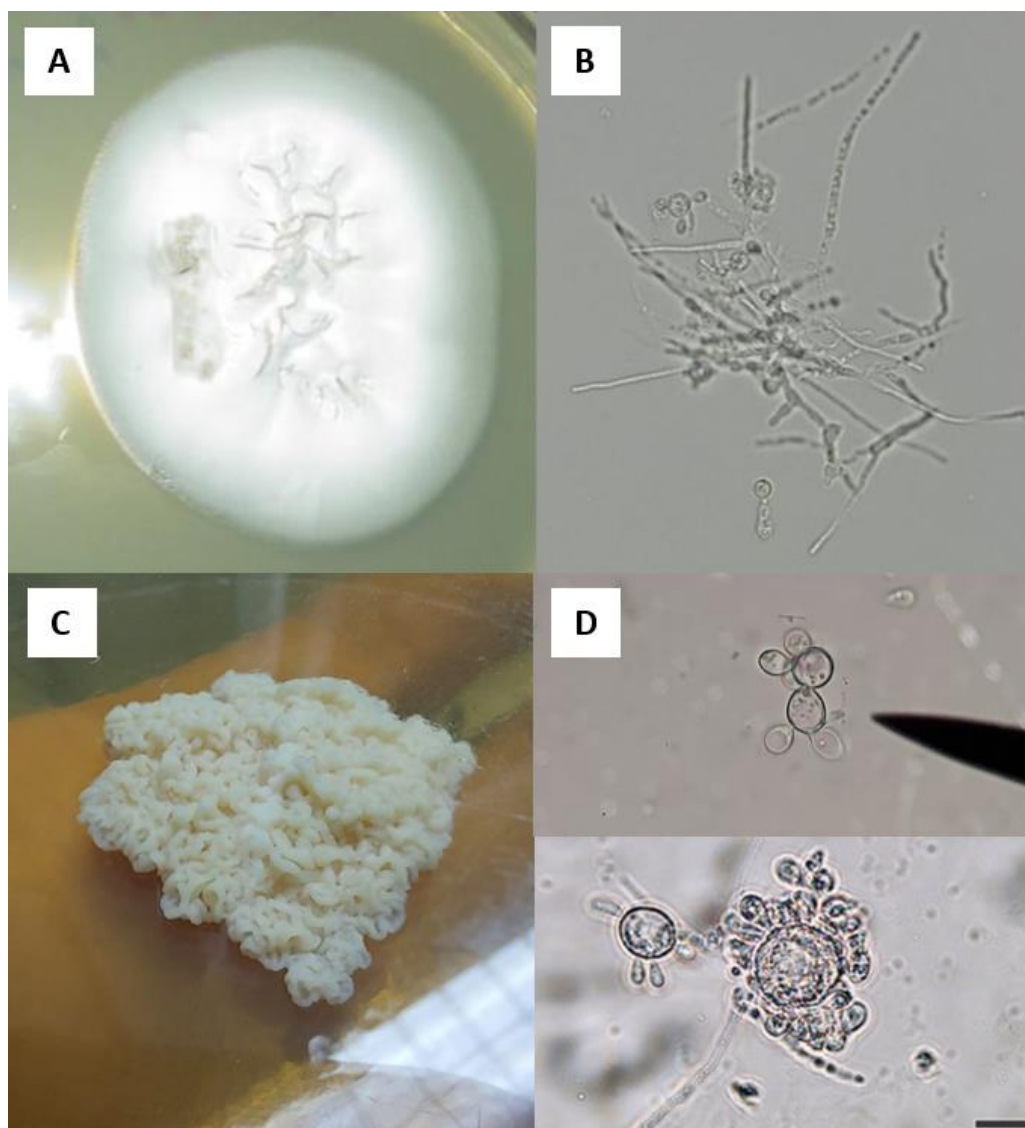


Figura 4. Morfologia de *Paracoccidioides* sp. (A) Aspecto da colônia na forma micelial; (B) Aspecto microscópico das hifas na forma micelial; (C) Aspecto da colônia na forma leveduriforme; (D) Aspecto microscópico das células leveduriformes, mostrando os padrões de “timão de navio” e “Mickey Mouse”. Barra: 20 μ M.

Fonte: A e B - Gomes (2017) (30); C - autoria própria; D - foto com padrão “Mickey Mouse” é de autoria própria e com “timão de navio” é de Hahn et al. (2022) (6).

A transformação em levedura é fundamental para o estabelecimento da doença e para a sobrevivência do fungo no hospedeiro. A parede celular das leveduras é mais espessa que nas hifas, e sua composição química é notavelmente diferente, possuindo diversas propriedades que promovem a infecção e protegem o fungo do sistema imune (7,32). Além da parede celular, os fungos do gênero *Paracoccidioides* apresentam inúmeras estratégias para escapar e manipular

os mecanismos de defesa do hospedeiro. Sabe-se que há ao menos 15 genes envolvidos em fatores de virulência e/ou estratégias de evasão do sistema imune (33).

Especula-se que estes mecanismos de virulência sejam adquiridos no habitat natural do fungo, que é o solo. Assim como *Paracoccidioides* spp., existem outros fungos que habitam o solo e completam seu ciclo de vida sem a necessidade de um hospedeiro animal, o que levantava a questão de como esses microrganismos evoluíram mecanismos de virulência. Em busca de respostas para essa pergunta, diversos pesquisadores começaram a estudar as interações desses fungos com outros microrganismos presentes no solo. A hipótese mais aceita atualmente é a de que os fungos são predados por amebas, necessitando desenvolver estratégias para se proteger. Essas mesmas estratégias fornecem proteção contra o sistema imune de mamíferos e, assim, os fungos se tornam virulentos para esses hospedeiros (34,35).

Apesar de o solo ser o habitat mais provável, o nicho exato de *Paracoccidioides* spp. ainda é incerto, devido à dificuldade de isolamento do fungo em amostras ambientais, possivelmente causado pela sua baixa concentração (6). Apesar disso, o fungo já foi isolado em amostras de solo de todas as regiões do Brasil, exceto no Nordeste. *Paracoccidioides* spp. já foi detectado no solo nos seguintes estados brasileiros: Rio de Janeiro (36), São Paulo (37–39), Minas Gerais (40), Mato Grosso (37), Goiás (40), Rondônia (40) e Rio Grande do Sul (41,42). Sabe-se que a umidade é um fator determinante para a ocorrência do fungo e, inclusive, já foi hipotetizado que seu habitat poderia ser aquático (43). A partir do Sistema de Informação Geográfica (SIG) e estatística espacial, foi possível associar a ocorrência de *Paracoccidioides* spp. com solos de granulação fina (com mais de 35% de argila) e precipitação anual acima de 1400 mm (44). A ocorrência de fenômenos climáticos como o El Niño, que aumenta a umidade do ar e a quantidade de água no solo, também favorece a presença de fungos do gênero *Paracoccidioides* no ambiente (45). Assim, condições de alta umidade, associadas com o contato e manejo do solo, estão associadas à infecção humana por *Paracoccidioides* spp. (Figura 5).

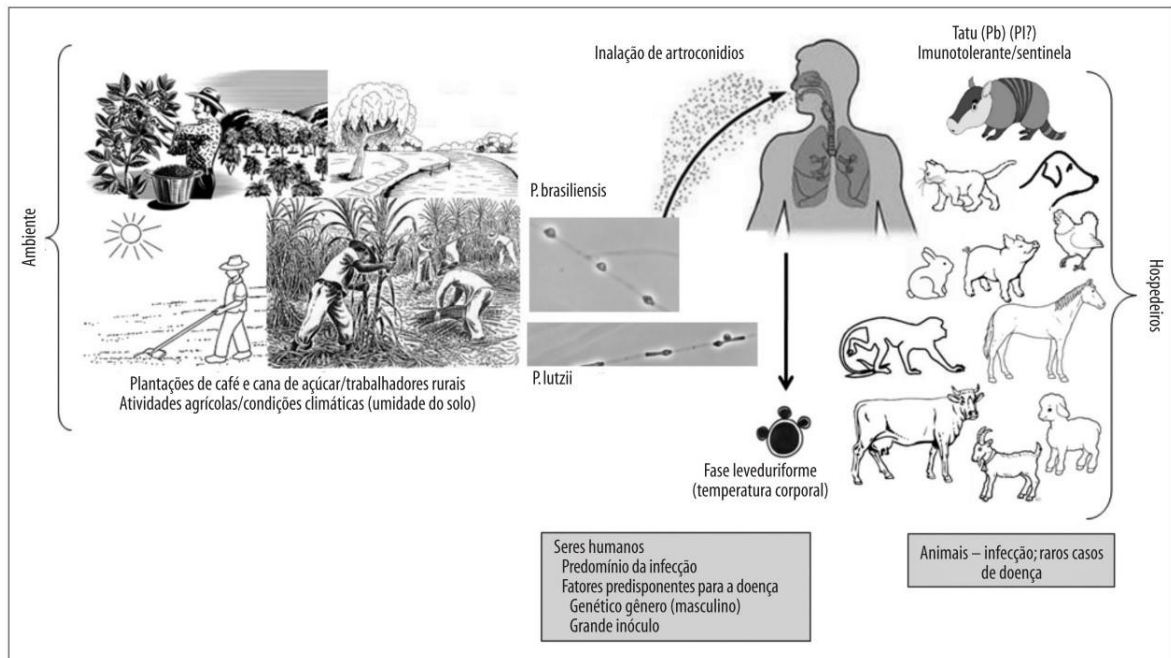


Figura 5. Propagação de *Paracoccidioides* spp. no meio ambiente.

Fonte: Shikanai-Yasuda et al. (2017) (8).

Devido à dificuldade em detectar o fungo em amostras ambientais, outra maneira de estudar sua ecologia é através da soropidemiologia em animais, através da detecção de anticorpos anti-*Paracoccidioides* (6). Já foi detectada a presença de anticorpos em diversos animais domésticos, como cachorros (46–48), cavalos (49), ovelhas (50), gado leiteiro (51), coelhos (52), gatos (53), cabras leiteiras (54), galinhas (55) e porcos (56). Diversas espécies de mamíferos selvagens também já apresentaram positividade para esses anticorpos, como macacos (57), morcegos (58), golfinhos (59) e diversas espécies de carnívoros e herbívoros terrestres (60–62). Além disso, destaca-se que anticorpos já foram detectados em peixes (63), e já foi isolada uma amostra de *P. brasiliensis* nas fezes de um pinguim-de-adélia (*Pygoscelis adeliae*) (64) (Figura 5). Apesar de anticorpos anti-*Paracoccidioides* já terem sido detectados em diversas espécies de animais, relatos de doença ativa são raros na literatura, existindo alguns casos publicados em cães (65,66), um caso em um gato e um caso em uma preguiça-real (*Choloepus didactylus*) (67).

Dentre todos os animais que são reservatórios naturais de *Paracoccidioides* spp., o que tem maior destaque é o tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*) (Figura 5 e Figura 6). Em 1986, foi publicada a detecção do fungo em tatus-galinha do estado do Pará (68) e, desde então, diversos trabalhos têm realizado essa detecção e estudado a relação dos tatus com *Paracoccidioides* spp. (25,37,69). Inclusive, já foram detectados tatus infectados com duas

espécies diferentes de *Paracoccidioides* (*P. brasiliensis* e *P. americana*) (37). A espécie *D. novemcinctus* tem ampla distribuição geográfica, que coincide com as áreas endêmicas da PCM (68). O fungo também é frequentemente detectado nas tocas dos tatus (37), e o hábito escavador desses animais, para procurar alimentos e construir tocas, é possivelmente a fonte de contaminação com *Paracoccidioides* spp. (6). Considerando a dificuldade em isolar *Paracoccidioides* spp. de amostras ambientais, os tatus representam uma importante alternativa para estudo da ecologia e distribuição geográfica do fungo (40). Esse conhecimento pode proporcionar o desenvolvimento de medidas que evitem a exposição humana a *Paracoccidioides* spp. e, conseqüentemente, reduzam os casos de PCM nas áreas endêmicas (70).

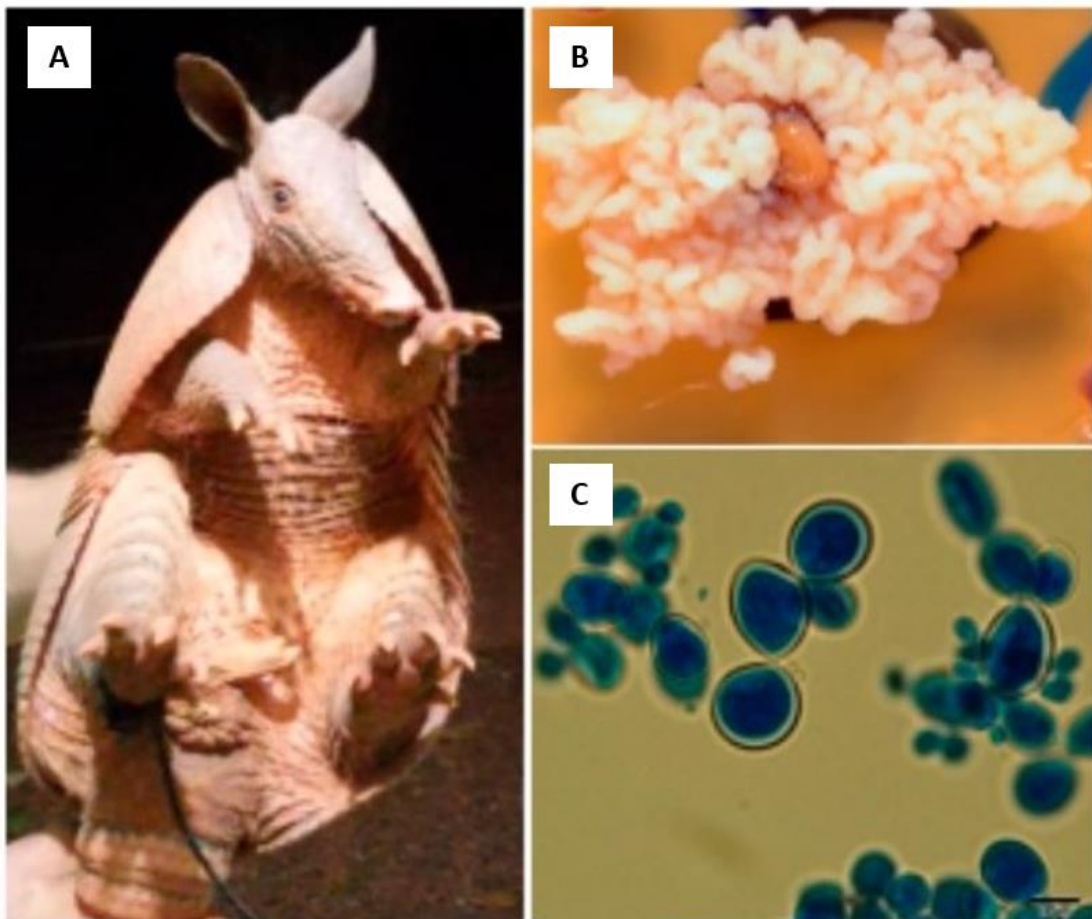


Figura 6. Indivíduo de tatu-galinha (*Dasypos novemcinctus*), características macroscópicas do isolado de *P. brasiliensis* isolado de seus tecidos, e características microscópicas das células leveduriformes isoladas de seus tecidos.

Fonte: Bagagli et al. (2021) (25).

2.2.4 Epidemiologia

A PCM se enquadra nas características das doenças tropicais negligenciadas (DTNs), um grupo de doenças definidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que são endêmicas em países de clima tropical ou subtropical ao redor do mundo. Elas são doenças infecciosas que afetam principalmente a população mais vulnerável em países subdesenvolvidos na Ásia, África e América Latina (71). Essas doenças têm um impacto profundo nessas populações, contribuindo na perpetuação da vulnerabilidade social e econômica. Mesmo assim, pesquisas sobre as DTNs são majoritariamente negligenciadas, o que dificulta o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos e terapêuticos que poderiam auxiliar no seu combate. Apesar de apresentar todas as características das DTNs, a PCM não faz parte desse grupo oficialmente, pois ainda não foi reconhecida como tal pela OMS (2). Mesmo sem esse reconhecimento, é inegável o impacto profundo que a PCM tem na América do Sul, sendo a segunda micose endêmica mais prevalente, atrás apenas da histoplasmose (71).

A PCM ocorre exclusivamente na zona tropical e subtropical que vai do México (23° norte) à Argentina (35° sul) (2) (Figura 7). A maior parte dos casos ocorre no Brasil (cerca de 80%), seguido por Venezuela, Colômbia, Equador, Argentina e Bolívia. Uruguai, Paraguai e os países da América Central apresentam poucos casos, assim como as ilhas caribenhas. No Chile, Suriname e Guiana, a PCM nunca foi registrada (1,72). Alguns casos de PCM são diagnosticados fora da América Latina, mas todos são provenientes de movimentos de migração ou de viagens para áreas endêmicas (73). Um dos principais continentes com essa ocorrência é a Europa, onde uma revisão recente identificou 83 casos de PCM diagnosticados em 11 países (74). Também há registros nos Estados Unidos (75) e na Coreia (76), entre outros países que recebem indivíduos que estiveram em áreas endêmicas.

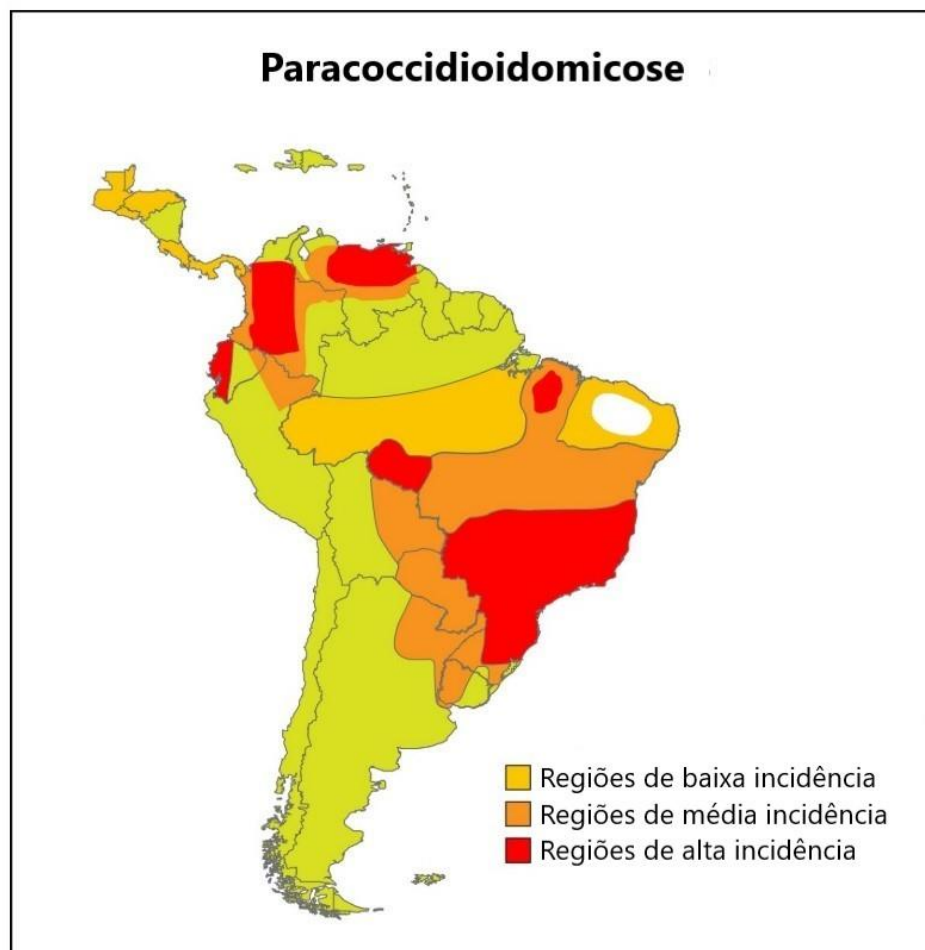


Figura 7. Distribuição da paracoccidioidomicose na América Latina.

Fonte: adaptado de Griffiths et al. (2019) (2).

No Brasil, ocorrem casos de PCM em todas as regiões geográficas. Apesar disso, a doença ainda não está incluída na Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública. Assim, não existem dados oficiais e precisos acerca da epidemiologia da PCM no Brasil (3). No país, a primeira região endêmica reconhecida foi a Sudeste, principalmente devido à agricultura extensiva nas plantações de café, durante a primeira metade do século 20 (77). Apesar de apresentar estados com áreas hiperendêmicas, como é o caso de Botucatu e Ribeirão Preto, em São Paulo (78,79), o único estado da região sudeste que apresenta notificação compulsória da PCM é Minas Gerais (3). A partir da Região Sudeste, com o movimento de migração interna e expansão das fronteiras agrícolas para o Centro-Oeste e Norte, a área de endemia se estabeleceu nessas áreas (77). No Centro-Oeste, há notificação compulsória nos estados do Mato Grosso e Goiás (3). Já na Região Norte, o estado de Rondônia se destaca no número de casos de PCM, também apresentando notificação da PCM (3,80). Além disso, novas áreas hiperendêmicas têm sido descritas, como na área da Bacia

Araguaia-Tocantins (81). No Nordeste, casos de PCM são raros, possivelmente devido ao clima semiárido da região, que reduz a ocorrência ambiental do fungo. Existem alguns relatos de casos autóctones no estado do Ceará (82,83), Maranhão e Piauí (84).

Na região Sul, há áreas de média a alta incidência. Como destaque, o estado do Paraná apresenta notificação compulsória da PCM desde o ano 2000, o que permite a obtenção de dados fundamentais como incidência anual e taxa de mortalidade (85). No Rio Grande do Sul, a literatura sobre casos de PCM é muito esparsa, e a maior parte dos estudos são antigos e têm acesso limitado, por estarem em repositórios físicos. Recentemente, realizamos um levantamento desses estudos, publicados entre 1942, quando foram registrados os primeiros casos de PCM no estado, até 2023 (86). Constatamos a ocorrência de casos em ao menos 30% dos municípios do estado (Figura 8), com predomínio na região norte. Contudo, é importante destacar que esse dado pode estar enviesado devido à distribuição desigual do número de estudos. Assim, é fundamental a implementação de um sistema de vigilância da PCM no estado.

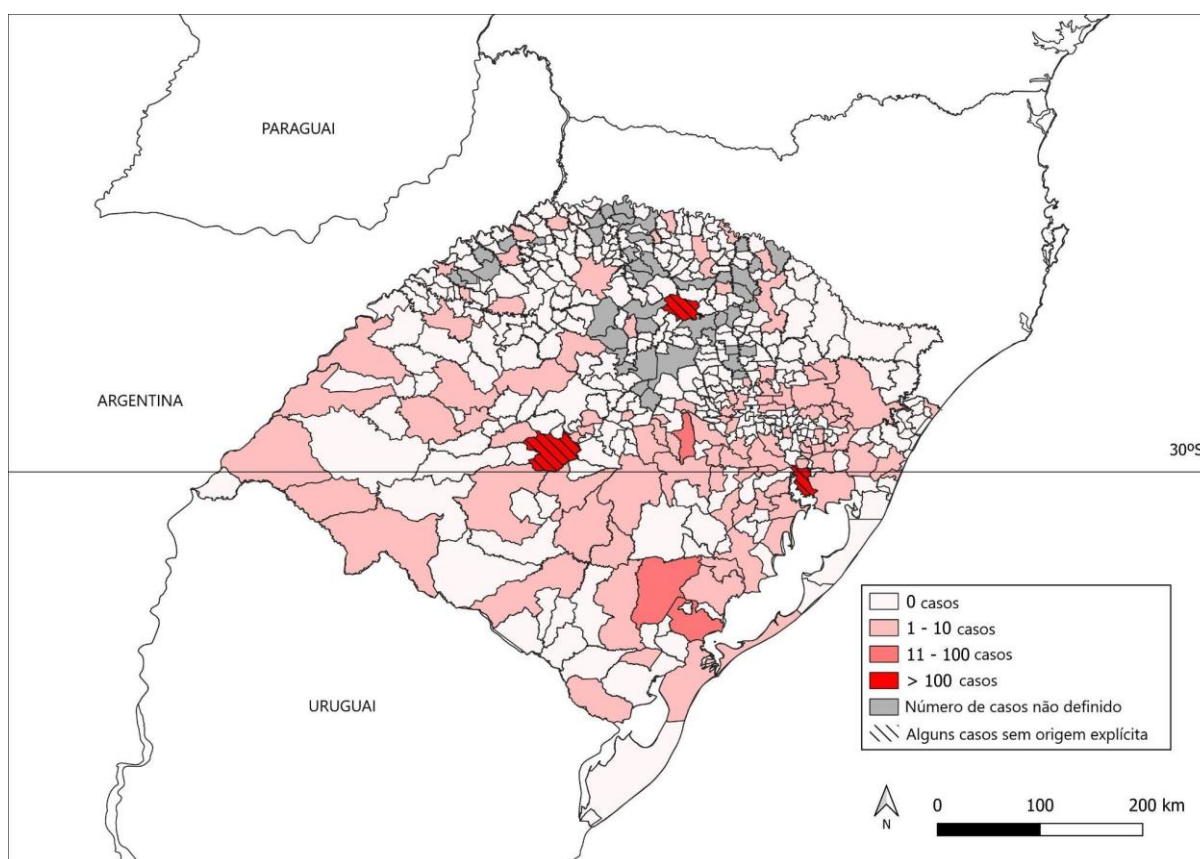


Figura 8. Distribuição geográfica de 901 casos de paracoccidioomicose, publicados em 52 estudos no estado do Rio Grande do Sul, entre 1942 e 2023.

Fonte: adaptado de Koehler, Scroferneker (2024) (86).

Atualmente, estima-se que 10 milhões de latino-americanos estejam infectados pelo fungo e, destes, cerca de 1 a 10% desenvolvem alguma manifestação clínica da doença, de semanas a décadas após a exposição inicial (71). Esse é um dos fatores que dificulta a determinação precisa da distribuição da PCM e dos fungos do gênero *Paracoccidioides* na natureza, pois muitas vezes há dificuldade em determinar em qual local e data o paciente se infectou (8). Isso é possível principalmente nos casos de doença aguda, nos quais o lapso temporal entre a exposição ao fungo e o início dos sintomas é muito menor (1). Assim, há estudos associando *clusters* de casos de PCM aguda com anomalias climáticas, como eventos extremos de El Niño (45,87). Ademais, grandes alterações antropogênicas no meio ambiente, como a construção de rodovias (88) e usinas hidrelétricas (87), também são potenciais responsáveis por surtos de PCM, por aumentar a exposição das pessoas ao fungo devido ao desmatamento e remoção de terra (36).

Apesar das dificuldades no estabelecimento da epidemiologia da PCM, existem características típicas, como o fato de ser considerada uma doença ocupacional em pessoas que trabalham em contato com o solo (77). Os mais afetados são agricultores, mas também é comum em trabalhadores da construção civil, jardineiros, lenhadores, mineiros, entre outros (72). Além disso, há predomínio de casos em homens entre 40 e 60 anos de idade, com uma relação de casos em homens:mulheres que pode chegar a 22:1 (1). Isso ocorre devido aos estrogênios, que fornecem uma proteção adicional ao desenvolvimento da PCM (89). Por isso, antes da puberdade, a PCM afeta igualmente homens e mulheres (90). No quesito cor ou raça, há dificuldades no estabelecimento de uma tendência nos casos de PCM, pois existe uma grande miscigenação nas populações das áreas endêmicas (72). Apesar disso, diversos estudos com séries de casos mostram uma grande quantidade de indivíduos brancos afetados. Recentemente, um grupo de pesquisadores demonstrou uma diferença estatisticamente significativa no número de casos de PCM entre indivíduos brancos e não-brancos, sugerindo uma maior suscetibilidade daqueles (91). Alcoolismo e tabagismo também representam importantes fatores predisponentes, especialmente se associados (92,93). Alguns fatores genéticos também têm sido associados à suscetibilidade para desenvolvimento da PCM (94,95).

Estima-se que a incidência anual da PCM no Brasil varie de 1 a 4 casos por 100.000 habitantes, nas áreas endêmicas do Sudeste e do Sul (9,79,96). Porém, esses números podem estar subestimados, pois baseiam-se primariamente em registros de prontuários e séries de casos. Por exemplo, na região Norte, há municípios do estado de Rondônia que apresentam incidência anual de quase 40 casos por 100.000 habitantes (80). Além do grande número de casos no Brasil, a PCM apresenta uma considerável morbidade hospitalar e mortalidade. No

período de 1998 a 2006, houve 6732 hospitalizações devido à doença no país, representando 4,3 hospitalizações por 1 milhão de habitantes (97). Em relação à mortalidade, entre 1980 e 1995, um estudo de 3181 óbitos devido à PCM no Brasil mostrou uma média anual de 1,45 mortes/milhão de habitantes (98). Assim, a PCM teve a maior taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas, o que também foi evidenciado em estudos posteriores, que analisaram os períodos de 1996 a 2006 (99) e de 2003 a 2013 (100). Já entre todas as doenças crônicas infecciosas e parasitárias, a PCM representa a oitava causa de morte no Brasil (98). Alguns outros estudos fizeram análises estaduais da mortalidade da PCM, como no Paraná, com média anual de 3,48 mortes/milhão de habitantes (entre 1980 e 1998) (101), e em São Paulo, com 1,63 mortes/milhão de habitantes (entre 1985 e 2005) (102). Sabe-se que há uma tendência atual de redução de mortes por PCM nas regiões Sul e Sudeste, e aumento na região Norte (9). No entanto, ressalta-se novamente que não existe muita literatura sobre indicadores básicos da epidemiologia da PCM no Brasil, devido à falta de notificação compulsória da doença na maior parte das unidades federativas.

2.2.5 Manifestações clínicas

A PCM é adquirida essencialmente através da inalação de propágulos fúngicos (conídios e fragmentos de micélio) que estão presentes no meio ambiente (Figura 5) (103). De forma rara, pode ocorrer inoculação cutânea do fungo, existindo alguns relatos escassos na literatura (1,104). Com a inalação e, ao chegar nos bronquíolos terminais, o fungo se converte em sua forma leveduriforme, devido à temperatura corporal. Assim, se inicia a multiplicação das células fúngicas no tecido pulmonar e a consequente ativação do sistema imune adaptativo, com uma resposta inflamatória granulomatosa. Na maior parte dos casos (mais de 90%), esse processo elimina efetivamente o fungo, sem deixar lesões significativas (105). Porém, a partir da PCM pulmonar primária, podem ocorrer outros quatro desfechos, muito menos frequentes, mas com relevância clínica (105). Esses desfechos, com suas condições subsequentes, estão esquematizados na Figura 9.

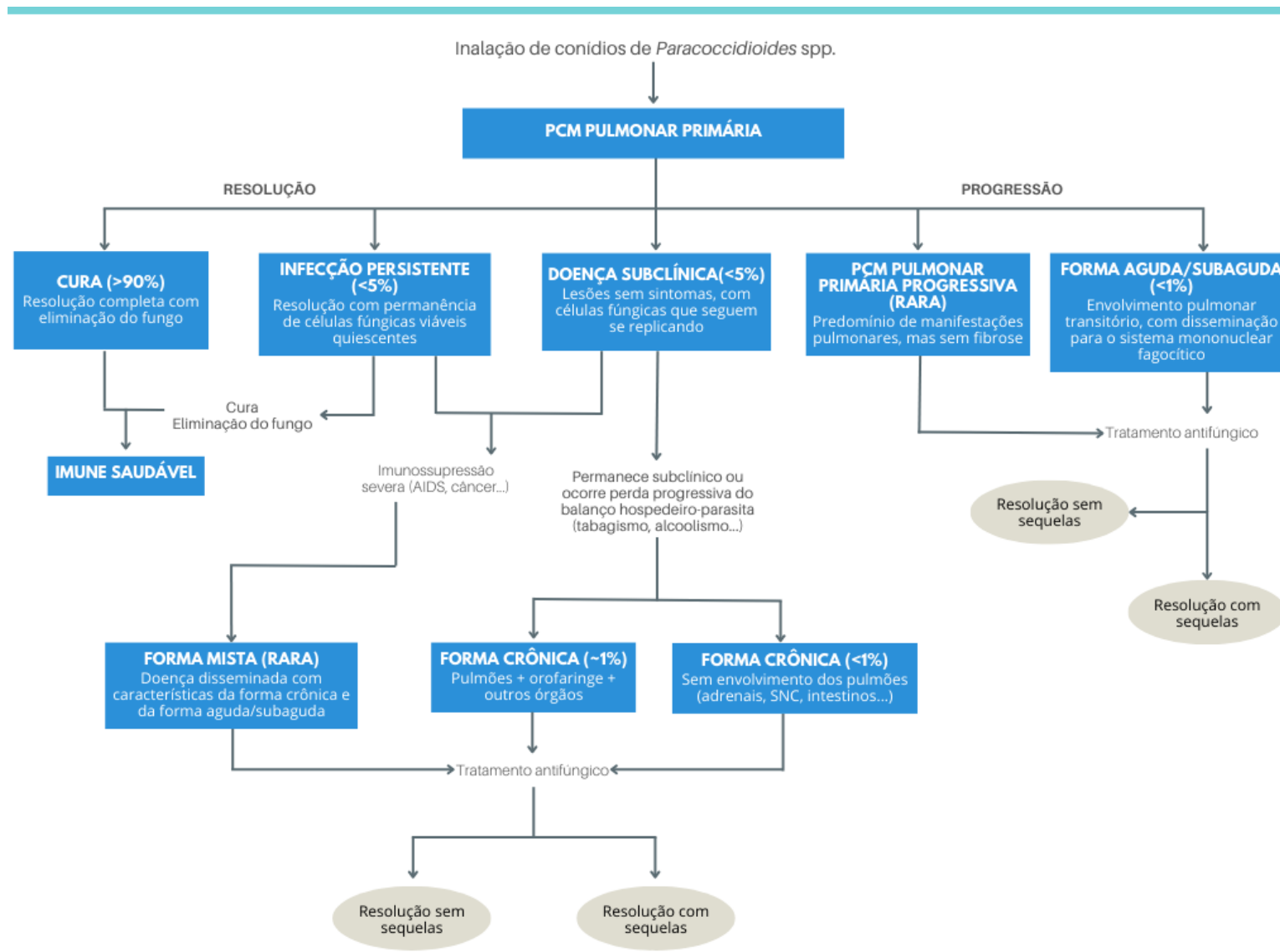


Figura 9. Esquema da história natural/patogênese da interação entre *Paracoccidioides* spp. e o hospedeiro humano, mostrando os principais desfechos clínicos em **negrito** nos retângulos azuis. Os números nos parênteses indicam a frequência estimada de cada desfecho. Abreviações: SNC, sistema nervoso central

Fonte: autoria própria, elaborado a partir da tradução de esquema de Benard (2020) (105).

A forma clínica mais frequente da PCM é a crônica, que evolui a partir da doença subclínica. O desfecho da doença subclínica se encontra no ponto médio da Figura 9, entre os ramos de resolução e de progressão da PCM, pois pode tanto permanecer subclínica como progredir para a forma crônica (105). Essa forma, que representa de 74 a 96% dos casos de PCM, apresenta-se principalmente em adultos do sexo masculino da faixa etária entre 30 e 60 anos (8). Já a forma aguda/subaguda, responsável por 5 a 25% dos casos de PCM, predomina em crianças, adolescentes e adultos jovens, sendo também conhecida como forma juvenil. Nesses casos, a distribuição entre os sexos é praticamente igual (8). As formas crônica e aguda/subaguda são as formas classicamente reconhecidas da PCM, de acordo com o sistema de classificação mais aceito, que foi proposto em 1987 (106) (Figura 10). Nele, também é reconhecida a forma residual, representada pelas sequelas frequentes nos casos de PCM. As principais sequelas são pulmonares, com destaque para fibrose e enfisema (107). Sequelas também ocorrem com frequência na laringe, causando distúrbios da voz (108,109), e na pele e cartilagens, causando deformidades (110). Virtualmente, qualquer órgão afetado na PCM pode desenvolver sequelas (1). Além da classificação das formas clínicas, também há a classificação da severidade, baseada em determinadas características clínicas que cada paciente apresenta (1), e que não será discutida em maiores detalhes nesta revisão.

1. PARACOCCIDIOIDOMICOSE - INFECÇÃO

2. PARACOCCIDIOIDOMICOSE - DOENÇA

2.1 Forma aguda/subaguda (juvenil)

2.1.1 Moderada

2.2.2 Severa

2.2 Forma crônica (adulto)

2.2.1 Unifocal

- Leve

- Moderada

- Severa

2.2.2 Multifocal

- Leve

- Moderada

- Severa

3. FORMA RESIDUAL (SEQUELAS)

Figura 10. Classificação mais utilizada da paracoccidioidomicose, proposta em 1987.

Fonte: autoria própria, elaborado a partir da tradução de tabela de Franco et al. (1987) (106).

Entretanto, apesar de esta ser a classificação atualmente utilizada, diversos casos não se encaixam em nenhum dos tipos da PCM estabelecidos nela. Assim, em 2020, Benard realizou uma revisão para propor uma nova classificação, que abrange todos os possíveis desfechos clínicos da PCM (Figura 11) (105), e que resume o esquema da história natural da PCM mostrada na Figura 9. Ademais, Benard questionou a visão atual da principal forma clínica da doença, a crônica. A visão atualmente aceita é que a forma crônica da PCM ocorre pela reativação repentina de focos de células fúngicas, que permaneceram inativadas durante anos ou décadas. Benard propôs que, ao contrário disso, há um contínuo entre a PCM pulmonar primária e a forma crônica, com a replicação baixa, mas persistente, das células fúngicas em focos subclínicos. No entanto, mais estudos imunológicos são necessários para compreender por que alguns indivíduos não conseguem eliminar a infecção por completo (105). Apesar de ainda predominar o uso da classificação tradicional (Figura 10), considerou-se relevante trazer nesta revisão da literatura a nova classificação proposta, pois é importante para melhor caracterizar e manejar clinicamente os pacientes com PCM.

INFECÇÃO ASSINTOMÁTICA	<ul style="list-style-type: none"> • Imune saudável • Infecção persistente • Doença subclínica
DOENÇA PROGRESSIVA PRIMÁRIA	<ul style="list-style-type: none"> • Forma aguda/subaguda <ul style="list-style-type: none"> • Envolvimento linfático • Envolvimento ósseo • Envolvimento pulmonar
DOENÇA PÓS-PRIMÁRIA	<ul style="list-style-type: none"> • Forma crônica <ul style="list-style-type: none"> • Pulmonar • Extrapulmonar • Disseminada • Forma mista <ul style="list-style-type: none"> • Pacientes imunossuprimidos
PÓS-TRATAMENTO	<ul style="list-style-type: none"> • Recuperação completa • Sequelas <ul style="list-style-type: none"> • Fibrose pulmonar • Insuficiência adrenal • Estenose da laringe • Disfonia • Microstomia, etc

Figura 11. Nova classificação proposta para a paracoccidiodomicose, de acordo com revisão de Benard (2020).

Fonte: autoria própria, elaborado a partir de tradução de tabela de Benard (2020) (105).

Independentemente da classificação utilizada, a PCM é uma doença polimórfica, que pode afetar qualquer órgão ou sistema do corpo humano (8). Na Tabela 3, resumiu-se o envolvimento de órgãos/tecidos em 1757 casos de PCM e, na Figura 12, estão ilustradas algumas manifestações clínicas da PCM. Na forma crônica, o comprometimento pulmonar está presente na maioria dos pacientes, em um percentual que pode chegar a 90%. O envolvimento da mucosa das vias aerodigestivas superiores e da pele também é frequente (8). A forma aguda/subaguda, diferentemente da forma crônica, tem evolução rápida, com disseminação do fungo a múltiplos órgãos. A maior parte dos casos apresenta envolvimento do sistema fagocítico-mononuclear, destacando-se como principal sintoma a linfadenomegalia localizada ou generalizada (8). O envolvimento dos pulmões nessa forma clínica é controverso, supondo-

se que é mais comum do que usualmente reconhecido (105). De fato, nos três estudos levantados na Tabela 3, observa-se que houve um envolvimento considerável dos pulmões nos casos agudos/subagudos, ficando atrás apenas da porcentagem de envolvimento dos linfonodos.

Tabela 3. Frequência de órgãos/tecidos envolvidos em 1757 casos de paracoccidiodomicose, publicados em séries de casos de três países endêmicos: Brasil (N = 546), Venezuela (N = 745) e Argentina (N = 466).

Órgãos/tecidos envolvidos	Total casos		Forma clínica			
	N = 1757	%	Aguda/subaguda N = 200		Crônica N = 1557	
			n	%	n	%
Adrenais	39	2,2	2	1	37	2,3
Amídalas	15	0,8	0	0	15	0,9
Baço	23	1,3	21	10,5	2	0,1
Fígado	27	1,5	24	12	3	0,2
Genitais	9	0,5	1	0,5	8	0,5
Laringe	128	7,3	0	0	128	8,2
Linfonodos	138	7,8	110	55	28	1,8
Mucosa orofaríngea	879	50,1	16	8	863	55,4
Osteoarticular	8	0,4	5	2,5	3	0,2
Pálpebra	16	0,9	1	0,5	15	0,9
Pele	542	30,8	46	23	496	31,8
Pulmões	1405	79,9	92	46	1313	84,3
Sistema nervoso central	43	2,4	5	2,5	38	2,4

Fonte: Peçanha et al. (2017) (111); Alvarado et al. (2021) (112); Giusiano et al. (2023) (113).

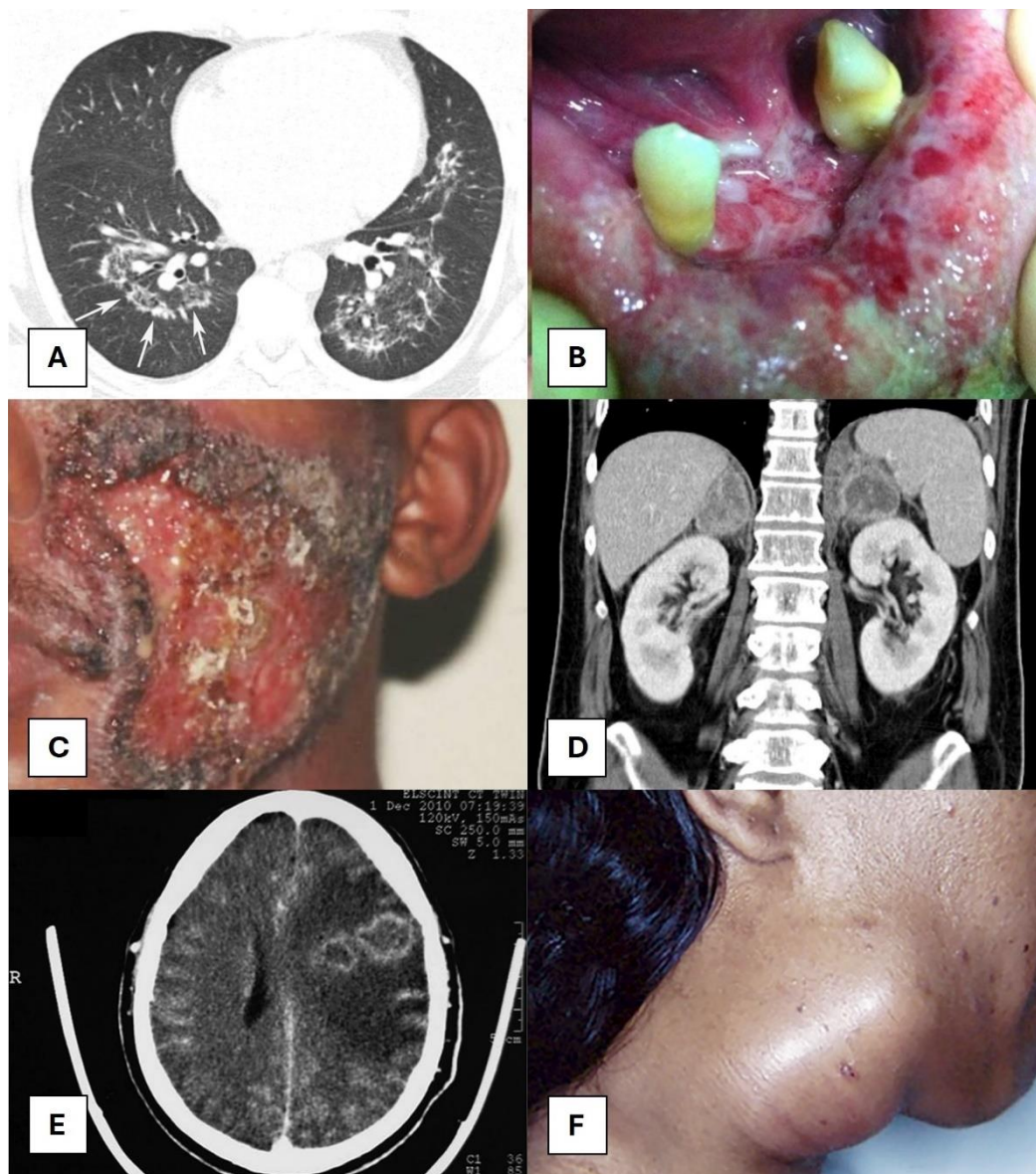


Figura 12. Algumas manifestações clínicas da PCM. (A) Pulmões; (B) Mucosa bucal; (C) Pele; (D) Adrenais; (E) Sistema nervoso central; (F) Linfonodos.

Fonte: A – Barreto et al. (2015) (114); B – Koehler et al. (2022) (96); C – de Macedo et al. (2017) (115); D – Wagner et al. (2016) (116); E – Hahn et al. (2022) (6); F – Hahn et al. (2022) (6).

Por ser polimórfica, a PCM apresenta uma extensa lista de diagnósticos diferenciais. Na forma aguda, os principais são linfoma, leucemia, histoplasmose, tuberculose, toxoplasmose, leishmaniose visceral e mononucleose infecciosa. Já na forma crônica, os principais são leishmaniose cutânea ou mucosa, tuberculose, cromoblastomicose, hanseníase, sarcoidose, neoplasias, coccidioidomicose e histoplasmose (8). Quando há manifestações pulmonares, é comum a suspeita inicial de tuberculose (116) e, quando há manifestações na mucosa

orofaríngea, frequentemente ocorre suspeita inicial de se tratar de carcinoma (96). Além de atrasar o início do tratamento, o diagnóstico equivocado da PCM pode piorar o quadro clínico do paciente. Isso ocorreu, por exemplo, em casos de diagnóstico incorreto de doença de Crohn (117) e sarcoidose (118), cujos tratamentos foram realizados com terapia imunossupressora e corticosteroides, respectivamente, piorando as manifestações clínicas da PCM. Além da lista de diagnósticos diferenciais, a PCM pode ocorrer associada com outras doenças, como criptococose (119,120), histoplasmose (121,122), lobomicose (123), leishmaniose (124), HIV (125,126), COVID-19 (127) e hanseníase (128).

2.2.6 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico precoce da PCM é fundamental para evitar maiores sequelas e garantir uma melhor efetividade do tratamento (70,129); em consequência, quando ocorre tardiamente, contribui para o aumento das taxas de morbidade e mortalidade (9). Existem diversos métodos para diagnosticar a PCM (Figura 13), os quais serão discutidos nos subitens abaixo. Entretanto, nem sempre a doença é reconhecida rapidamente, pois algumas vezes os profissionais da saúde, mesmo de áreas endêmicas, não estão familiarizados com seus sinais clínicos (9). Isso evidencia o aspecto negligenciado da PCM, assim como ocorre com diversas outras doenças fúngicas (129).

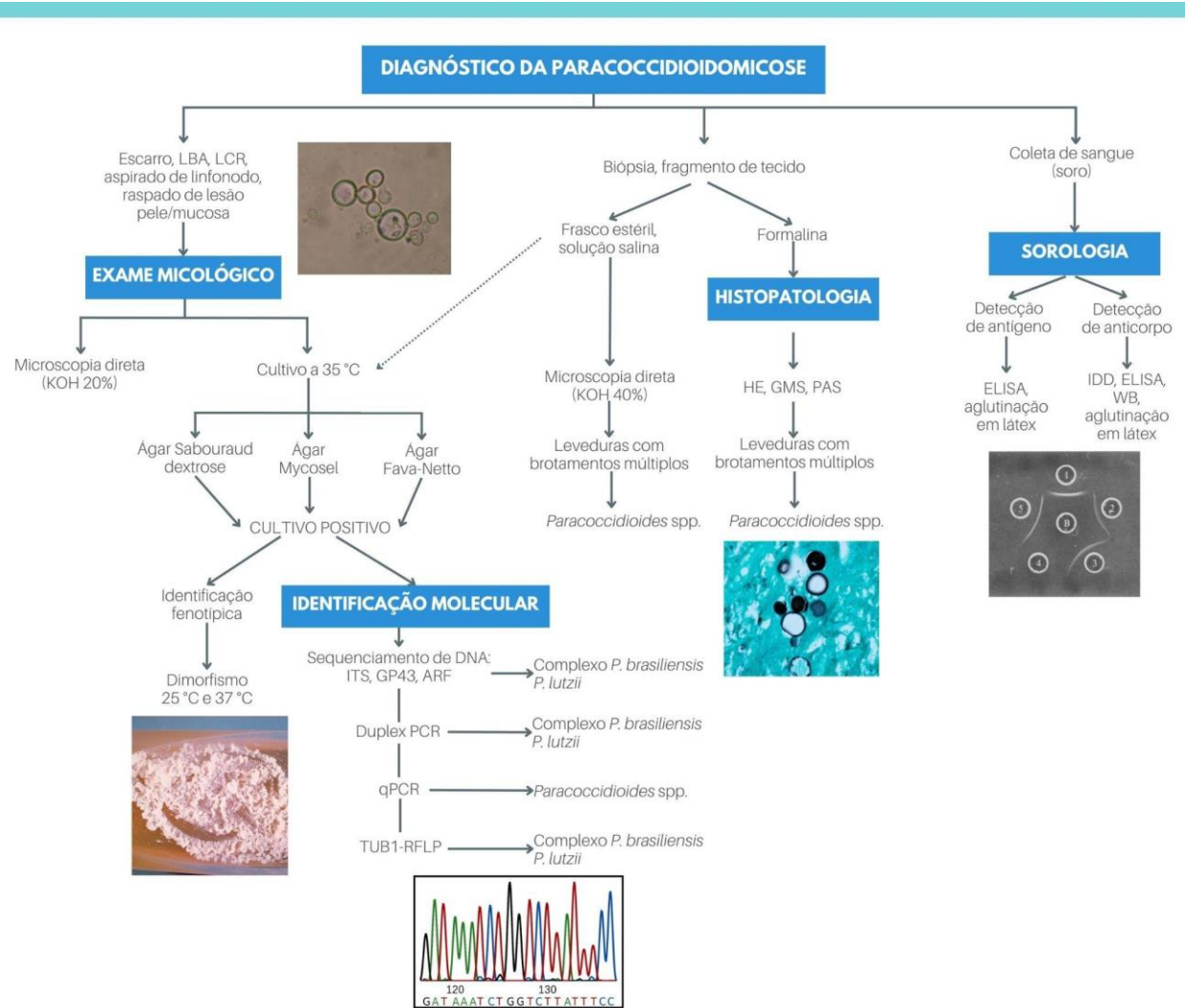


Figura 13. Esquema do diagnóstico laboratorial da paracoccidioidomicose. Abreviaturas: LBA, lavado broncoalveolar; LCR, líquido cefalorraquidiano; HE, hematoxilina-eosina; PAS, ácido periódico de Schiff; ELISA, ensaio de imunoabsorção enzimática; IDD, imunodifusão dupla; WB, Western Blot.

Fonte: autoria própria, adaptado de Hahn et al. (2022) (6).

2.2.6.1 Diagnóstico micológico

O “padrão ouro” para diagnóstico da PCM é a visualização de estruturas fúngicas compatíveis com *Paracoccidioides* sp. em amostras clínicas diversas (10). Existem diferentes técnicas para essa visualização, que serão descritas abaixo. Apesar de ser o “padrão ouro”, o diagnóstico micológico apresenta limitações, pois exige profissionais experientes para análise dos exames, e pode levar um longo tempo no caso de cultivo. Essas análises também não permitem a diferenciação entre as espécies do gênero *Paracoccidioides*, pois elas não

apresentam diferenças morfológicas. Além disso, há o risco inerente de lidar com um fungo patogênico humano em ambiente laboratorial (10).

2.2.6.1.1 Exame microscópico direto e cultivo

O exame microscópico direto pode ser feito em diferentes amostras, como escarro, raspados de lesões de pele e mucosas, lavado broncoalveolar, aspirados de linfonodo, líquido cefalorraquidiano, entre outras (6,10). Ele é feito usualmente com clarificação com hidróxido de potássio a 10% (KOH) ou hidróxido de sódio a 4% (NaOH), para visualização das células fúngicas. Tipicamente, *Paracoccidioides* sp. apresenta células grandes (3 a 30 μ M de diâmetro), com brotamentos múltiplos e parede celular dupla bastante birrefringente (Figura 4D). A visualização dessas estruturas confirma o diagnóstico de paracoccidioidomicose (6,130).

Para o isolamento e cultivo de *Paracoccidioides* sp. a partir de amostras clínicas, podem ser utilizados diferentes meios: ágar Mycosel (BBL) ou ágar Mycobiotic (Difco), que são ágar Sabouraud suplementado com cicloheximida e cloranfenicol; ágar SABHI (Difco), que é ágar Sabouraud suplementado com Caldo Infusão Cérebro e Coração; ágar extrato de levedura; meio de Fava-Netto, um meio rico desenvolvido especificamente para *Paracoccidioides* sp.; entre outros (1,6). Após o crescimento, para que seja confirmado o diagnóstico, é necessário realizar a transformação da fase micelial para a fase leveduriforme (Figura 4A e 4C) (10). Isso é feito através da semeadura do fungo no meio de Kelley (baseado em ágar sangue) ou de Fava-Netto e incubação a 35-37 °C, o que induz a formação das típicas colônias cerebriformes (6). Destaca-se que o isolamento de *Paracoccidioides* sp. em cultivo não é realizado rotineiramente para diagnóstico, pois seu crescimento é lento, variando de duas a quatro semanas para que suas colônias comecem a aparecer. Além disso, no caso de não crescer nenhuma colônia típica de *Paracoccidioides* sp., é necessário manter o cultivo por seis semanas para que este seja considerado realmente negativo, pois alguns isolados do fungo requerem incubação prolongada para crescimento (130).

2.2.6.1.2 Citopatologia e histopatologia

Uma alternativa para o exame microscópico direto é o exame citopatológico, com esfregaço e coloração específica para evidenciar o fungo. Além disso, também é possível realizar a inclusão da amostra em bloco de parafina (131,132). Apesar de apresentar maior

sensibilidade (132), essa técnica é mais dispendiosa e demorada, sendo indicada apenas quando o exame microscópico direto é negativo e ainda há suspeita de PCM (1).

Já o exame histopatológico é muito útil no diagnóstico da PCM (10,133), realizado a partir de biópsia para coleta de fragmentos de tecido, com sensibilidade maior que 95% (9). A inclusão do tecido em um bloco de parafina permite que sejam analisadas diferentes seções e áreas da lesão, a fim de avaliar a resposta imunológica do hospedeiro e buscar células fúngicas típicas.

Diferentes colorações podem ser utilizadas, inclusive a coloração básica de hematoxilina-eosina (HE), que permite analisar as características do tecido e detectar a presença de células fúngicas. No entanto, colorações a base de prata, como a coloração de metenamina de prata de Grocott-Gomori (ou GMS), são as mais úteis para evidenciar as estruturas do fungo, pois as impregnam fortemente com uma cor escura (Figura 14A). Outras colorações especiais também podem ser utilizadas, como a do ácido periódico e reativo de Schiff (PAS), que cora de magenta o protoplasma das células fúngicas, através de uma reação com grupos açúcar presentes, enquanto a parede celular do fungo não é corada (Figura 14B) (1,11,133).

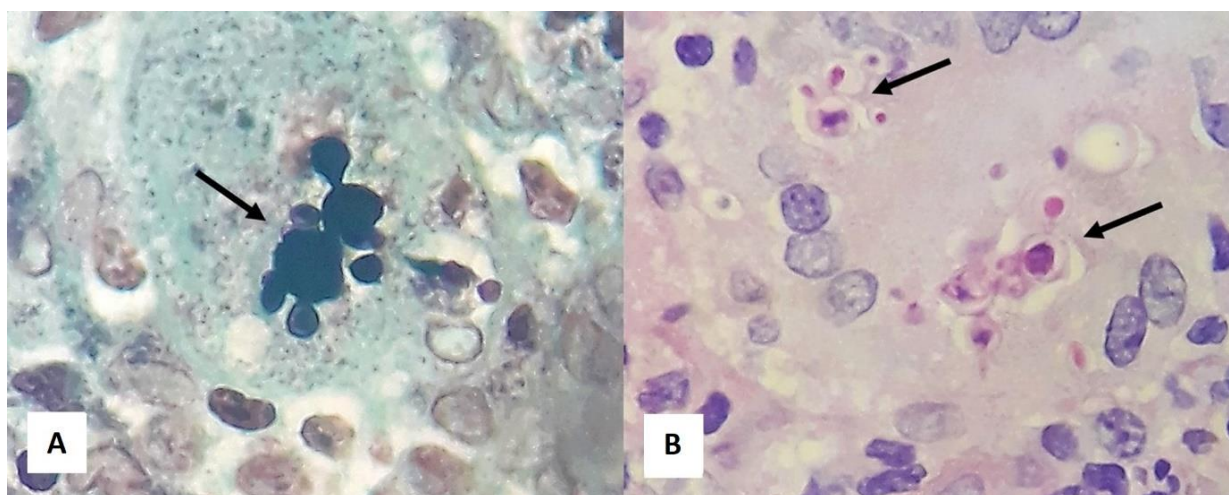


Figura 14. Exame histopatológico mostrando as células típicas de *Paracoccidioides* sp. (setas), com coloração de Grocott-Gomori (A) e PAS (B).

Fonte: Koehler et al. (2022) (96).

2.2.6.2 Diagnóstico sorológico

Os testes sorológicos já são utilizados há várias décadas para auxiliar no diagnóstico e manejo clínico de pacientes com PCM (134), podendo ser usados para detecção de anticorpos

ou antígenos circulantes em diversos fluidos biológicos (1). Nesta revisão, serão discutidos apenas métodos para detecção de anticorpos, devido a sua maior relevância.

De acordo com as definições do Consenso Brasileiro de Paracoccidioidomicose (8,135), a detecção de títulos de anticorpos anti-*Paracoccidioides* não é o suficiente para confirmar um caso de PCM, mas o torna provável. Ademais, os testes sorológicos podem ser utilizados para classificar a severidade da doença, além de monitorar a resposta ao tratamento e indicar a cura do paciente (1). Existem diversos métodos sorológicos baseados em antígenos e anticorpos para diagnóstico da PCM. Algumas das técnicas relevantes a serem citadas são a imunodifusão dupla em gel de ágar (IDD), a contraímunoeletroforese (CIE), os imunoensaios baseados em enzimas (ELISA), a técnica de *western blotting* e o teste de aglutinação do látex (teste LA) (9). Destes, o teste mais utilizado é a IDD, pela sua simplicidade, por não necessitar de equipamentos de maior custo e por apresentar bons resultados, com sensibilidade maior que 80% e especificidade maior que 90% (8).

A IDD consiste basicamente no preparo de um meio gelificado, com a aplicação de ágar sobre uma lâmina de vidro. Após a solidificação, são feitos orifícios no ágar, para permitir que as amostras sejam adicionadas. Usualmente, o antígeno é adicionado no orifício central, enquanto as amostras de soro são adicionadas nos orifícios periféricos (Figura 15). Se a amostra é positiva, o antígeno e o anticorpo se difundem no ágar um em direção ao outro, até ocorrer a precipitação do imunocomplexo, formando uma linha de precipitação. Com essa técnica, também é possível realizar a titulação do soro, que consiste na sua diluição em proporções 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 e assim por diante. Essas diluições são aplicadas nos orifícios periféricos da lâmina com ágar, e o título de anticorpo corresponde à maior diluição onde ocorreu linha de precipitação (136). O título de anticorpos na PCM apresenta correlação com a gravidade do caso, apresentando-se mais elevado nas formas disseminadas e na forma clínica aguda/subaguda (8). Casos falso-negativos podem ocorrer na IDD, principalmente em pacientes severamente imunocomprometidos. Nesses casos, não há anticorpos suficientes para precipitar no teste. Após um período inicial de tratamento, a imunidade é restaurada e o teste de IDD se torna positivo (134).

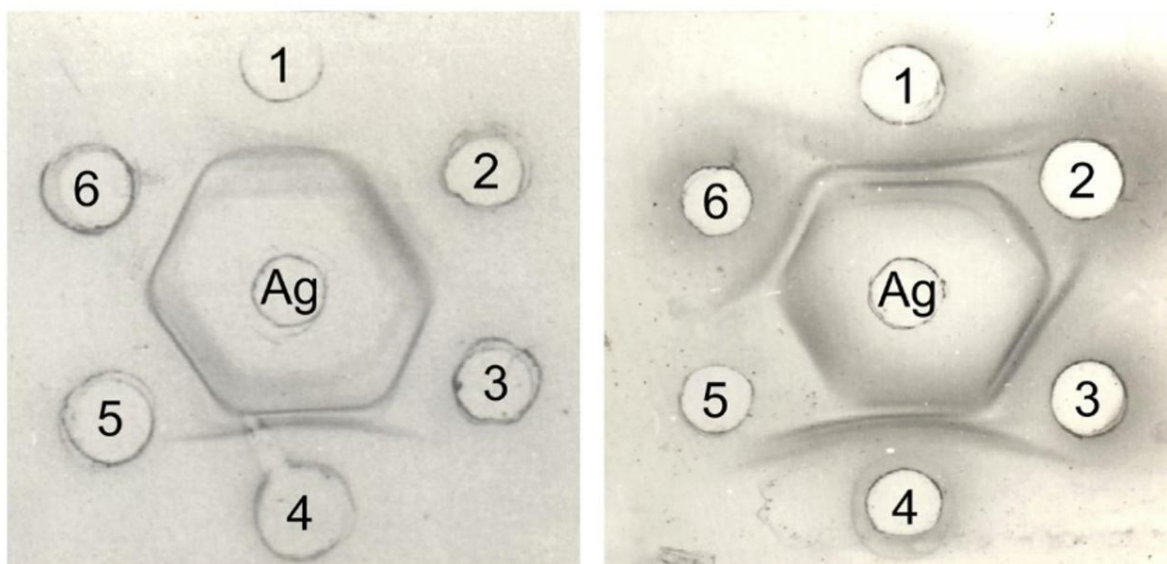


Figura 15. Teste de imunodifusão dupla em gel de ágar (IDD).

Fonte: Hahn et al. (2022) (6).

Apesar de apresentarem bons resultados, a acurácia dos testes sorológicos da PCM tem grande variação. Por exemplo, apesar de usualmente apresentar boa sensibilidade, esta pode variar de 65% a 100% nos testes de IDD (137). Além da variação na acurácia, os testes sorológicos podem apresentar resultados discrepantes. Um estudo multicêntrico de seis centros brasileiros de referência para diagnóstico sorológico da PCM demonstrou uma grande discordância de resultados entre eles. Em todos os centros, foram encontradas discordâncias consideráveis entre os títulos de anticorpos, as quais podem influenciar nas decisões de tratamento do paciente. Para compreender os motivos dessas discrepâncias, foram analisadas a técnica empregada e o tipo de antígeno utilizado, evidenciando-se que esses fatores, entre possíveis outros, influenciam na acurácia dos resultados (138).

Um dos principais fatores que interferem na acurácia dos testes sorológicos é, indubitavelmente, o antígeno utilizado. Para detecção de anticorpos, idealmente é necessária a utilização de um antígeno que reaja com anticorpos de pacientes infectados com qualquer espécie do gênero *Paracoccidioides*, além de ter baixa reatividade com soro de pacientes com outras doenças fúngicas (139). Desde 1916, quando Moses propôs o uso de uma preparação antigênica baseada em um extrato salino de *P. brasiliensis* para diagnóstico sorológico da PCM (140), uma ampla gama de antígenos já foi proposta para esse fim. Entre estes, pode-se citar os antígenos gp43, p27, gp70, hsp60 e hsp87 (10,141). Destes, o de maior relevância é o gp43, baseado em uma glicoproteína de 43.000 Da, que é o antígeno imunodominante e é considerado

específico para *P. brasiliensis* (134,142) (Figura 16). Essa molécula é secretada no meio exocelular e seu gene foi o primeiro a ser completamente caracterizado em *P. brasiliensis*, sendo denominado PbGP43 (143).

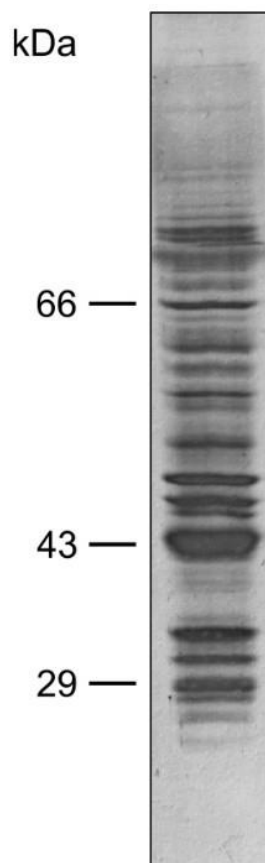


Figura 16. SDS-PAGE (do inglês *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) do exoantígeno de *P. brasiliensis* mostrando seu principal antígeno, a glicoproteína gp43, de 43.000 Da.

Fonte: Hahn et al. (2022) (6).

Apesar do gp43 ser o antígeno usual para diagnóstico da PCM, este é preparado de maneiras diferentes em cada laboratório, pois não existe um protocolo padrão para sua produção. Diversos aspectos contribuem para essa variabilidade: o isolado fúngico, o meio de cultivo, o tamanho do inóculo, o tempo de incubação, entre outros (134). Até para um mesmo isolado, as características do antígeno podem variar, dependendo do número de subcultivos já realizados, do meio utilizado e da fase de crescimento do cultivo (138,144). Isso leva a uma variação na atividade e qualidade dos antígenos, comprometendo a acurácia dos testes (134). Existem esforços para padronização, como o antígeno Ag7, preparado a partir de amostra de *P. brasiliensis*, com grandes quantidades de gp43, alta sensibilidade, especificidade e acurácia

(134). No entanto, a falta de padronização segue sendo uma problemática, tanto para o gp43 quanto para os outros antígenos que podem ser utilizados para o diagnóstico da PCM.

Outra questão, além do protocolo utilizado para produção do antígeno, é sobre o seu uso na forma bruta ou purificada. Uma metanálise dos testes imunológicos para diagnóstico da PCM verificou que a validade diagnóstica dos testes utilizando antígenos brutos ou gp43 purificado é semelhante, e que ambos apresentaram resultados satisfatórios (141). Porém, o uso de antígenos brutos é relacionado com baixa especificidade dos testes, pois contêm componentes inespecíficos com alta variabilidade, que podem reagir com soros de pacientes com outras micoses sistêmicas, como histoplasmose (6,10). Assim, há uma tendência em substituir o uso de antígenos brutos por sua forma purificada ou produzida com proteínas recombinantes, melhorando sua especificidade (1,145,146). Entretanto, essas técnicas são caras, o que limita seu uso (1).

Além de todos os fatores já elencados, outra problemática no diagnóstico sorológico da PCM foram os avanços na caracterização do gênero *Paracoccidioides*, com o reconhecimento de ao menos cinco espécies que causam a doença (137). Já foi verificado que, para *P. brasiliensis*, *P. americana* e *P. restrepiensis*, o soro dos pacientes infectados com essas espécies reage positivamente com antígenos produzidos a partir de qualquer uma delas, pois essas espécies apresentam perfis de proteínas semelhantes, com predomínio antigênico da glicoproteína gp43 (147,148). O mesmo não ocorre para *P. lutzii*, cujos resultados dos testes sorológicos são usualmente falso-negativos quando utilizados antígenos de outras espécies do gênero *Paracoccidioides* (147,149). Diferenças regionais nos testes sorológicos, principalmente no soro de pacientes da região Centro-Oeste do Brasil, local de maior ocorrência de *P. lutzii*, já eram observadas antes mesmo da descrição da espécie (149). Isso se deve, principalmente, ao fato de os isolados de *P. lutzii* produzirem baixas quantidades de gp43; então, pacientes infectados com isolados dessa espécie não apresentam anticorpos específicos para esse antígeno (150). Assim, em regiões de ocorrência de *P. lutzii*, é fundamental a utilização de um antígeno específico da espécie para o diagnóstico sorológico. Portanto, não é recomendado que seja utilizada apenas uma preparação antigênica, considerando a grande variabilidade dos agentes etiológicos da PCM (150).

Desde o reconhecimento de *P. lutzii*, diferentes antígenos vêm sendo estudados para o diagnóstico de casos de PCM causados por essa espécie. Os seus principais antígenos são seis isoformas de uma enolase associada à superfície, com peso molecular na faixa de 54.000 Da (151). Assim, é importante que essas moléculas estejam presentes em preparações antigênicas para diagnóstico da PCM (6). Já foi proposto um preparo de antígeno *cell-free* (CFA) a partir

de um isolado de *P. lutzii*. O CFA corresponde a moléculas que são secretadas a partir da parede celular, se aderem na superfície da célula fúngica e então são liberadas durante o preparo do antígeno. Esse antígeno apresentou bons resultados na imunodifusão com soro de pacientes com PCM causada por *P. lutzii*. Porém, com esse antígeno, não houve reação de soros de pacientes infectados por *P. brasiliensis* (152). O ideal, para diagnóstico da PCM, seria um preparo antigênico capaz de reconhecer todas as espécies, considerando também que sua distribuição geográfica não é completamente esclarecida, podendo existir casos de *P. lutzii* em regiões onde não se sabe que essa espécie ocorre. Um antígeno disponibilizado comercialmente, o *Paracoccidioides* ID Antigen[®], mostrou potencial de uso com casos de *P. brasiliensis*, *P. americana* e *P. lutzii*, utilizando-se contraímunoelctroforese (139). Entretanto, foram estudadas poucas amostras, sendo necessária uma maior validação.

Ressalta-se, por fim, que diferentes isolados de *P. lutzii* apresentam uma grande variabilidade nos perfis de proteína/glicoproteína dos exoantígenos (20). Além disso, mesmo em isolados de *P. brasiliensis*, há variações antigênicas que podem influenciar no diagnóstico da PCM (144,150). Portanto, a variabilidade antigênica do gênero *Paracoccidioides* ainda não foi completamente esclarecida, evidenciando os desafios no diagnóstico sorológico da PCM.

2.2.6.3 Comparação entre os métodos diagnósticos usuais: micológico, citopatológico, histopatológico e sorológico

Um estudo, publicado em 2011, avaliou comparativamente a sensibilidade dos métodos diagnósticos mais utilizados para a PCM, i.e., exame micológico direto, citopatologia, histopatologia e sorologia. Nele, foram analisados os resultados dos testes em 401 pacientes com PCM. A comparação dos testes realizados no mesmo paciente mostrou que a sensibilidade apresenta a seguinte ordem: histopatologia > sorologia > citopatologia = exame micológico direto. A especificidade não foi analisada comparativamente. Os autores concluíram que a detecção de *Paracoccidioides* sp. por histopatologia, citopatologia ou exame micológico direto, associada à sorologia com IDD, é suficiente para o diagnóstico da PCM em praticamente todos os casos (153).

Entretanto, os métodos diagnósticos usuais apresentam limitações, as quais foram discutidas nas seções acima. Dessa forma, outras tecnologias podem ser utilizadas, a fim de superar essas limitações e aprimorar o diagnóstico da PCM.

2.2.6.4 Outras tecnologias para diagnóstico

2.2.6.4.1 Diagnóstico molecular

O diagnóstico molecular baseia-se na detecção de material genético do agente etiológico em amostras clínicas (11). A detecção e identificação de *Paracoccidioides* spp. pode ser feita em diferentes materiais: isolados do fungo em cultivo (154,155), fluidos biológicos (156,157), biópsias preservadas em blocos de parafina (158,159), amostras de solo (41), entre outros que contenham células fúngicas. A principal técnica utilizada é a reação em cadeia da polimerase (PCR), com amplificação de uma sequência-alvo no DNA. Para o diagnóstico molecular da PCM, já foram propostos diversos métodos baseados na PCR e suas variações, como *nested* PCR, *semi-nested* PCR, *duplex* PCR, PCR em tempo real (qPCR), RAPD (do inglês *Random Amplified Polymorphic DNA*), PCR-RFLP (do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*), e LAMP (do inglês *Loop-Mediated Isothermal Amplification*) (1,6). Outros métodos utilizados são a análise por sequências multilocus (MLSA) (160) e o sequenciamento completo do genoma (26). Entretanto, essas duas últimas técnicas são realizadas apenas com DNA extraído de culturas, o que limita sua aplicação clínica, tendo maior relevância para a taxonomia do gênero *Paracoccidioides* (11).

Assim, a depender da técnica molecular empregada e da amostra utilizada, os dados podem ser relevantes do ponto de vista clínico, taxonômico, epidemiológico ou ecológico, fornecendo informações acerca da distribuição geográfica das espécies do gênero *Paracoccidioides* (1). As cinco espécies reconhecidas não apresentam diferenças morfológicas; assim, apenas com métodos moleculares é possível realizar sua identificação. Entretanto, a maior parte dos métodos moleculares foram propostos antes do reconhecimento das cinco espécies e, assim, permitem apenas uma identificação parcial dos isolados de *Paracoccidioides* (6). Dentre os métodos que consideram a variabilidade genética do gênero *Paracoccidioides*, a maioria permite a diferenciação do “complexo” de *P. brasiliensis* (formado por essa espécie e *P. americana*, *P. restrepiensis* e *P. venezuelensis*) e *P. lutzii* (6). Para fins de informações epidemiológicas, a diferenciação de todas as espécies é importante. Porém, para diagnóstico, a diferenciação do complexo de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* é o ideal, principalmente considerando as diferenças antigênicas discutidas na seção anterior (159).

Para fins diagnósticos, já foram propostos alguns métodos para diferenciação do complexo de *P. brasiliensis* de *P. lutzii*. Destaca-se a metodologia desenvolvida por Pinheiro et al. (159), na qual foi utilizada PCR multiplex para realizar essa diferenciação em várias

amostras, com ênfase para escarro, lavado broncoalveolar, líquido cefalorraquidiano e tecido de biópsia fresco, demonstrando seu potencial de aplicação na prática clínica. Entretanto, como principal limitação, os métodos moleculares não estão disponíveis rotineiramente para diagnóstico da PCM, principalmente devido ao seu alto custo e necessidade de profissionais especializados (1). Ademais, muitos dos métodos foram desenvolvidos apenas a partir de DNA extraído de isolados em cultivo, e não de amostras de pacientes, como biópsias e fluidos (6). Isso limita sua aplicação clínica, considerando que os cultivos podem levar mais de três semanas para apresentar crescimento. Assim, os métodos moleculares na PCM ainda estão limitados primariamente a centros de pesquisa, com fins mais taxonômicos e epidemiológicos do que diagnósticos.

2.2.6.4.2 Espectrometria de massa MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight*)

A espectrometria de massa MALDI-TOF se baseia na geração de espectros de proteínas a partir de células inteiras ou de material intracelular extraído (11). Clinicamente, a técnica tem diversas aplicações, como diagnóstico de infecções bacterianas, virais ou fúngicas a partir de amostras clínicas. Porém, seus principais desenvolvimentos ocorreram na área de bacteriologia, na qual apresenta diferentes usos, desde diagnóstico, identificação, tipagem e detecção de resistência aos antibióticos (161). Na área de micologia, MALDI-TOF já é consagrada para identificação de leveduras, principalmente do gênero *Candida* (162). A técnica já foi proposta também para identificação de alguns fungos filamentosos, como *Aspergillus*, *Fusarium* e diversos gêneros de fungos dermatófitos e dematiáceos (163).

Em relação à paracoccidiodomicose, a espectrometria de massa MALDI-TOF já foi utilizada para identificar 22 isolados de *Paracoccidioides* sp., a partir de proteínas extraídas das células leveduriformes. Foi realizada com sucesso a diferenciação de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, no entanto, sem separação das espécies do complexo de *P. brasiliensis* (164). Apesar de ter obtido sucesso na identificação, esta foi realizada a partir de amostras cultivadas do fungo, e não diretamente de amostras clínicas, o que adiciona semanas para a obtenção do diagnóstico. Assim, a aplicação clínica de MALDI-TOF no diagnóstico da PCM ainda é limitada.

2.2.6.4.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) já foi proposta para caracterização e identificação de *Paracoccidioides* sp. e para diagnóstico da PCM. Como faz parte da temática principal desta tese, a espectroscopia FTIR será discutida em detalhes em uma seção própria (seção 2.3).

2.2.6.5 Definição de caso

De acordo com o Consenso Brasileiro em Paracoccidioidomicose, que orienta o manejo clínico da doença no Brasil, deve-se seguir as seguintes orientações para definição dos casos de PCM (8,135):

- Caso suspeito: paciente com uma ou mais das seguintes manifestações clínicas, durante pelo menos quatro semanas, já excluídos os diagnósticos diferenciais:
 - Tosse com ou sem expectoração e dispneia;
 - Sialorreia, odinofagia, rouquidão;
 - Lesão ulcerada na mucosa nasal ou oral;
 - Lesões cutâneas características;
 - Adenomegalia cervical ou generalizada;
 - Criança ou adulto jovem com hepatoesplenomegalia e/ou tumoração abdominal.
- Caso provável: paciente com manifestações clínicas características da PCM e com títulos de anticorpos anti-*Paracoccidioides*, detectados preferencialmente por imunodifusão dupla quantitativa ou contraímunoeletroforese.
- Caso confirmado: paciente com manifestações clínicas características da PCM e em cuja secreção, fluido corporal ou material de lesão é observada a presença de elementos fúngicos sugestivos de *Paracoccidioides* sp., através de exame micológico direto, histopatologia ou isolamento em cultivo.

2.2.7 Tratamento

Os fungos do gênero *Paracoccidioides* são sensíveis à maioria dos antifúngicos sistêmicos e, assim, existem diversas opções para o tratamento da PCM, incluindo derivados sulfamídicos, derivados azólicos, anfotericina B e terbinafina (8). A Figura 17 mostra os principais eventos históricos relacionados ao tratamento da PCM, com a ordem cronológica de

utilização de diferentes fármacos. Os primeiros tratamentos para a PCM foram propostos a partir de 1940, com os derivados sulfamídicos (sulfonamidas). Inicialmente, foi utilizada a sulfapiridina, mas diversos outros compostos já foram utilizados, como a sulfadiazina (alta taxa de excreção), a sulfametoxipiridazina (baixa taxa de excreção) e a sulfadoxina (muito baixa taxa de excreção), a depender da severidade do caso (165,166). As sulfonamidas agem bloqueando a síntese do ácido fólico e, conseqüentemente, impedindo a síntese de DNA e o crescimento fúngico (167). Atualmente, as sulfas são utilizadas no tratamento da PCM pela combinação de sulfametoxazol e trimetoprima (cotrimoxazol), que passou a ser utilizada a partir de 1973 e atua de forma sinérgica no bloqueio da síntese de DNA fúngico (167).

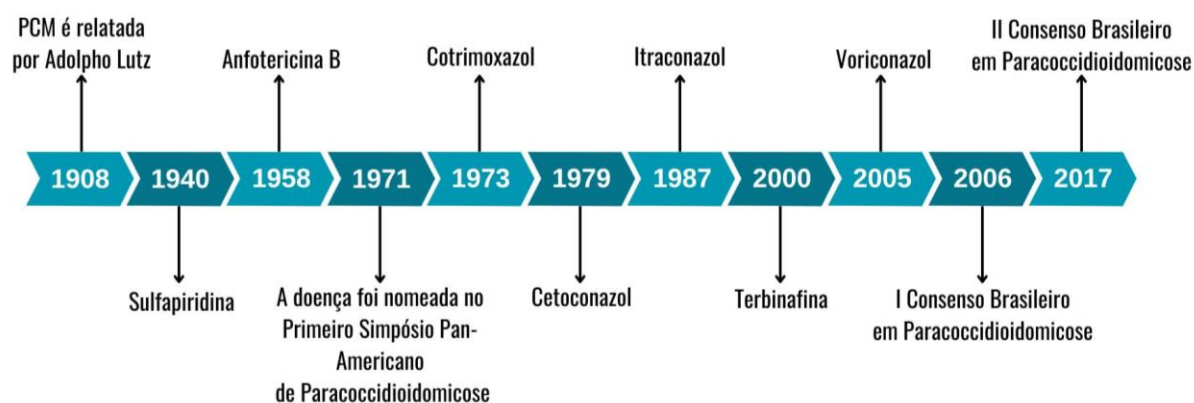


Figura 17. Eventos históricos importantes relacionados ao tratamento da paracoccidioidomicose (PCM).

Fonte: autoria própria, adaptado de Silva et al. (2020) (165).

Posteriormente às sulfonamidas, foi introduzido em 1958 o tratamento da PCM com a anfotericina B, que atua se ligando ao ergosterol da membrana celular e alterando a permeabilidade da célula (165). No entanto, seu uso é limitado a casos severos e disseminados, devido à alta toxicidade. Novas formulações já foram propostas para redução dos efeitos colaterais, como anfotericina B lipossomal, em complexo lipídico e em dispersão coloidal. Entretanto, seu custo é muito elevado, o que também limita o uso (167). Com o desenvolvimento dos derivados azólicos, a partir da década de 1970, diversos novos antifúngicos passaram a ser utilizados no tratamento da PCM, com as vantagens de menor toxicidade e menores taxas de recidiva (167). Esses compostos agem impedindo a síntese do ergosterol, ao inibir a enzima lanosterol 14 α -desmetilase (165). Além dos derivados azólicos,

uma alternativa de tratamento que também atua sobre a síntese do ergosterol, ao inibir a enzima esqualeno epoxidase, é a terbinafina (165).

Na prática clínica, os medicamentos mais utilizados no tratamento da PCM são o itraconazol, o cotrimoxazol (sulfametoxazol + trimetoprim) e a anfotericina B. O Consenso Brasileiro em Paracoccidioidomicose, publicado inicialmente em 2006 e atualizado em 2017, indica o itraconazol como medicamento de escolha em casos de PCM leves a moderados, seguido pelo cotrimoxazol. Para formas graves, indica-se a anfotericina B lipossomal ou em complexo lipídico (8,135). Ressalta-se que essas indicações de tratamento não são baseadas em ensaios clínicos randomizados pois, até o momento, foram realizados apenas dois estudos desse tipo para a PCM (168,169). De acordo com uma revisão sistemática da Cochrane, o número pequeno de participantes e o período curto de seguimento, em ambos os estudos, impede conclusões definitivas acerca do tratamento mais adequado para a PCM (167).

Apesar das diferentes opções de medicamentos, existem algumas problemáticas relacionadas ao tratamento da PCM. Uma delas é a aderência ao tratamento, que já foi analisada em 184 pacientes com PCM, dos quais apenas 82 (44,6%) apresentaram adesão ao tratamento (170). Apesar de terem sido utilizados apenas critérios subjetivos (comparecimento às consultas durante o período de acompanhamento, confirmação da retirada do medicamento na farmácia e relato de administração de pelo menos 80% das doses de antifúngicos), esse dado é preocupante, pois mostra uma baixa adesão. Um dos principais motivos é a longa duração do tratamento, que vai de 9 a 18 meses para o itraconazol e de 18 a 24 meses para o cotrimoxazol (8). Quando ocorre o desaparecimento dos sintomas, muitos pacientes se consideram curados e deixam de completar o tratamento, assim como ocorre para outras doenças crônicas infecciosas de tratamento prolongado, como a tuberculose. Isso pode causar muitos problemas, como a progressão da doença, um maior risco de recidivas e a geração de microrganismos resistentes (170).

Em *Paracoccidioides* spp., já foram descritos genes homólogos a genes relacionados à resistência aos antifúngicos azólicos em *Candida albicans*, *Aspergillus* spp. e *Saccharomyces cerevisiae*. Assim, é possível que esses genes em *Paracoccidioides* spp. desempenhem um papel semelhante, alertando para o risco de surgimento de isolados resistentes (171). Para verificar uma possível resistência, é útil a realização de testes de suscetibilidade in vitro. No entanto, esses testes não são usualmente realizados para *Paracoccidioides* spp., devido à falta de padronização e às peculiaridades na realização dos testes com um fungo dimórfico (172). Além disso, não existem pontos de corte definidos para determinação de suscetibilidade e resistência em *Paracoccidioides* spp., o que limita a interpretação dos resultados (173). Apesar

disso, nos estudos já realizados, em geral, a maior parte dos antifúngicos apresenta boa ação in vitro contra isolados do fungo (172–175). Entretanto, casos esporádicos de resistência in vitro e in vivo são relatados, como para cotrimoxazol e cetoconazol (176), o que ressalta a necessidade de atenção para possíveis falhas no tratamento.

Considerando os desafios no tratamento da PCM, diversas pesquisas indicam o potencial de diferentes compostos sintéticos, semissintéticos, derivados de plantas e de microrganismos para o tratamento da PCM. Apesar de mostrarem resultados promissores para alguns compostos, falta uma continuidade para os próximos estágios do processo de desenvolvimento de novos fármacos, como testes clínicos. Assim, mesmo que novos compostos com potencial contra *Paracoccidioides* spp. sigam sendo descritos, ainda há uma lacuna para que os mesmos tenham utilidade clínica (177). Além de novos fármacos, também existem esforços para o desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas, com vacinas para proteger populações expostas à PCM ou para auxiliar no tratamento antifúngico, reduzindo as doses necessárias e a duração da terapia (178,179). Entretanto, esses estudos também se encontram nas fases iniciais de desenvolvimento.

2.2.7.1 Critério de cura

Os critérios de cura da PCM são embasados em parâmetros clínicos, micológicos, radiológicos e imunológicos (1,8):

- Critérios clínicos: ausência ou regressão dos sinais e sintomas da doença. É importante diferenciar os sinais e sintomas decorrentes de sequelas, que ocorrem principalmente nos pulmões, no sistema linfático, nas glândulas adrenais e no sistema nervoso central;
- Critérios micológicos: negatização do exame micológico direto em amostras clínicas do paciente que previamente apresentavam o fungo;
- Critérios radiológicos (em casos com manifestações pulmonares): estabilização do padrão das imagens radiológicas pulmonares, com indicativos da cicatrização e fibrose das lesões nos pulmões;
- Critérios imunológicos: utilizando-se IDD, espera-se a negatização do título de anticorpos ou a sua estabilização em títulos baixos (soro não diluído ou na diluição 1:2).

Considera-se um paciente aparentemente curado quando os quatro critérios acima são mantidos pelo período de dois anos, sem administração de tratamento complementar. É utilizado o termo “cura aparente” e não apenas “cura”, pois não é possível confirmar a

erradicação completa do fungo, podendo permanecer focos com células fúngicas latentes mesmo após a realização eficaz do tratamento (1).

2.3 Espectroscopia no infravermelho

2.3.1 Aspectos gerais

Espectroscopia é definida como a interação de qualquer tipo de radiação eletromagnética com a matéria. O espectro eletromagnético é dividido em diferentes regiões, de acordo com o comprimento de onda e a frequência (Figura 18). A luz visível é apenas uma pequena porção do espectro eletromagnético. À sua esquerda, estão os tipos de radiação com maior comprimento de onda e frequência mais baixa: radiação infravermelha, micro-ondas e ondas de rádio. Já à sua direita, estão os tipos de radiação com menor comprimento de onda e frequência mais alta: ultravioleta (UV), raios X e raios gama. Essas radiações com maior frequência e, conseqüentemente, maior energia, são prejudiciais aos organismos vivos (180,181).

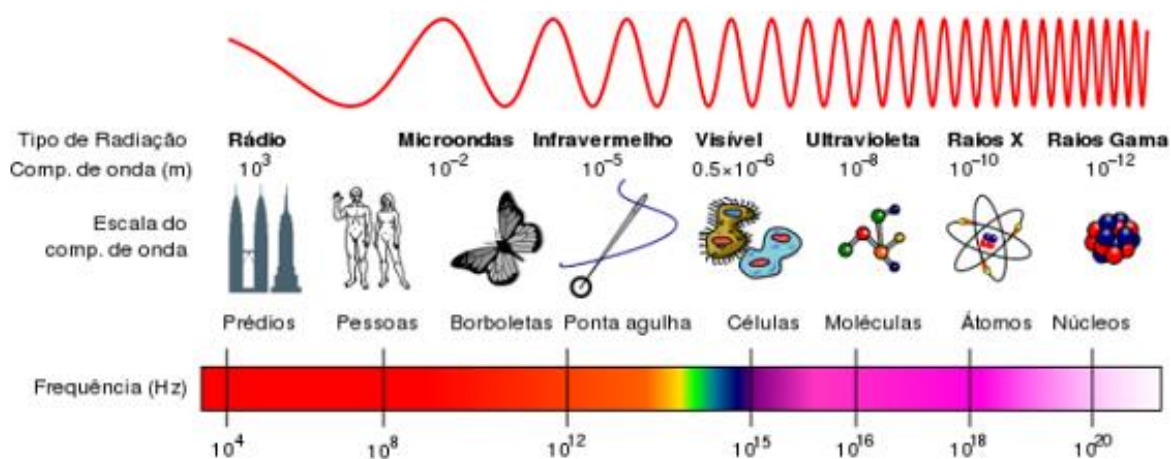


Figura 18. O espectro eletromagnético.

Fonte: adaptado de Martí, González (181).

As diferentes formas de radiação interagem com átomos e moléculas, e a espectroscopia estuda essa interação (Figura 19). A espectroscopia no infravermelho é um tipo de espectroscopia vibracional, que ocorre com o acoplamento do campo elétrico oscilante da vibração molecular e o da radiação incidente. A técnica pode ser realizada em diferentes faixas: infravermelho próximo (NIR), na faixa de 12500 a 4000 cm^{-1} ; infravermelho médio (MIR), na

faixa de 4000 a 400 cm^{-1} ; e infravermelho distante (FIR), na faixa de 400 a 20 cm^{-1} . A região do MIR é a de maior interesse, principalmente para análise de amostras biológicas, pois inclui as regiões representativas de lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (12,182,183) (Figura 20).

TIPO DE RADIAÇÃO	TRANSIÇÕES DE ENERGIA
RAIOS X	Quebra de ligações
ULTRAVIOLETA/VISÍVEL	Eletrônica
INFRAVERMELHA	Vibracional
MICRO-ONDAS	Rotacional
RADIOFREQUÊNCIAS	<i>Spin</i> nuclear (ressonância magnética nuclear)
	<i>Spin</i> eletrônico (ressonância de <i>spin</i> eletrônico)

Figura 19. Tipos de interação da matéria com cada região do espectro eletromagnético.

Fonte: adaptado de Pavia et al. (2015) (182).

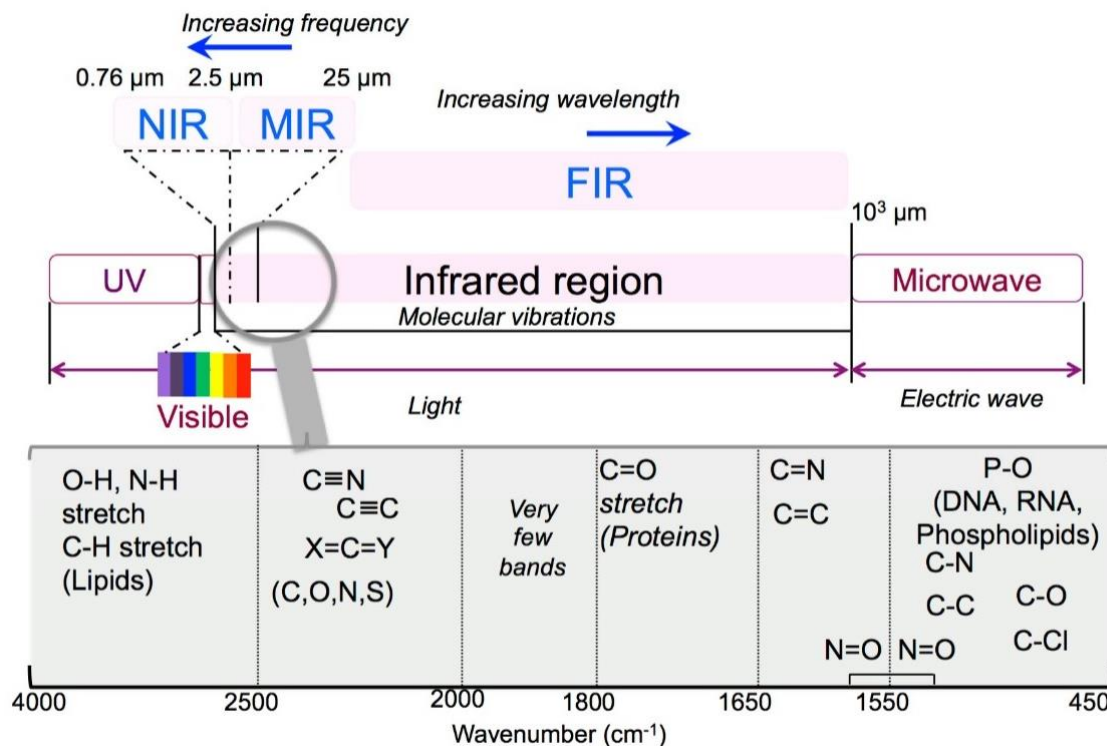


Figura 20. Regiões da radiação infravermelha: infravermelho próximo (NIR), infravermelho médio (MIR) e infravermelho distante (FIR). É dado destaque para a região de MIR, pela sua relevância em análises biológicas.

Fonte: Balan et al. (2019) (12).

Conforme pode ser visto na Figura 20, quando se trata da radiação na região do infravermelho vibracional, geralmente se usa a unidade número de onda, em vez de comprimento de onda. Os números de onda são expressos em centímetros recíprocos (cm^{-1}) e são determinados calculando-se o recíproco do comprimento de onda respectivo. Assim, a faixa do MIR, de 4000 a 400 cm^{-1} , corresponde a comprimentos de onda de $2,5$ a $25 \text{ }\mu\text{m}$. É preferível a utilização de número de onda pois essa unidade é diretamente proporcional à energia, ou seja, quanto maior o número de onda, maior a sua energia (182).

Quase todos os compostos com ligações covalentes absorvem diferentes frequências da radiação no infravermelho. A absorção ocorre nas frequências da radiação que equivalem às frequências vibracionais naturais de uma determinada molécula. Porém, em alguns casos, mesmo que as frequências sejam iguais, não ocorre absorção, pois ela depende de vibrações moleculares que resultam numa alteração do momento dipolar. Ligações simétricas, como H_2 ou Cl_2 , não absorvem radiação no infravermelho, pois seu momento dipolar é nulo. Assim, apenas ligações com momento dipolar que mude na mesma frequência da radiação apresentam

absorção no infravermelho. Os tipos mais simples de movimentos vibracionais que dão origem a absorções são os modos de estiramento e deformação angular, como pode ser visto na Figura 21 para um grupo metileno (182).

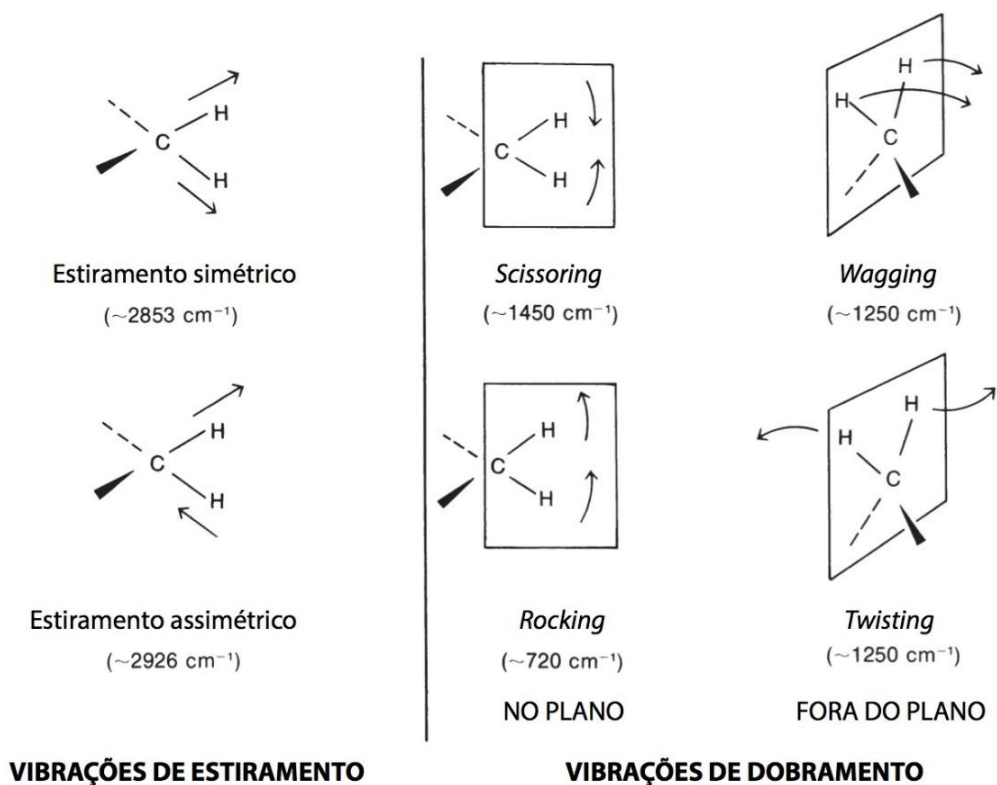


Figura 21. Modos normais de vibração de estiramento e de dobramento de um grupo metileno. Fonte: Pavia et al. (2015) (182).

Como a absorção do infravermelho ocorre na frequência natural de vibração de cada ligação, e que tipos idênticos de ligações em diferentes compostos não vibram de maneira igual, os padrões de absorção no infravermelho são únicos para cada molécula. Esses padrões de absorção são representados nos espectros infravermelhos, e esses funcionam como uma “impressão digital” para cada molécula e, conseqüentemente, cada amostra (182,183). Conforme pode ser visto na parte inferior da Figura 20, as absorções para cada tipo de ligação ocorrem em determinadas faixas do espectro infravermelho (182). Essas ligações podem ser atribuídas a macromoléculas presentes em amostras biológicas, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Portanto, a espectroscopia no infravermelho fornece informações da composição de diferentes amostras biológicas.

O instrumento utilizado para obtenção dos espectros de absorção no infravermelho é o espectrômetro (ou espectrofotômetro) de infravermelho. Os primeiros espectrômetros

desenvolvidos foram os do tipo dispersivo, nos quais o feixe de radiação no infravermelho passa por um monocromador. Assim, cada comprimento de onda atinge a amostra um por vez, o que torna o tempo de varredura longo (em torno de 15 minutos por amostra). Os espectrômetros mais modernos são os que apresentam transformada de Fourier. Neles, é utilizado o interferômetro de Michelson que, de forma resumida, permite que a amostra receba ao mesmo tempo todos os comprimentos de onda do espectro no infravermelho. Assim, a varredura do espectro é feita de forma muito mais rápida. Entretanto, o sinal gerado é um interferograma, um sinal complexo que mede intensidade de absorção *versus* tempo. Para transformá-lo em um espectro padrão (intensidade *versus* número de onda), igual ao produzido pelos espectrômetros dispersivos, é realizada pelo computador uma operação matemática conhecida por transformada de Fourier (Figura 22). Outras vantagens do espectrômetro com transformada de Fourier é a melhora da razão sinal/ruído e o aumento da sensibilidade. A espectroscopia no infravermelho que utiliza esse tipo de espectrômetro é chamada de espectroscopia FTIR (do inglês *Fourier transform infrared spectroscopy*) (182,183).

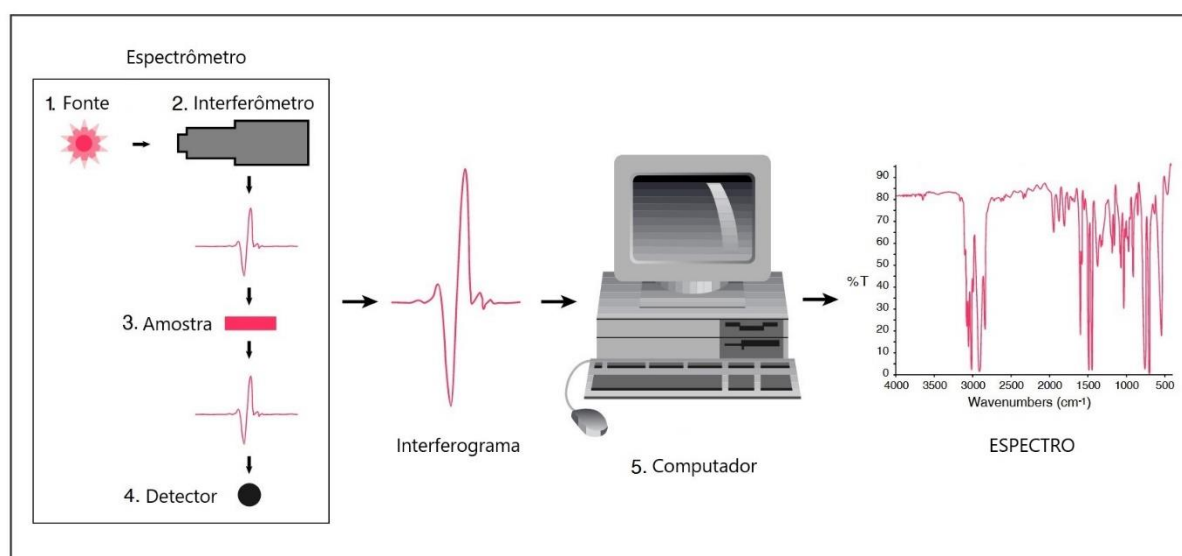


Figura 22. Esquema do processo instrumental para obtenção de espectros no infravermelho. Fonte: adaptado de Thermo Nicolet (184).

Existem diferentes modos de amostragem nos espectrômetros de infravermelho, que se referem à forma como a radiação no infravermelho incide na amostra. Dentre os principais, cita-se a transmissão e a reflexão. Na transmissão, a radiação atravessa a amostra e, portanto, quase sempre é necessário o seu preparo. Apenas amostras muito finas, com menos de 15 μm , podem ser analisadas por transmissão sem nenhum preparo prévio. Para líquidos, é preciso

colocá-los em celas de substâncias iônicas, usualmente cloreto de sódio ou brometo de potássio, pois vidro e plástico apresentam muita absorção na região do infravermelho médio e impedem a amostragem. Para amostras sólidas, existem diferentes maneiras de preparo, mas usualmente este é feito moendo a amostra e a incluindo em pastilhas de brometo de potássio, ou a transformando em amostra líquida, tanto suspendendo a amostra moída em óleo mineral (Nujol), ou a dissolvendo em um solvente. Já na reflexão, a radiação só interage com a superfície da amostra (182,183,185). Aqui, será dada ênfase para o método de reflexão chamado reflectância total atenuada (ATR), pela sua popularidade e também por ser o modo de amostragem escolhido para a metodologia desta tese.

A popularidade da ATR se deve ao fato de que é um método rápido e não-destrutivo, pois não requer nenhuma preparação da amostra. Esse método envolve a utilização de um cristal que apresente alto índice de refração e propriedades excelentes de transmissão do infravermelho, podendo ser de diferentes materiais, como diamante, seleneto de zinco (ZnSe) e germânio. A amostra é colocada sobre o cristal e, no caso de amostras sólidas, precisa ser pressionada para manter um bom contato com o mesmo (Figura 23). A radiação é direcionada pelo equipamento para incidir em um ângulo específico no cristal, fazendo com que seja totalmente refletida em sua superfície interna. Nessas reflexões, o feixe de luz penetra na camada da superfície da amostra posicionada sobre o cristal. Nesse contato, o feixe perde energia nos comprimentos de onda que são absorvidos pela amostra e, por esse motivo, o método é chamado de reflexão total *atenuada* (a radiação é atenuada nos comprimentos de onda absorvidos pela superfície da amostra). Assim, a ATR é um método de amostragem muito útil para analisar amostras líquidas e sólidas em seus estados naturais e, no caso de amostras sólidas, não há limitações quanto a sua espessura (182,183,185,186).

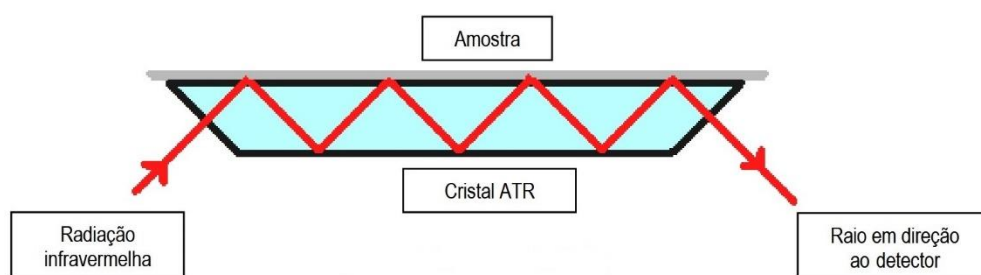


Figura 23. Esquema da espectroscopia no infravermelho por reflectância total atenuada (ATR).

Fonte: Souza, 2009 (186).

Independentemente do modo de amostragem, a partir da leitura das amostras em um espectrômetro no infravermelho é gerado um espectro. O espectro corresponde às posições e intensidades de todas as absorções da amostra na região do infravermelho (182). Usualmente, é representado no eixo X com os números de onda (de 4000 a 400 cm^{-1} , no caso de MIR) e no eixo Y com a absorbância, ou seja, a quantidade de energia que a amostra absorveu em determinado número de onda (Figura 24). As amostras biológicas em geral são complexas, compostas de uma grande diversidade de proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e carboidratos (12). Para essas amostras, a região mais importante é a conhecida como região de *fingerprint* (“impressão digital”), de 1540 a 600 cm^{-1} , e a região da amida I e amida II, de 1700 a 1500 cm^{-1} . Regiões com números de onda maiores, principalmente de 3500 a 2550 cm^{-1} , estão associadas com vibrações de estiramento como S-H, C-H, N-H e O-H, com absorção de lipídios. Já regiões com números de onda menores estão relacionados principalmente com vibrações de dobramento e vibrações do esqueleto de carbono (185). Assim, o espectro de amostras biológicas pode ser dividido em quatro principais regiões (187) (Figura 24):

- **3050-2800 cm^{-1}** : grupos -CH₂ e -CH₃ de **ácidos graxos e proteínas**;
- **1800-1700 cm^{-1}** : vibrações de estiramento de C=O, principalmente de ésteres de **lipídios**;
- **1700-1500 cm^{-1}** : modos de C=O, N-H e C-N de amida I e II, de **proteínas**;
- **1225-1080 cm^{-1}** : vibrações de fosfato de **ácidos nucleicos**;
- **1200-900 cm^{-1}** : absorção de **carboidratos**.

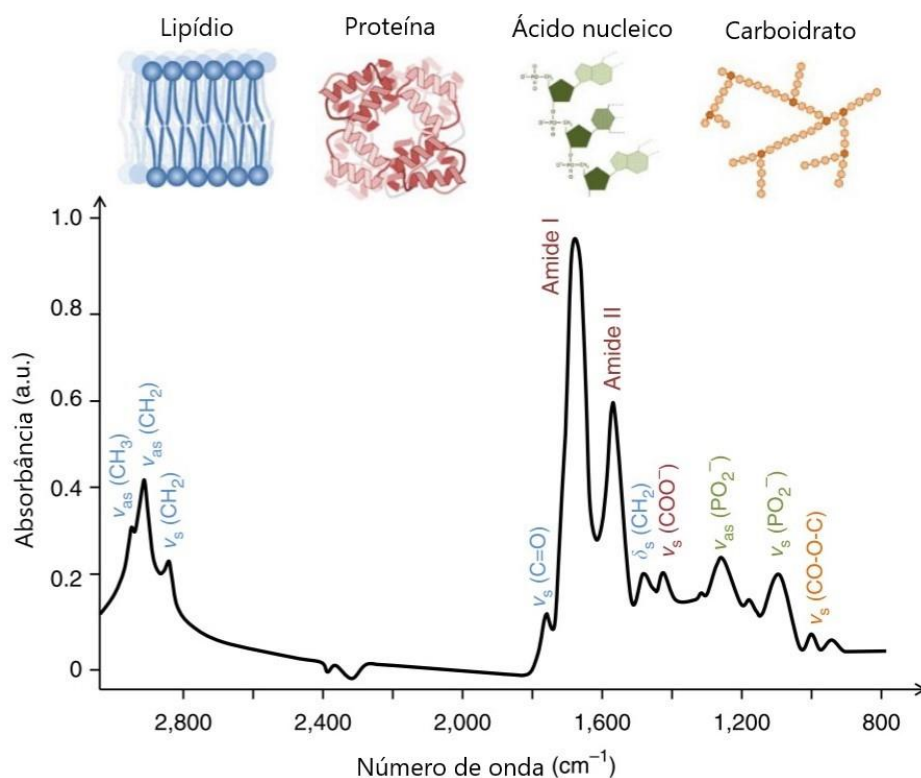


Figura 24. Espectro típico de uma amostra biológica, com destaque para a região de maior relevância, mostrando as atribuições biomoleculares dos picos.

Fonte: adaptado de Baker et al. (2014) (185).

Como pode ser visto na Figura 24, é possível fazer uma análise visual dos espectros a partir do conhecimento de quais grupos funcionais absorvem em quais números de onda. Esse conhecimento pode ser obtido a partir de tabelas de correlação ou bancos de dados de espectros de referência, disponíveis comercialmente como uma coleção de espectros de compostos químicos puros (12,182). Além disso, também já existe uma grande quantidade de literatura acerca de espectros no infravermelho de amostras biológicas (187). Entretanto, a análise visual é limitada e, assim, são utilizadas ferramentas matemáticas para extrair o máximo de informações que os espectros no infravermelho podem fornecer.

2.3.2 Análises quimiométricas

2.3.2.1 Aspectos gerais e preparação dos dados

As ferramentas matemáticas utilizadas para “lapidar” os dados fornecidos pela espectroscopia no infravermelho são chamadas em conjunto de quimiometria. A quimiometria

é a aplicação de métodos estatísticos e matemáticos a problemas de origem química, sendo necessária para extrair as informações de interesse da grande quantidade de dados gerados pela espectroscopia (Figura 25) (188). Assim, as análises quimiométricas permitem a obtenção de resultados confiáveis e significativos a partir dos espectros (189). Elas são utilizadas para qualquer dado complexo de origem química; entretanto, nessa revisão, será dado enfoque para o uso da quimiometria em dados originados da espectroscopia vibracional, especialmente espectroscopia FTIR na região MIR.

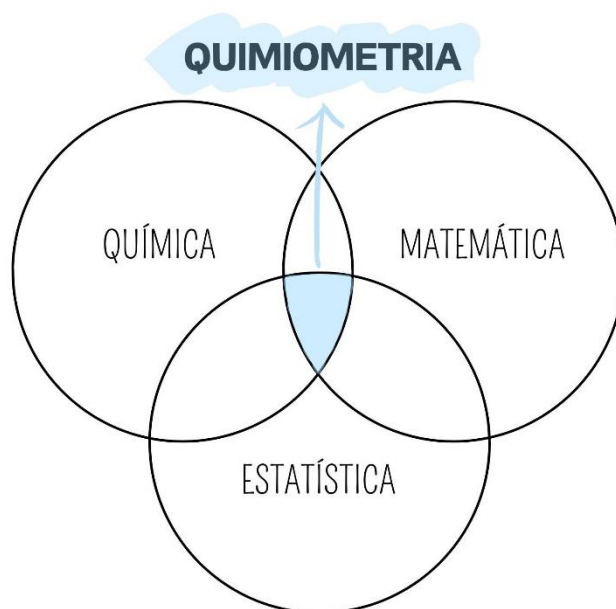


Figura 25. Quimiometria: junção de dados de origem química com a matemática e a estatística. Fonte: autoria própria, elaborado a partir de Ferreira, 2015 (188).

Para as análises quimiométricas, os espectros são organizados em um arranjo de linhas e colunas, onde cada linha corresponde a uma amostra e cada coluna corresponde a uma variável (no caso da espectroscopia FTIR, os números de onda e suas respectivas absorções para cada amostra) (Figura 26). Destaca-se que alguns softwares utilizam sua versão transposta, com as variáveis nas linhas e as amostras nas colunas. Essa tabela é chamada de matriz **X** e é a partir dela que as análises quimiométricas são realizadas (188).

	VARIÁVEL 1	VARIÁVEL 2	...
AMOSTRA 1	0,2358	0,5268	...
AMOSTRA 2	0,2456	0,5789	...
AMOSTRA 3	0,2431	0,5143	...
...

Figura 26. Exemplo de organização dos dados de espectroscopia FTIR em uma matriz **X**, com as amostras nas linhas e as variáveis nas colunas.

Fonte: autoria própria.

Antes das análises propriamente ditas, é fundamental realizar o pré-tratamento dos dados. Essa etapa é realizada para reduzir variações indesejáveis dos espectros, que não serão eliminadas naturalmente durante as análises e que podem influenciar nos resultados (188). O pré-tratamento é usado, por exemplo, para corrigir a linha de base, a dispersão da luz e diferenças na espessura e concentração das amostras, e remover ruídos dos espectros. Esses fenômenos podem ser causados pela natureza da própria amostra ou pelo modo de seu preparo para análise, pelo instrumento ou pelo modo de amostragem (190). Independentemente da causa, eles são fonte de variações irrelevantes entre as amostras, que podem prejudicar as análises posteriores e, portanto, devem ser removidas ou minimizadas. Cabe destacar, porém, que as técnicas de pré-processamento podem gerar correlações entre essas informações irrelevantes. Assim, seu uso deve ser realizado com cuidado e parcimônia (189). O pré-tratamento dos dados pode tanto ser aplicado às amostras (nesse caso, as técnicas são chamadas de “transformação”) quanto às variáveis (nesse caso, as técnicas são chamadas de “pré-processamento”) (188).

Abaixo, serão descritos brevemente alguns métodos de transformação, aplicados às amostras (linhas da matriz **X**), nos quais cada amostra é pré-tratada individualmente, sendo usada a mesma regra para todas elas (188). Cada método é utilizado para determinados problemas encontrados nos espectros, sendo que alguns dos métodos podem ser utilizados para

diferentes problemas. Destaca-se que não existe um padrão para sua aplicação, e os métodos usualmente são escolhidos baseando-se em problemas visuais detectados nos espectros (185) (Figura 27 e Figura 28):

- **Correção da linha de base:** podem ocorrer distorções da linha de base devido a absorções interferentes de fundo. Existem diversas técnicas para essa correção, e muitas delas já estão presentes nos próprios softwares dos espectrômetros, como a correção de *rubber-band*, a correção polinomial e o filtro de Whittaker (189);
- **Correção da dispersão da luz:** a dispersão da luz ocorre quando existem na amostra partículas com tamanhos diferentes, especialmente partículas menores que o comprimento de onda que está sendo utilizado. Isso altera a absorbância da radiação de maneira sistemática, afetando o eixo y. As técnicas mais utilizadas para sua correção são a correção multiplicativa de espalhamento (MSC) e a padronização normal de sinal (SNV) (189);
- **Correção de diferenças na espessura e concentração das amostras:** as diferenças na espessura e concentração das amostras podem inserir variações espectrais irrelevantes entre as amostras, mascarando as variações bioquímicas de interesse. Para minimizar essas diferenças irrelevantes, são utilizadas as normalizações, onde o conjunto de dados é dimensionado de acordo com um critério específico (190). Esse procedimento deve ser realizado apenas quando necessário e com cuidado, pois pode mascarar bandas discriminantes dos espectros. Os tipos mais comuns são a normalização pela banda da amida I e a normalização vetorial. A primeira pode ser realizada quando a banda de amida I não é uma característica discriminante entre as classes das amostras, e a segunda é realizada quando essa informação não é conhecida, mas ainda assim é necessário corrigir os espectros (189);
- **Remoção de ruídos:** para remover ruídos aleatórios dos espectros, a técnica mais utilizada é o alisamento pelo método de Savitzky-Golay. Frequentemente, essa técnica é usada em conjunto com a aplicação da primeira ou segunda derivadas dos espectros. As derivadas podem ser utilizadas para corrigir dispersão da luz e distorções da linha de base, além de serem úteis para destacar pequenas diferenças entre os espectros das amostras. Entretanto, as derivadas devem ser utilizadas com cuidado, para não criar ruídos nos espectros e não introduzir correlações entre o ruído espectral (189);

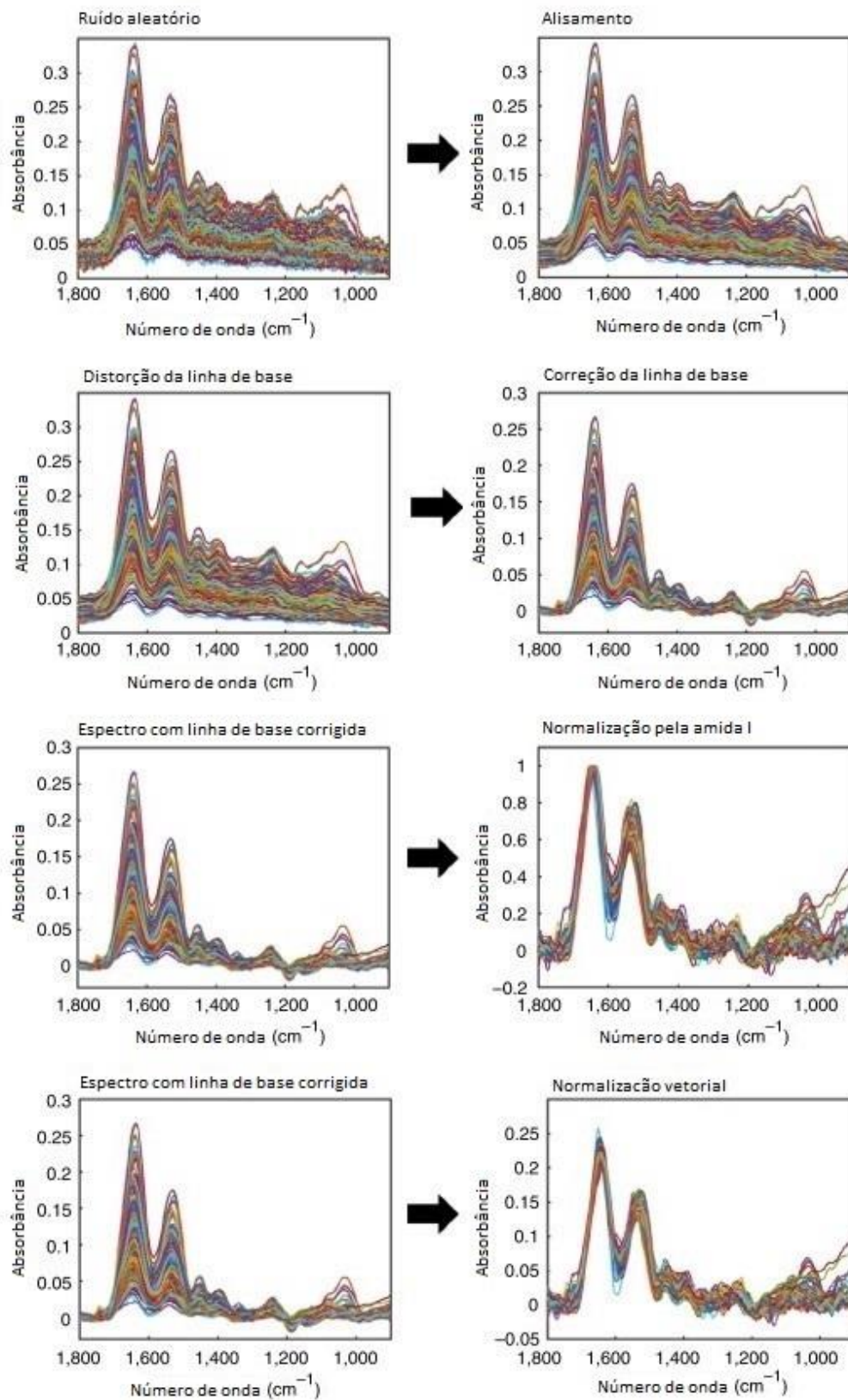


Figura 27. Efeito dos diferentes tipos de pré-processamento em espectros de infravermelho.

Fonte: adaptado de Morais et al. (2020) (189).

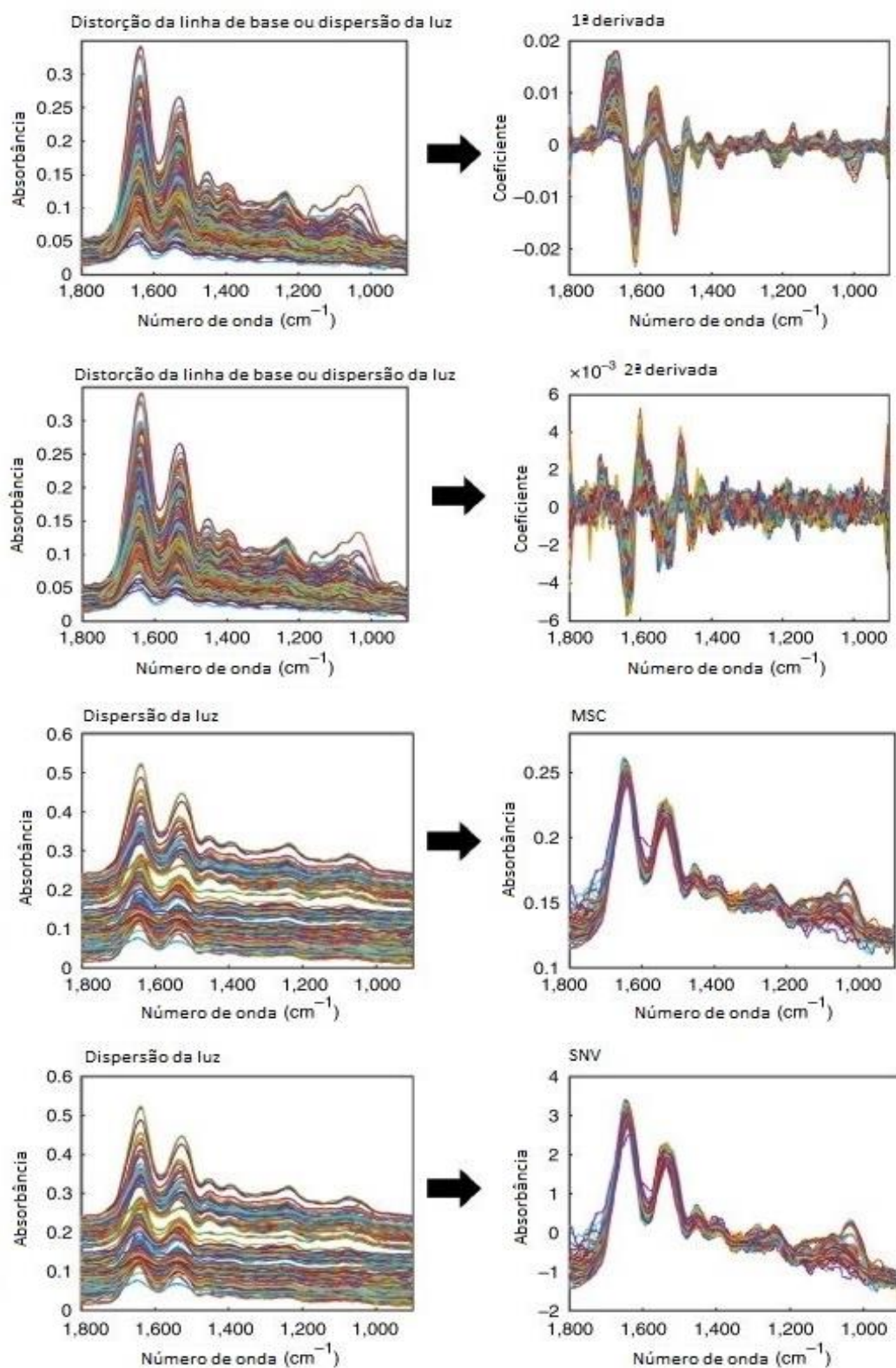


Figura 28. Efeito dos diferentes tipos de pré-processamento em espectros de infravermelho (continuação da Figura 27).

Fonte: adaptado de Moraes et al. (2020) (189).

Outro método relevante de transformação é a correção ortogonal de sinal (OSC). Esse método de pré-tratamento tem como objetivo principal melhorar a capacidade preditiva de modelos de calibração e, portanto, é muito útil para análises com fins diagnósticos (188). Ele remove dos dados espectrais (chamados de matriz \mathbf{X}) as informações que não são correlacionadas com a propriedade de interesse (chamada de matriz \mathbf{Y}) a ser predita a partir dos espectros (191). Isso é realizado através da ortogonalização, garantindo que a informação removida da matriz \mathbf{X} é matematicamente ortogonal à matriz \mathbf{Y} (188).

Já os principais métodos de pré-processamento, aplicados às variáveis (colunas da matriz \mathbf{X}), são os métodos de escalamento (escalamento pela variância e autoescalamento), e a centragem dos dados na média. Os métodos de escalamento são indicados quando as variáveis têm unidades diferentes, ou quando a faixa de variação dos dados é ampla, para igualar o impacto de cada um deles. Assim, é minimizado o efeito de uma variável dominante e todos os dados passam a ter a mesma importância, independentemente de sua unidade. Portanto, para dados espectrais, os métodos de escalamento não são indicados, pois eles deixam todos os comprimentos de onda com igual peso, não importando se eles representam um pico ou apenas um ruído. Para esses dados, o pré-processamento mais frequente é a centragem na média, pois faz com que, em geral, a direção de maior variância ao redor da média seja coincidente com a de maior variância interna dos dados. Isso torna os modelos de calibração mais simples e interpretáveis (188).

Após a aplicação dos pré-tratamentos, que enfatizam as informações mais relevantes dos dados e removem ou minimizam as irrelevantes, estes estão prontos para serem propriamente analisados (188). Existem diferentes métodos multivariados para análise de dados espectrais, e sua escolha depende dos resultados que espera-se obter. De modo geral, objetiva-se identificar semelhanças e diferenças entre as amostras analisadas, para que seja possível agrupá-las, classificá-las ou realizar a predição de alguma de suas características. Os métodos quimiométricos utilizados para isso podem ser divididos em dois grandes grupos: as análises não supervisionadas e as análises supervisionadas. Nas não supervisionadas, não é necessário nenhum conhecimento prévio sobre as amostras, e elas são estudadas e agrupadas naturalmente com base nas informações contidas nos espectros. Já nas supervisionadas, cada amostra provém de uma classe preestabelecida, ou possui uma informação conhecida a partir de um método externo, e esses dados são utilizados durante as análises quimiométricas (12,188).

2.3.2.2 Análises quimiométricas não supervisionadas

As análises quimiométricas não supervisionadas são também conhecidas por análises exploratórias, pois os dados são analisados da forma como são, sem a preocupação de construção de uma regra preditiva (188). Dentre essas análises, será dado destaque para duas: a Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA).

A PCA é um método de análise exploratória e de redução de dimensionalidade dos dados. Na PCA, os dados são projetados em um espaço de dimensão menor, sem afetar as relações entre as amostras. Para isso, são feitas combinações lineares das variáveis originais, agrupando aquelas que fornecem informações semelhantes (são correlacionadas). Assim, é possível obter um número menor de novas variáveis que ainda são capazes de descrever toda a informação dos dados originais, mas de forma mais simplificada. Isso é relevante no contexto da espectroscopia no infravermelho pois, uma vez que são geradas milhares de variáveis para cada amostra, usualmente existem informações redundantes e reduzir a dimensionalidade dos dados ajuda a interpretá-los. Essas novas variáveis geradas a partir dos dados originais são chamadas de componentes principais (PC), e elas são totalmente não correlacionadas entre si, ou seja, são ortogonais. A primeira componente principal (PC1) é definida pela direção que descreve a máxima variância dos dados originais. A segunda componente principal (PC2) tem a direção da máxima variância no subespaço ortogonal à PC1, e assim por diante, em ordem decrescente até que a variância total dos dados tenha sido descrita. Devido à remoção das redundâncias (correlações) nas variáveis, é possível descrever quase toda sua informação original em apenas algumas PCs (188) (Figura 29).

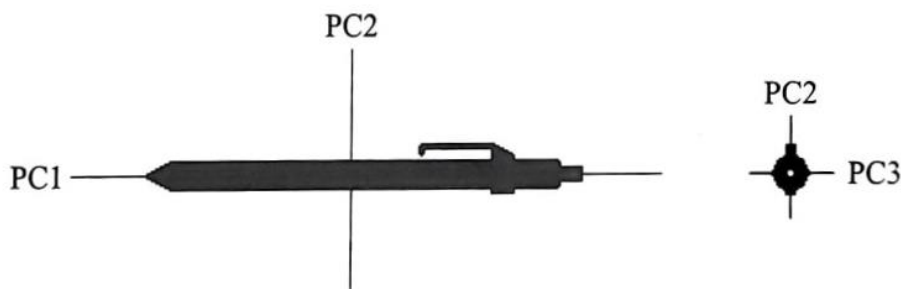


Figura 29. Exemplo ilustrativo das componentes principais (PC) na representação de uma lapiseira. A PC1 se encontra ao longo do eixo longitudinal, pois é a visão que oferece maior quantidade de informações (pois a lapiseira é mais longa do que espessa). A PC2 é perpendicular à PC1 e corresponde ao eixo transversal com a segunda maior quantidade de

informações, pois inclui dados sobre o clipe e sobre as laterais da lapiseira. A PC3 é perpendicular à PC2, correspondendo ao eixo transversal com menos informações, mas que ainda assim é relevante, pois permite determinar se a lapiseira é redonda ou quadrada.

Fonte: Ferreira (2015) (188).

Na PCA, a matriz original dos dados (\mathbf{X}) é decomposta em uma matriz de escores (ou *scores*, \mathbf{t}) e pesos (ou *loadings*, \mathbf{I}). Se existe correlação entre as variáveis originais, apenas as primeiras PCs são necessárias para representar adequadamente os dados, enquanto as restantes devem conter informações irrelevantes ou aleatórias. Essas últimas PCs são chamadas de resíduo e, em conjunto, formam a matriz de resíduos \mathbf{E} . Assim, na PCA, a matriz \mathbf{X} é decomposta em duas matrizes menores (de escores e de pesos), mais uma matriz de resíduos (\mathbf{E}) (188,192) (Figura 30). Uma vez determinado o número ótimo de componentes principais (que descrevem todas as informações relevantes do conjunto de dados), ou quando é determinado o número desejado de PCs na análise em questão, todas as outras PCs fazem parte da matriz de resíduos \mathbf{E} . A partir dessa matriz, pode ser calculada a variância residual individual de cada amostra, que indica o quanto ela se afasta do subespaço formado pelas A componentes principais. Também é calculada a variância residual total da PCA e, se a variância residual particular de uma amostra é maior que esse valor, é possível que ela seja anômala (*outlier*), ou seja, suas características são diferentes daquelas da maioria das amostras. Como confirmação, pode ser realizado um teste F que indica se duas variâncias diferem significativamente (188,193).

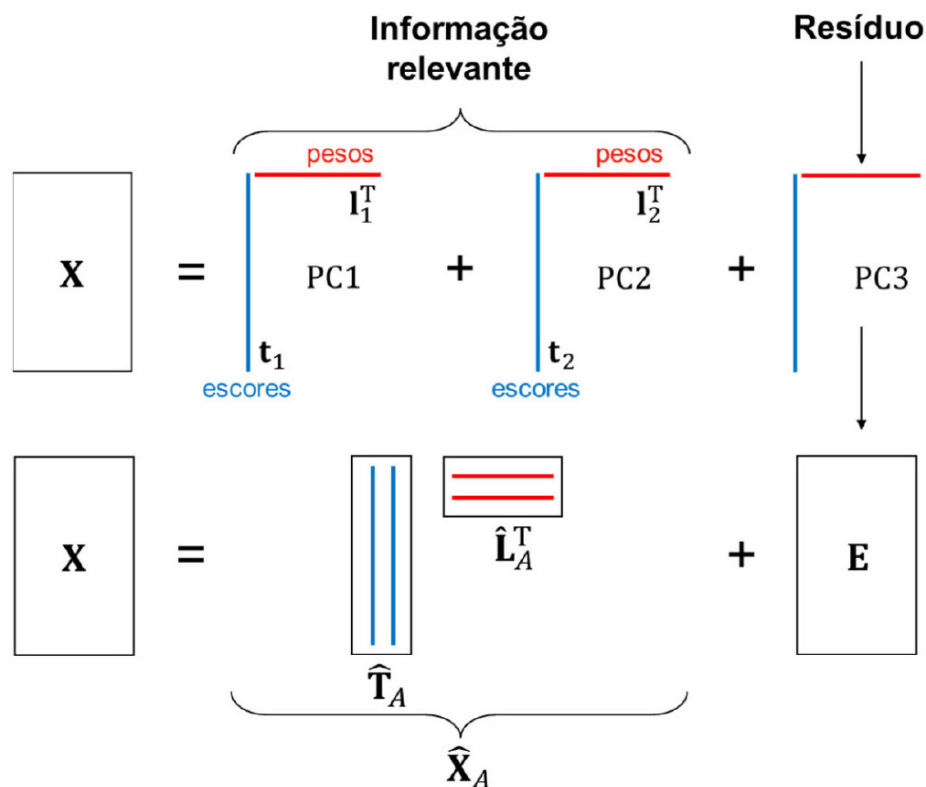


Figura 30. Representação esquemática da decomposição de uma matriz X composta por N amostras e 3 variáveis. Nesse caso, a informação relevante foi incluída nas duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2), enquanto a terceira componente (PC3) incluiu apenas informações irrelevantes/aleatórias (resíduo).

Fonte: Ferreira (2022) (192).

A matriz de escores permite visualizar características e encontrar padrões de agrupamentos das amostras, relacionados a suas semelhanças e diferenças químicas. Os escores são a “pontuação” das amostras em cada uma das componentes principais, ou seja, são a transformação das variáveis originais da amostra nas novas variáveis (as PCs). Eles são representados em gráficos de escores plotados em pares de componentes principais (por exemplo, PC1 x PC2). Os pontos de amostras que se agrupam nos gráficos de escores apresentam correlações similares na PC, o que significa similaridades em seu perfil químico. Da mesma forma, amostras que se distribuem de forma distante no gráfico apresentam perfil químico diferente (194,195) (Figura 31A). Já os pesos mostram a contribuição das variáveis originais em cada componente principal. Assim, para obtenção do escore de uma amostra na PC1, por exemplo, deve-se multiplicar o valor de cada variável original pelo peso que ela apresenta na determinação da referida componente principal. Os pesos permitem visualizar quais variáveis são mais relevantes para os padrões observados na distribuição das amostras,

sendo utilizados como marcadores espectrais que as diferenciam. Isso é possível com a visualização das bandas com os maiores coeficientes (positivos ou negativos) nas direções discriminantes em cada PC (194,195) (Figura 31B).

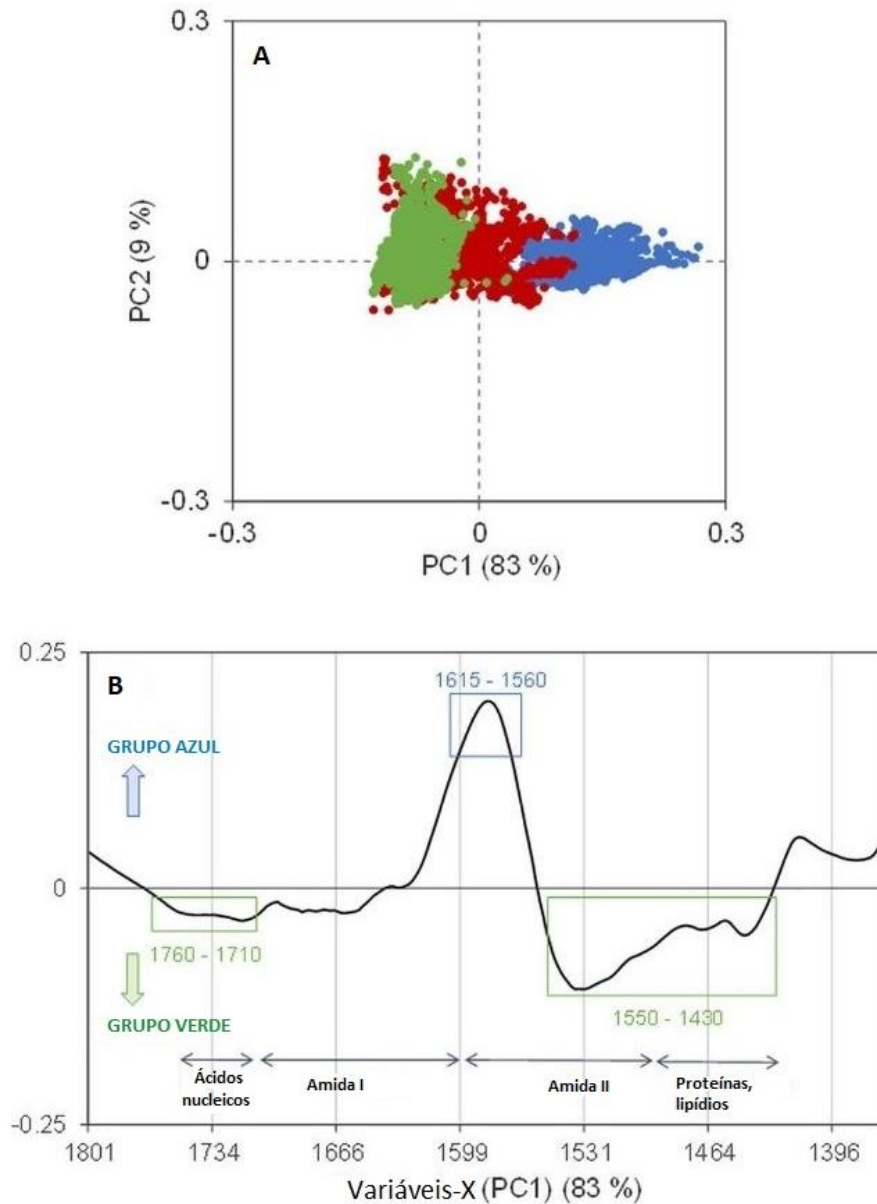


Figura 31. Exemplo de gráficos de escores (A) e de pesos (B) de uma Análise de Componentes Principais (PCA) realizada com dados de espectroscopia FTIR. (A) A PC1 explica 83% da variância, e a PC2 explica 9%. É possível visualizar uma separação dos grupos verde (lado negativo) e azul (lado positivo) ao longo do eixo da PC1; (B) Gráfico de pesos de PC1. É possível visualizar algumas das bandas responsáveis por agrupar as amostras e separar os grupos azul e verde ao longo do eixo da PC1.

Fonte: adaptado de Sanchez et al. (2022) (196).

Cabe destacar que, apesar de poder mostrar padrões de agrupamentos das amostras, a PCA não é uma técnica de classificação, mas sim de redução dos dados e de análise exploratória. Portanto, a PCA permite apenas visualizar e interpretar as diferenças entre as variáveis e examinar as relações entre as amostras, não podendo ser utilizada sozinha para sua classificação. Em análises de amostras biológicas, ela é frequentemente utilizada como uma ferramenta de busca de marcadores espectrais que sejam capazes de separar diferentes classes de amostras, e que podem ser úteis na construção de modelos de classificação multivariados (189). Além disso, como já mencionado, a PCA também é útil para a detecção de amostras com comportamento anômalo, cuja remoção pode ser importante para garantir a qualidade preditiva dos modelos que serão construídos (188).

A Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA) é outra técnica não supervisionada bastante utilizada na análise exploratória dos dados. Ela é um método de reconhecimento de padrões que faz parte das análises de *clustering*, ou agrupamento. Essas análises são utilizadas para determinar se existem agrupamentos naturais no conjunto de dados, e se esses agrupamentos estão relacionados a alguma característica conhecida das amostras (classes, composição, etc) (188,190). Assim, a ideia é agrupar as amostras de forma que as pertencentes a um mesmo grupo sejam mais parecidas entre si do que com as amostras dos outros grupos; portanto, maximizar a homogeneidade interna dos grupos e também a heterogeneidade externa entre os grupos (188). Na HCA, o espaço multidimensional é reduzido graficamente em um esquema bidimensional, representado por um gráfico chamado de dendrograma. O dendrograma mostra a estrutura hierárquica das amostras, na forma de uma árvore onde os comprimentos dos ramos representam o grau de similaridade entre as amostras (188).

A HCA é uma técnica aglomerativa, ou seja, cada amostra é considerada inicialmente como um grupo unitário. Levando em conta que amostras próximas entre si no espaço multidimensional possivelmente apresentam variáveis semelhantes, pode-se determinar o quanto uma amostra é semelhante a outra calculando a distância entre elas (188). Essa distância pode ser calculada utilizando diferentes algoritmos, como a distância Euclidiana, a distância de Mahalanobis e a distância de Manhattan. Da mesma forma, existem diferentes métodos para fazer o agrupamento das amostras. Todos eles partem do primeiro agrupamento, das duas amostras que apresentam a menor distância segundo a métrica escolhida (distância Euclidiana, de Mahalanobis, de Manhattan...). A partir disso, eles diferem nas etapas seguintes, na definição do critério que será utilizado para unir esse grupo aos demais elementos, fornecendo a distância entre eles. Alguns exemplos são o método do vizinho mais próximo (a distância

entre dois grupos é dada pela menor de todas as distâncias entre os objetos de dois grupos), o método do vizinho mais distante (a distância entre os grupos é dada pela maior de todas as distâncias entre os objetos dos grupos), o método da média (a distância é a média ponderada entre os objetos de ambos os grupos) e o método de Ward (a distância é dada pela soma da distância quadrada entre cada par de amostras) (188,194). É importante destacar que não existe uma regra geral para escolha do tipo de distância e do método de agrupamento que será utilizado, e a combinação escolhida pode alterar completamente os resultados obtidos (195).

Após o cálculo das distâncias entre as amostras e entre os grupos, e após todas as amostras terem sido agrupadas, é formada uma tabela com todas as distâncias, que é então representada no dendrograma (Figura 32). Para essa representação, é usualmente calculado o índice de similaridade entre os grupos. Esse índice normaliza as distâncias entre os grupos entre zero e 1, sendo calculado com a seguinte fórmula:

$$S_{AB} = 1,0 - \frac{d_{AB}}{d_{max}}$$

Nessa fórmula, d_{AB} é a distância entre os dois grupos, e d_{max} é a distância máxima do conjunto de dados (distância entre os dois grupos mais distantes). Portanto, quando a distância entre A e B é igual a 0, o índice de similaridade será máximo (=1). Da mesma forma, quando a distância entre A e B for igual à distância máxima do conjunto de dados, o índice de similaridade será igual a 0. O ponto de união entre dois grupos no dendrograma ocorre no valor correspondente ao índice de similaridade entre eles (Figura 32) (188).

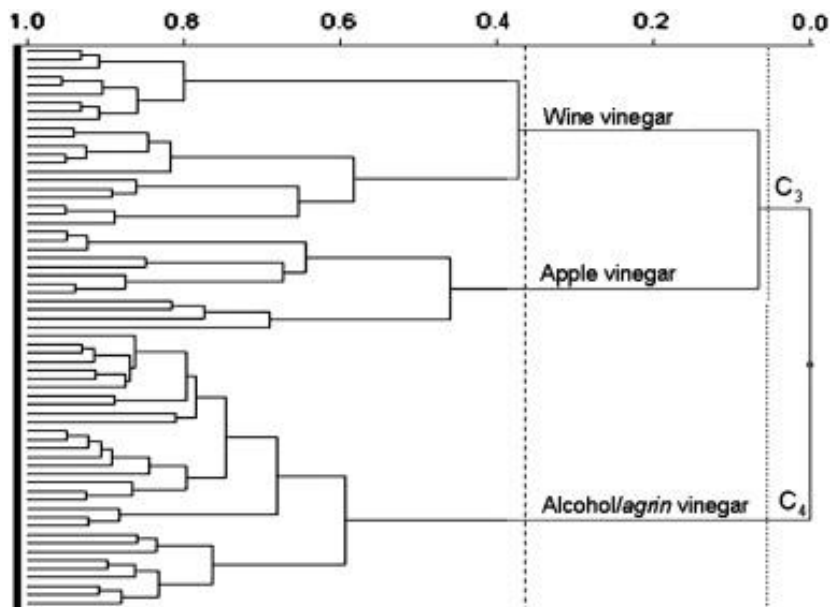


Figura 32. Exemplo de um dendrograma gerado a partir da Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA), com espectros de espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN). No caso, o estudo analisou amostras de vinagre, mostrando dois *clusters* com índice de similaridade muito baixo (aproximadamente 0,06), um deles composto por vinagres de vinho e maçã, e outro composto por vinagre de álcool/agrin. Com um índice de similaridade maior (0,37), a HCA indicou três subgrupos: um dos vinagres de vinho, um dos vinagres de maçã e um dos vinagres de álcool/agrin.

Fonte: Boffo et al. (2009) (197).

Após a análise exploratória dos dados, usualmente procede-se às análises quimiométricas supervisionadas, pois o objetivo final geralmente é o desenvolvimento de modelos para estimar uma propriedade de interesse ou para classificar as amostras (188).

2.3.2.3 Análises quimiométricas supervisionadas

Nas análises quimiométricas supervisionadas, são utilizados conhecimentos prévios sobre as amostras, ou seja, esses dados “supervisionam” as análises (12). Elas podem ser divididas em dois grandes grupos: os métodos de regressão e os métodos de classificação. Nos métodos de regressão, o objetivo é o desenvolvimento de um modelo matemático que quantifique uma propriedade de interesse, a partir da construção de uma curva de calibração que relaciona os espectros com essa propriedade. Já nos métodos de classificação, como o próprio nome indica, objetiva-se atribuir as amostras a determinadas classes, a partir das características contidas nos seus espectros. Portanto, nos métodos de regressão, a variável a ser prevista é contínua (por exemplo, a concentração de um composto na amostra), e nos métodos de classificação a variável a ser prevista é categórica (por exemplo, a partir de uma amostra de sangue de um indivíduo, classificá-lo no grupo de acometidos por uma doença ou no grupo de não acometidos - grupo controle) (195).

2.3.2.3.1 Métodos de regressão

Existem diversos métodos de regressão, como a regressão por quadrados mínimos clássicos (CLS), a regressão linear múltipla (MLR), a regressão por componentes principais (PCR) e a regressão por quadrados mínimos parciais (PLS). Todos eles visam à construção de modelos matemáticos que relacionem o conjunto de variáveis independentes X (os espectros)

com a variável dependente y (a propriedade de interesse, podendo ser uma ou mais). Como os espectros são a “impressão digital” das amostras, deve ser possível obter uma expressão matemática que determine a variável almejada, em função dos espectros (188) (Figura 33).

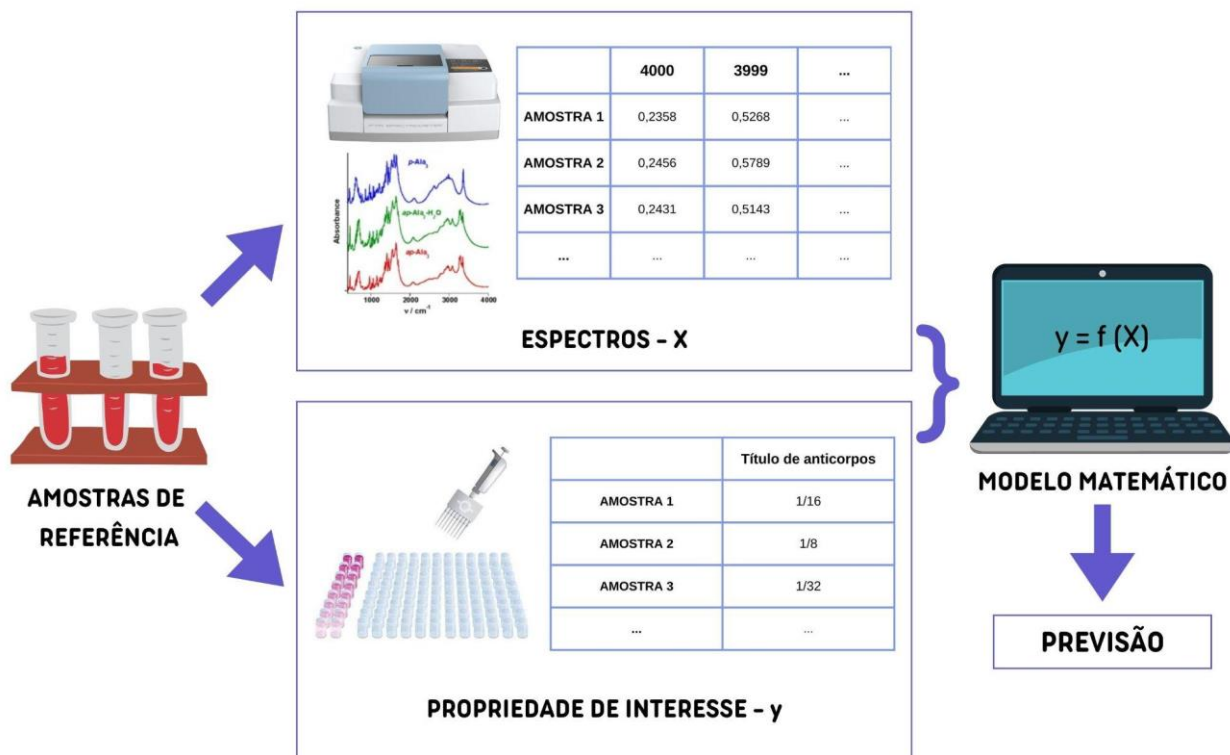


Figura 33. Representação esquemática da elaboração de um modelo de regressão a partir de dados de espectroscopia FTIR. São coletadas amostras de referência, que têm sua propriedade de interesse (no caso, títulos de anticorpos) determinada por um método de referência. Os espectros são obtidos e então é elaborado um modelo matemático que relaciona X e y , o qual permite a previsão da propriedade de interesse em novas amostras desconhecidas.

Fonte: autoria própria, elaborado a partir de Ferreira (2015) (188).

Para a construção do modelo, é necessária a utilização de um conjunto de amostras de calibração ou treinamento, para as quais a propriedade de interesse é conhecida a priori. Para isso, é utilizado algum método analítico de referência, ou seja, o método padrão-ouro de análise da variável a ser modelada. Destaca-se que, como os espectrômetros são instrumentos estáveis e as medidas espectroscópicas são bem reprodutíveis, os erros são geralmente abaixo de 1%. Assim, a maior fonte de erros na construção dos modelos de regressão é proveniente dos métodos padrão-ouro que, em geral, apresentam erros maiores. Portanto, é muito importante

que o método de referência seja realizado com cuidado e precisão, pois esses dados influenciam diretamente na qualidade preditiva do modelo construído (188). Além disso, é importante que as amostras do conjunto de calibração estejam distribuídas ao longo de toda a faixa de variação da propriedade de interesse. Por exemplo, se for concentração, as amostras do conjunto de calibração devem incluir aquelas que têm as concentrações possíveis mais baixas até as mais altas, e idealmente as amostras também devem estar bem distribuídas ao longo dessa faixa. Após a construção do modelo, este deve ser validado, pela validação interna (validação cruzada) e/ou pela validação externa (em amostras que não foram incluídas na construção do modelo, mas que tem a propriedade de interesse conhecida). Então, o modelo está pronto para realizar a previsão da propriedade de interesse em amostras novas cuja propriedade é desconhecida (188).

O método PLS é o mais utilizado em dados de espectroscopia na região do infravermelho (188). Essa regressão é uma ferramenta de redução da dimensionalidade similar à PCA, condensando os dados espectroscópicos complexos (matriz \mathbf{X}) em variáveis latentes (VL), uma combinação linear das variáveis originais, assim como as componentes principais (PCs) da PCA. Entretanto, no cálculo das PCs, busca-se apenas maximizar a variância explicada dos dados. Já no PLS, a variável dependente (matriz \mathbf{Y}) supervisiona o cálculo das variáveis latentes, cujo objetivo é maximizar a covariância entre \mathbf{X} e \mathbf{Y} , ao mesmo tempo em que maximiza a variância explicada de \mathbf{X} e \mathbf{Y} . Destaca-se que, quanto maior a covariância, maior a correlação entre \mathbf{X} e \mathbf{Y} , ou seja, melhor será a previsão da propriedade de interesse baseando-se nas informações da matriz \mathbf{X} . Na mesma lógica da PCA, as variáveis latentes apresentam ordem decrescente de variância explicada. A primeira VL tem a direção da máxima variância do conjunto de dados, a segunda VL tem a direção da máxima variância no subespaço ortogonal à primeira VL, e assim sucessivamente (188,194). Assim como na PCA, os escores e os pesos mostram como as amostras e as variáveis são projetadas ao longo das variáveis latentes, e sua interpretação é feita da mesma forma. Além dos pesos, também é gerado o coeficiente de regressão, que determina no modelo como um todo (com todas as VLs selecionadas) a importância de cada variável original de \mathbf{X} em prever a propriedade de interesse (198).

Após a definição das variáveis latentes, são elas que são utilizadas para realizar a regressão linear com a propriedade de interesse, ao invés de utilizar as variáveis originais (188,194). Um dos principais parâmetros do método PLS é a escolha do número de variáveis latentes que serão incluídas no modelo pois, quanto maior o número, maior a complexidade do modelo (mais informação utilizada). O uso de VLs de menos causa um subajuste, e o uso de VLs em excesso causa um superajuste, prejudicando a capacidade preditiva do modelo. A principal maneira de determinar o número ótimo de VLs é através da validação cruzada (188).

A validação é uma das principais etapas na elaboração de qualquer modelo, independentemente do método utilizado, pois é fundamental para avaliar quão bem ele pode prever a propriedade de interesse de novas amostras (195). Uma forma de validação fundamental em quimiometria é a validação cruzada, que, como já mencionado, também é utilizada para otimizar os parâmetros do modelo, como o número de variáveis latentes.

O método mais comum de validação cruzada é a *leave-one-out*, no qual uma amostra do conjunto de calibração (utilizado para construir o modelo) é removida e o modelo é construído com o restante das amostras. Então, a amostra excluída tem a propriedade de interesse estimada, funcionando como uma amostra de validação temporária. Isso é feito de maneira repetida até que todas as amostras tenham sido excluídas uma vez do conjunto de calibração e preditas como uma amostra de validação externa. Existem outros métodos de validação cruzada que, ao invés de excluir apenas uma amostra por vez, excluem blocos de amostras (189). Independentemente do método, após ser estimada a propriedade de interesse no conjunto de validação temporário, o resultado é comparado com os valores de referência, do método padrão-ouro. Isso dá origem aos resíduos, que são a diferença entre o valor real e o valor estimado (podendo ser positivos ou negativos). Os resíduos gerados para todas as amostras no processo de validação cruzada são sumarizados no parâmetro conhecido por RMSECV (erro quadrático médio da validação cruzada). Os valores de RMSECV são calculados para o modelo construído com um, dois, x número de VLs escolhido a priori e, em geral, escolhe-se o modelo que apresenta o menor valor de RMSECV, ou o modelo a partir do qual não há mais decréscimo considerável no valor de RMSECV (188,199).

A validação cruzada é um método simples para validar o modelo e definir o número de variáveis latentes a ser utilizado. Porém, é preciso cuidado, pois muitas vezes o número sugerido produz modelos superajustados (188). Para auxiliar na escolha do número de VLs e evitar o superajuste do modelo, existe uma normativa da ASTM (*American Society for Testing and Materials*), especificamente a normativa E1655-05 (200). Nela, é proposta a equação $N = 6(A+1)$, onde N representa o número de amostras no conjunto de calibração e A representa o número máximo de variáveis latentes no modelo, para evitar o superajuste. Assim, pode-se combinar essa informação com os valores de RMSECV para definição do número ótimo de VLs a ser utilizado.

Quando o conjunto total de amostras é grande (em geral mais de 50 amostras), além da validação cruzada, também é usualmente realizada a validação externa (201). Para isso, o conjunto de amostras é inicialmente dividido em conjunto de calibração, usado na construção do modelo, e em um conjunto de validação externa, usado para validar o modelo. Recomenda-

se que o conjunto de validação externa tenha pelo menos 30% do número de amostras do conjunto de calibração(188). A divisão das amostras nesses conjuntos pode ser feita de diferentes formas, como através da seleção aleatória ou por algoritmos, sendo o mais usual o de Kennard-Stone (KS). Esse algoritmo usa a distância Euclidiana para incluir no conjunto de calibração amostras que cobrem de maneira uniforme as variáveis do espaço amostral, se mostrando superior à seleção aleatória (189). Na validação externa, as amostras que não foram utilizadas na construção do modelo (conjunto de validação) têm sua propriedade de interesse estimada pelo modelo PLS proposto. A partir disso, é calculado o RMSEP (erro quadrático médio da previsão) que, como o nome indica, é a média dos resíduos gerados durante a previsão das amostras do conjunto de validação. O RMSEP, assim como o RMSECV, indica a qualidade preditiva do modelo, também auxiliando na escolha do número de variáveis latentes, sendo que o número ótimo é aquele que produz o menor valor de RMSEP (188).

O RMSECV e o RMSEP são duas das figuras de mérito utilizadas para avaliar a performance dos modelos PLS. As figuras de mérito, como mencionado, são parâmetros estatísticos utilizados para aferir a qualidade dos modelos quimiométricos, atestando sua qualidade e confiabilidade (188). Algumas das principais são descritas abaixo (202,203):

- Coeficiente de determinação (R^2): indica a proporção de variância da variável dependente que é explicada pelo modelo. Varia de 0 a 1 sendo que, quanto mais próximo de 1, melhor é o ajuste do modelo aos dados. Por exemplo, para um $R^2 = 0,92$, 92% da variância da variável dependente é explicada pelas variáveis independentes incluídas no modelo;
- Erro quadrático médio da validação cruzada (RMSECV): quantifica o erro médio entre os valores reais e os valores preditos no conjunto de calibração após a validação cruzada. Portanto, indica a acurácia do modelo em prever novas amostras. A unidade de medida do RMSECV é a mesma que da variável dependente, e o ideal é que o seu valor seja menor que o menor valor medido para a variável dependente nas amostras;
- Erro quadrático médio da previsão (RMSEP): quantifica o erro médio entre os valores reais e os valores previstos no conjunto de validação externa (previsão). Portanto, indica o desempenho preditivo do modelo para amostras novas. A unidade de medida do RMSEP é a mesma que da variável dependente, e o ideal é que o seu valor seja menor que o menor valor medido para a variável dependente nas amostras;
- Viés (T_{bias}): representa o viés médio entre os valores reais e os valores previstos pelo modelo. Assim, fornece informações sobre o desvio sistemático das previsões feitas

pelo modelo em relação aos valores reais. O valor de T_{bias} deve ser menor que o valor crítico de T , definido pela tabela da distribuição t de Student.

Abaixo, na Figura 34, serão ilustrados exemplificadamente os resultados de uma modelagem PLS, a partir dos quais são calculadas as figuras de mérito.

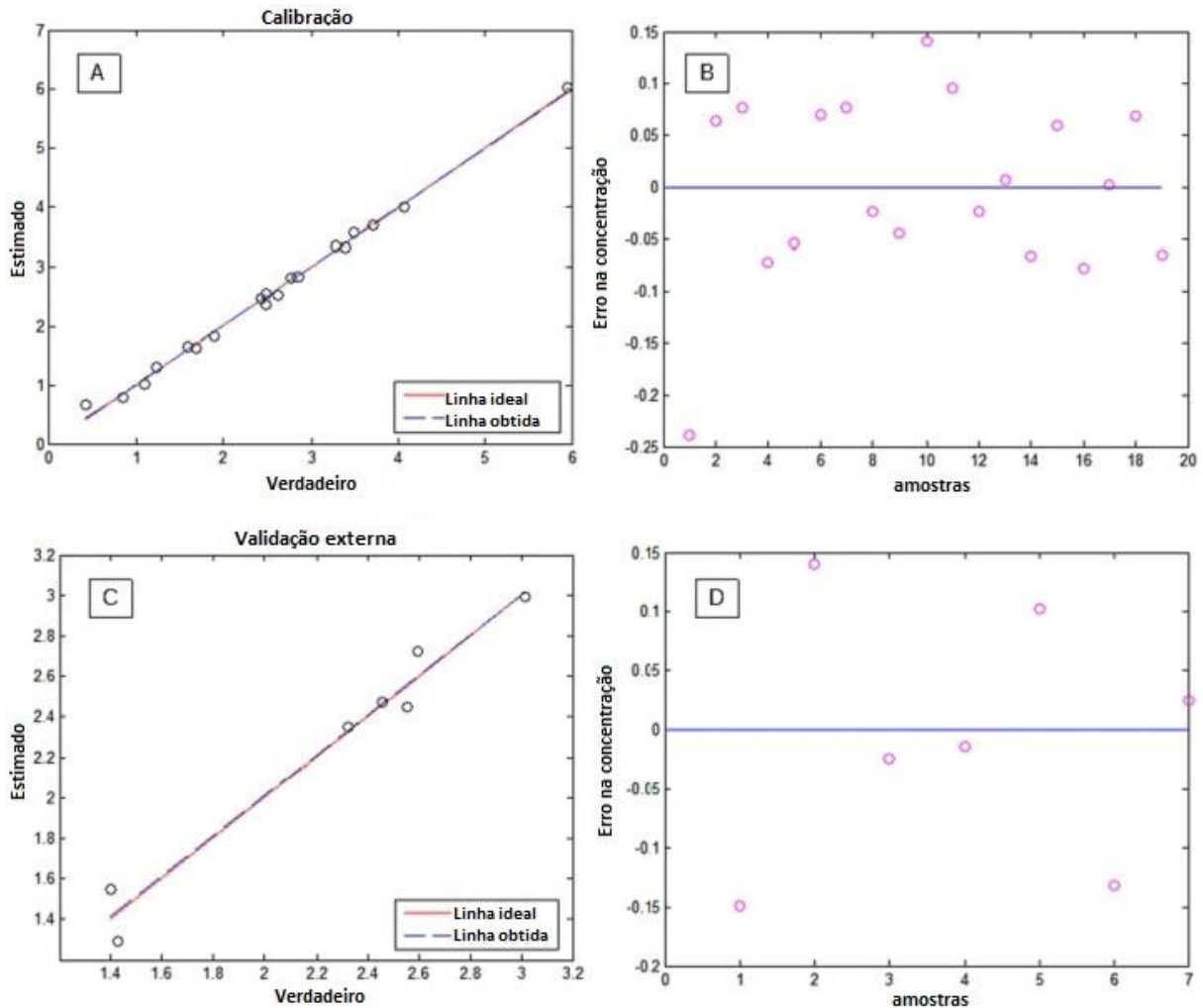


Figura 34. Exemplo de resultado do método de regressão por quadrados mínimos parciais (PLS). O objetivo da análise era realizar a previsão do teor de melanina de isolados fúngicos. Os gráficos A e B mostram o conjunto de calibração, com os valores estimados versus os valores verdadeiros no gráfico A e o erro na concentração no gráfico B. Já os gráficos C e D mostram o conjunto de validação externa. Como pode ser observado, os erros de previsão foram baixos, com o modelo obtendo RMSEP de 0.0999 e R^2 de 0.9691, demonstrando sua boa capacidade preditiva.

Fonte: Koehler et al. (2024) (202).

Finalmente, após a construção do modelo e sua validação (interna e/ou externa), ele está pronto para previsão da propriedade de interesse em novas amostras. Para que ele seja utilizado corretamente, as novas amostras devem ser preparadas da mesma maneira que as amostras utilizadas para construir o modelo, observando-se todos os aspectos desde a obtenção das amostras até a leitura no espectrômetro, e também os métodos de pré-processamento utilizados. Após, basta aplicar o modelo de regressão para prever a propriedade de interesse. É importante destacar que o modelo só é válido dentro da faixa de medidas do conjunto de calibração. Por exemplo, se estiver sendo prevista a concentração de um composto nas amostras, a concentração prevista não pode estar fora da faixa de concentrações que foi modelada com o conjunto de amostras de calibração, ou seja, não devem ser feitas extrapolações do modelo. Isso destaca novamente a importância de ter um conjunto de calibração bem representativo ao longo de toda a faixa de variação da variável de interesse. Além disso, destaca-se que, para modelos que serão utilizados a longo prazo, é importante uma revisão periódica de seu desempenho e, se necessário, realizar o ajuste com novas amostras de calibração (188).

2.3.2.3.1 Métodos de classificação

Os métodos de classificação, ou métodos supervisionados de reconhecimento de padrões, são utilizados para dados com variáveis categóricas. Nesse caso, pretende-se definir a qual grupo uma amostra pertence. Esse tipo de análise é utilizada, por exemplo, em estudos que objetivam diagnosticar uma doença, diferenciando indivíduos doentes de indivíduos não doentes (grupo controle). Os métodos de classificação são também chamados de “métodos supervisionados de reconhecimento de padrões” pois o objetivo é atribuir uma amostra à sua respectiva classe (reconhecimento), o que é feito a partir de informações a respeito das classes (de maneira supervisionada). Assim como discutido para os métodos de regressão, é necessário ter um “conjunto de treinamento”, composto por amostras cujas classes são conhecidas a priori (por um método externo), que será utilizado para construir o modelo com a “regra” de classificação. A validação do modelo, ou seja, sua capacidade de prever com sucesso a classe de novas amostras, deve ser realizada com um conjunto de validação externa, composto por amostras que não foram utilizadas para construção do modelo, mas cuja classe também é conhecida a priori. Se o resultado for satisfatório, o modelo pode ser utilizado para prever a classe de novas amostras desconhecidas (188).

Existem diversos métodos de classificação que podem ser utilizados com dados quimiométricos. Os mais “tradicionais” são o método do k -ésimo Vizinho mais Próximo

(KNN), o método SIMCA (*Soft Independent Modeling of Class Analogy*), a análise discriminante linear (LDA) e a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) (188). Quando a complexidade dos dados é muito grande, podem ser aplicadas técnicas como as redes neurais artificiais (ANNs), o algoritmo *random forest* e abordagens *deep-learning*. Esses métodos têm em comum a natureza não-linear da classificação e o fato de apresentarem maior acurácia que os métodos tradicionais. Entretanto, é necessário otimizar diversos parâmetros para que não ocorra um superajuste do modelo e, assim, essas técnicas têm um desenvolvimento mais complexo, envolvendo maior conhecimento do analista e maiores custos computacionais. Além disso, por terem uma abordagem “*black box*”, a interpretação do modelo é complexa, dificultando a análise de quais variáveis contribuem para a classificação das amostras (189). Assim, existem variados métodos de classificação, e a escolha de qual modelo utilizar deve ser baseada nas características dos dados e também no objetivo das análises (194).

Independentemente do método utilizado, para verificar os erros cometidos pelo modelo de classificação, os resultados podem ser organizados em uma tabela de contingência chamada de matriz de classificação ou matriz de confusão (Figura 35). Nela, é representada a classe verdadeira versus a classe estimada, permitindo verificar os erros e acertos do modelo. Dependendo do método utilizado, pode ser acrescentada mais uma linha na tabela, pois o modelo pode prever que a amostra não pertence a nenhuma das classes modeladas (188). Além disso, também pode acontecer que uma amostra seja considerada como pertencente a mais de uma classe. É a partir da matriz de confusão que são calculadas as figuras de mérito dos modelos de classificação (188). As principais são a sensibilidade, a especificidade e a acurácia (189,204):

- Sensibilidade: proporção de amostras positivas (por exemplo, grupo de indivíduos acometidos por uma doença) que são corretamente classificadas, conforme equação abaixo (VP = verdadeiro positivo e FN = falso negativo). O valor ótimo é de 100%;

$$Sensibilidade = \frac{VP}{(VP + FN)}$$

- Especificidade: proporção de amostras negativas (por exemplo, grupo controle) que são corretamente classificadas, conforme equação abaixo (VN = verdadeiro negativo e FP = falso positivo). O valor ótimo é de 100%;

$$Especificidade = \frac{VN}{(FP + VN)}$$

- Acurácia: mede o desempenho global do modelo, através da razão do número de amostras classificadas corretamente pelo número total de amostras, conforme equação

abaixo. Assim, indica a proporção de amostras classificadas corretamente, com valor ótimo de 100%.

$$Acurácia = \frac{(VP + VN)}{(VP + FN + FP + VN)}$$

		CLASSE VERDADEIRA	
		A	B
CLASSE ESTIMADA	A	✓	✗
	B	✗	✓

Figura 35. Esquema de uma matriz de confusão dos resultados de um modelo de classificação.
Fonte: autoria própria.

Como mencionado, existem diversos métodos de classificação e, para fins de simplificação, nesta revisão serão discutidos apenas os métodos mais usuais, que são KNN, SIMCA, LDA e PLS-DA. De maneira geral, pode-se afirmar que o KNN é uma “versão supervisionada” da HCA e a SIMCA é uma “versão” supervisionada da PCA, enquanto LDA e PLS-DA são dois tipos de análises discriminantes.

Os métodos KNN e SIMCA são chamados de técnicas de similaridade, pois se baseiam na suposição de que, quanto mais as amostras estiverem próximas no espaço de medição, maior é a chance de que elas pertençam à mesma classe. Os dois métodos diferem na forma com que definem a distância entre as amostras (193) (Figura 36).

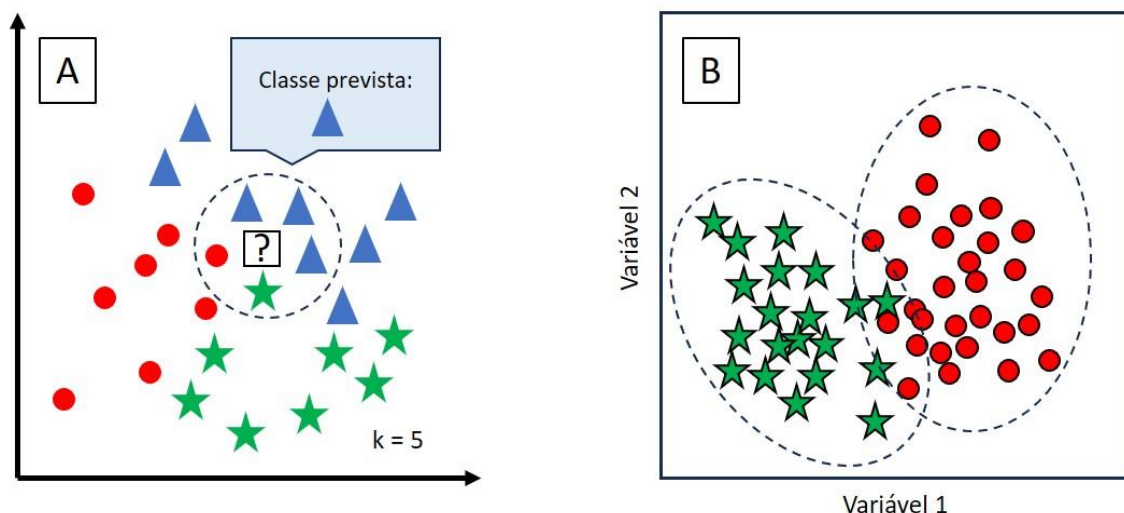


Figura 36. Comparação esquemática entre o método do k -ésimo Vizinho mais Próximo (KNN) (A) e o método SIMCA (*Soft Independent Modeling of Class Analogy*). Em (A), a classe é prevista através da distância entre as amostras, sendo possível atribuir apenas uma classe a cada amostra. Em (B), as classes são delimitadas por elipses de confiança, que podem se sobrepor, sendo possível que uma amostra pertença a nenhuma, a somente uma ou a mais de uma classe. Fonte: autoria própria.

O método do k -ésimo Vizinho mais Próximo (KNN) é um método não paramétrico, que gera uma discriminação das amostras baseado apenas na matriz de dados \mathbf{X} (dos espectros) e no conhecimento externo da classe de cada amostra, sem estabelecer qualquer pressuposto sobre a distribuição dos dados (188). De maneira simplificada, na construção do modelo, é calculada a distância que separa cada par de amostras do conjunto de calibração, e esses valores são incluídos em uma tabela de distâncias. Podem ser usadas diferentes métricas, como a distância Euclidiana ou a distância de Mahalanobis. Então, para uma amostra específica, são verificadas as classes das amostras mais próximas (vizinhos mais próximos, de onde vem o nome da análise), e cada vizinho dá um “voto” (a qual classe ele pertence). A amostra é então classificada de acordo com a maioria dos “votos” de seus vizinhos mais próximos (k) (Figura 37). Durante a construção do modelo, cada amostra é excluída uma vez do conjunto de calibração e têm sua classe prevista a partir de sua distância com as outras amostras. A escolha do número de k é uma etapa fundamental no desenvolvimento do modelo. Se o valor for muito pequeno, a amostra pode ser incorretamente atribuída a uma classe próxima cujas amostras estejam bem espalhadas e, se for muito grande, ela pode ser incorretamente atribuída a uma classe que contém um maior número de amostras no modelo. O número ótimo de k é

determinado construindo vários modelos, cada um com um maior número de vizinhos, e encontrando aquele que dá os menores erros de classificação (188,193).

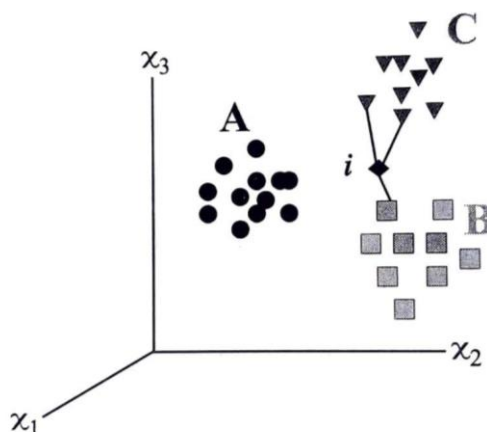


Figura 37. Classificação da amostra i pelo método KNN, em três classes possíveis: A, B ou C. Com dois vizinhos mais próximos, ela é considerada da classe B, pois houve um empate (um voto da classe B e um voto da classe B) e a menor distância é em relação à classe B. Já com três vizinhos mais próximos, ela é considerada da classe C, pois recebe dois votos dessa classe e apenas um voto de B.

Fonte: Ferreira (2015) (188).

Como vantagens, o método KNN é computacionalmente muito simples, pode ser utilizado com qualquer número de variáveis e funciona bem quando o número de amostras em uma das classes é pequeno. Porém, pode apresentar um superajuste quando as classes têm número de amostras muito diferentes, tendendo a atribuir erroneamente à classe que tem mais amostras. Além disso, não é capaz de detectar amostras anômalas, pois elas sempre são obrigatoriamente classificadas em uma e somente uma classe, e também não permite a interpretação de quais variáveis contribuem para o agrupamento das amostras (188,189). Para superar algumas dessas limitações, pode ser utilizado o método SIMCA (*Soft Independent Modeling of Class Analogy*). Esse método assume que amostras semelhantes apresentam variáveis que tendem a uma distribuição uniforme e modelável, supondo uma distribuição probabilística, ao contrário do KNN, o que permite estimar o grau de certeza na classificação (188). O SIMCA é considerado uma versão supervisionada da PCA, na qual é desenvolvido um modelo de PCA ajustado para cada classe do conjunto de dados (194). O número de fatores adequado na PCA para modelar cada classe é usualmente determinado através de validação

cruzada, otimizando a quantidade de componentes principais necessários para descrever cada classe e, assim, garantir uma boa capacidade preditiva (188).

Após o desenvolvimento dos modelos de PCA, é necessário determinar os limites no espaço-linha de cada classe, gerado pelas componentes principais. Usualmente, esses limites são determinados utilizando-se o desvio-padrão dos escores em cada componente principal. Então, é construída uma hipercaixa no subespaço complementar ao das PCs, contendo todas as amostras da classe (Figura 38). A hipercaixa é tradicionalmente definida com base nos escores máximos e nos desvios-padrão das componentes principais, utilizando a distribuição t de Student. Outros métodos que podem ser utilizados são os baseados na distância de Mahalanobis e na estatística T^2 de Hotelling, nos quais são definidas elipses que envolvem o espaço multidimensional das PCs. Essa hipercaixa ou elipse é definida no espaço onde estão os resíduos E , conforme já foi discutido para a PCA (188) (Figura 38). A partir dos resíduos da matriz E , é calculado o desvio-padrão residual de cada amostra e também o desvio-padrão residual médio da classe em questão. Com o desvio-padrão residual médio da classe, é possível calcular a sua variância residual média, que é o desvio-padrão elevado ao quadrado. Com esse dado e utilizando a estatística F , usualmente com nível de 95% de confiança, é possível definir um valor limite da variância residual das amostras de uma determinada classe, o que determina as distâncias-limite da hipercaixa (188).

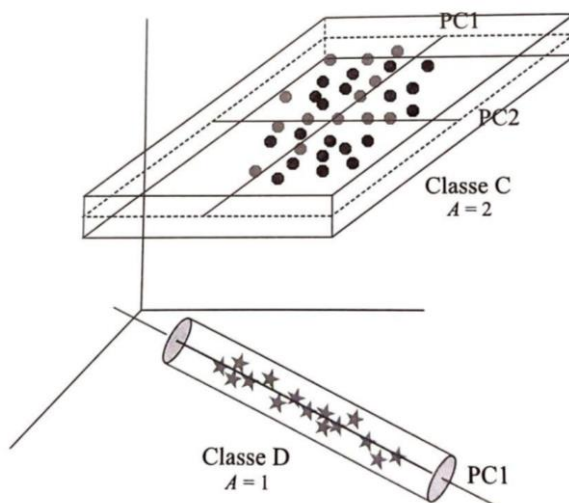


Figura 38. Limites das hipercaixas dos modelos SIMCA para duas classes hipotéticas. A classe C foi modelada com duas componentes principais, enquanto a classe D com apenas uma.

Fonte: Ferreira (2015) (188).

Para prever a classe de uma amostra, ela é projetada no espaço de cada uma das classes modeladas, calculando-se seu desvio-padrão residual, que representa a distância que a amostra se encontra do modelo ajustado para cada classe (188). O desvio-padrão residual é comparado com o valor limite determinado para a classe. Se o desvio-padrão da amostra for menor que o valor crítico, ela é considerada como pertencente à classe e, do contrário, se for maior, ela é considerada como não pertencente à classe. Assim, diferentemente do KNN, uma amostra pode ser classificada em somente uma classe, em duas ou mais classes ou em nenhuma classe (194). Os desvios-padrão residuais das amostras podem ser representados graficamente, no chamado gráfico de Coomans. Nele, as classes são representadas em pares, representando as amostras de acordo com seu valor de desvio-padrão e também indicando os valores limite de cada classe. As linhas dos limites de cada classe separam o gráfico em quatro quadrantes e, de acordo com a posição da amostra, é possível verificar se ela foi atribuída a uma, duas ou nenhuma classe (188) (Figura 39).

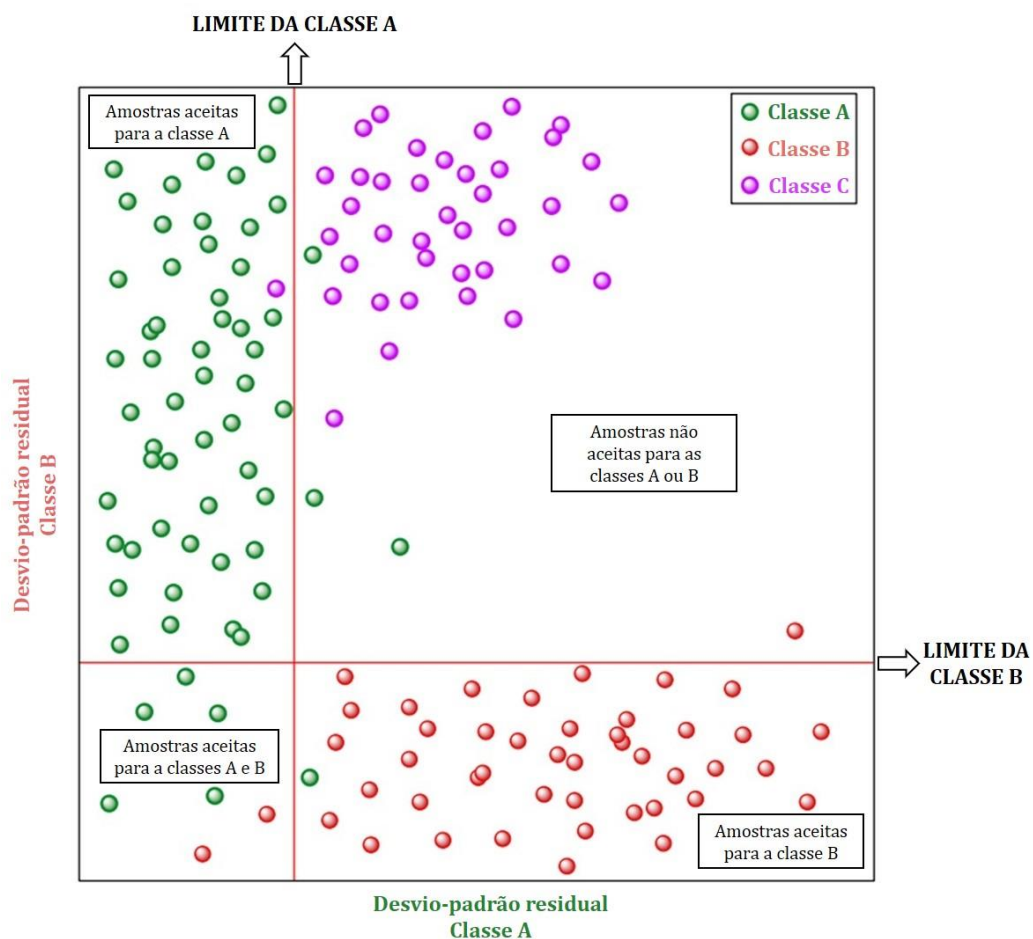


Figura 39. Exemplo de um gráfico de Coomans para um conjunto de dados com três classes (A, B e C). Estão sendo representados os desvios-padrão residuais calculados para as amostras

nos modelos da classe A (eixo x) e da classe B (eixo y). De acordo com a posição das amostras em relação ao valores-limite, é possível determinar em quais classes elas foram aceitas pelo modelo.

Fonte: adaptado de Oliveri, Downey (2013) (205).

Como os modelos SIMCA podem atribuir uma amostra a mais de uma classe, para garantir seu poder de discriminação é muito importante que as classes modeladas estejam bem separadas, existindo pouco ou nenhum grau de sobreposição entre elas (206). Além disso, em comparação com o KNN, o método SIMCA é mais complexo, e pode se tornar complicado desenvolver uma análise com mais de duas classes, pois são necessários ajustes refinados para que os modelos sejam adequados. Apesar disso, o método fornece informações detalhadas da estrutura dos modelos, como as variáveis que contribuem para a definição das classes. Outra vantagem em relação ao KNN é que as decisões de atribuição das amostras nas classes são feitas com base em testes estatísticos, o que permite expressar os resultados de maneira probabilística (193).

Agora, serão discutidos os dois métodos de análise discriminante: LDA e PLS-DA. Ambos têm em comum o fato de serem métodos lineares, que não consideram que cada grupo possa ter uma estrutura de variância diferente (195). A análise discriminante linear (LDA) é um método que busca encontrar um separador linear na projeção das classes modeladas, utilizando-o para designar a classe de novas amostras. Assim, a LDA é um método de classificação que reduz a dimensionalidade dos dados, encontrando uma combinação linear das variáveis que maximiza a separação entre as classes, ao mesmo tempo que minimiza a dispersão dentro de cada classe. A LDA é semelhante à PCA, porém, esta busca uma combinação das variáveis que apresentam maior variância, enquanto aquela busca uma combinação das variáveis que maximiza a variância entre as classes de interesse. Portanto, de maneira similar às componentes principais na PCA, são criados os discriminantes lineares (LD), que são os novos eixos que apresentam, em ordem decrescente, a maior variância entre as classes modeladas. O número máximo de dimensões (discriminantes lineares) na LDA é igual ao número total de classes modeladas menos 1 (195).

Assim, na LDA, os novos eixos formados representam uma combinação linear das variáveis originais. Para cada amostra, é atribuído um escore discriminante, que funciona como um valor predito para a mesma, e ela é designada às classes modeladas de acordo com esse escore. Para uma melhor interpretação, usualmente o resultado da LDA é representado em um gráfico no qual cada classe corresponde a um eixo. Quanto mais próximo do 0 em cada eixo,

maior a probabilidade de uma amostra pertencer à classe do respectivo eixo. Por exemplo, na Figura 40, as amostras representadas por pontos azuis pertencem à classe controle, enquanto as amostras representadas por pontos vermelhos pertencem à classe exposta (198).

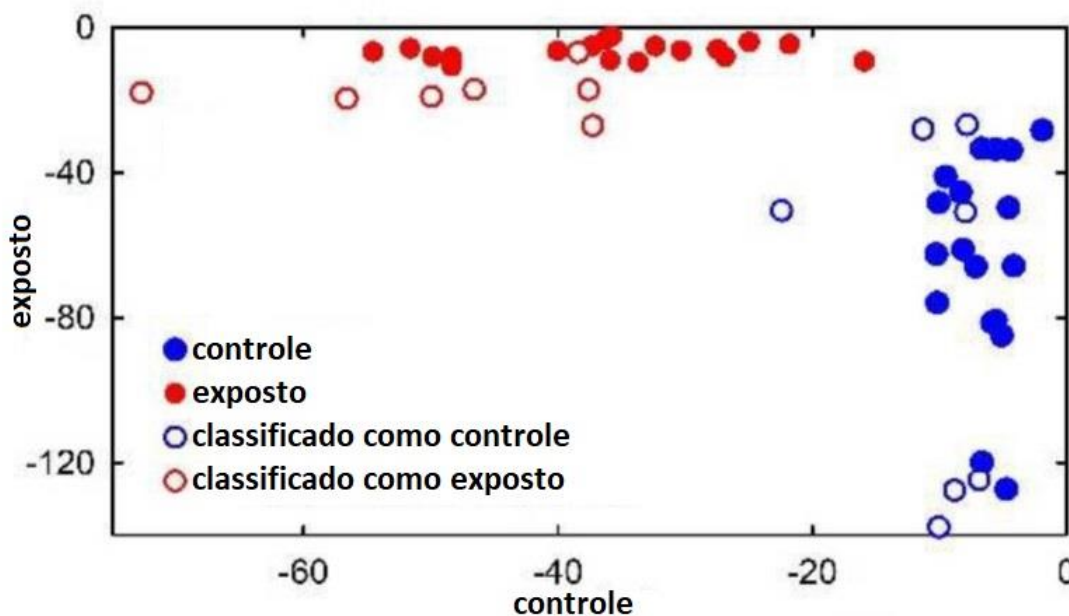


Figura 40. Resultado de uma modelagem de análise discriminante linear (LDA). As amostras representadas por pontos azuis foram classificadas como grupo controle, enquanto as representadas por pontos vermelhos foram classificadas como grupo exposto. Os círculos preenchidos são de amostras na validação cruzada, e os vazados são de amostras na validação externa. O modelo obteve acurácia de 87,5%.

Fonte: adaptado de Lasalvia et al. (2022) (198).

Destaca-se que a LDA é um método paramétrico, ou seja, assume que as amostras apresentam uma distribuição normal. Mesmo que os dados espectroscópicos utilizados não sigam perfeitamente essa distribuição, aumentar o número de amostras pode reduzir esse problema, de acordo com o teorema central do limite (189). Além disso, para essa análise, o número de variáveis não pode ser maior que o número de amostras, o que é usual em dados de espectroscopia. Assim, geralmente a LDA é acoplada a algum método de seleção de variáveis ou à PCA (PCA-LDA), método no qual a análise discriminante é aplicada nos escores da PCA, ao invés das variáveis originais, o que permite condensar os dados (198). Porém, os escores da PCA não necessariamente descrevem as diferenças entre as amostras e, assim, a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) usualmente apresenta melhores resultados que a PCA-LDA (189).

A PLS-DA é um método de extração de características e classificação. Ele utiliza a mesma técnica de regressão multivariada do PLS, diferindo no tipo de variável dependente que, no caso do PLS-DA, é uma variável categórica. Assim, o vetor Y (variável dependente) é construído com valores de 1 ou 0, sendo que usualmente o valor 1 é atribuído à classe de interesse, e o valor 0 é atribuído à outra classe (204) (Figura 41). Portanto, no PLS-DA, um modelo PLS é aplicado aos dados espectrais, reduzindo as variáveis espectrais originais a um menor número de variáveis latentes que maximizam a covariância entre X e Y, ou seja, que apresentam as direções que melhor discriminam as classes. Então, as variáveis latentes são utilizadas para realizar a regressão linear com a propriedade de interesse (a qual classe a amostra pertence) (188,189). Assim como no PLS, a formação das variáveis latentes originais resulta em escores e pesos, relativos às amostras e as variáveis, relativamente. Além disso, também pode ser observado o coeficiente de regressão, que mostra as variáveis mais importantes no modelo PLS-DA gerado (198) (Figura 42).

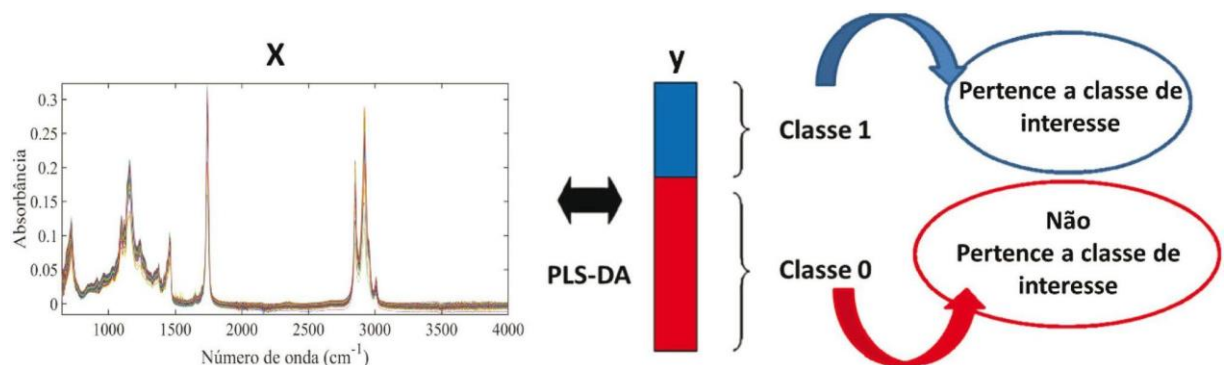


Figura 41. Organização dos dados para construção de modelo de classificação utilizando análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA).

Fonte: de Santana et al. (2020) (204).

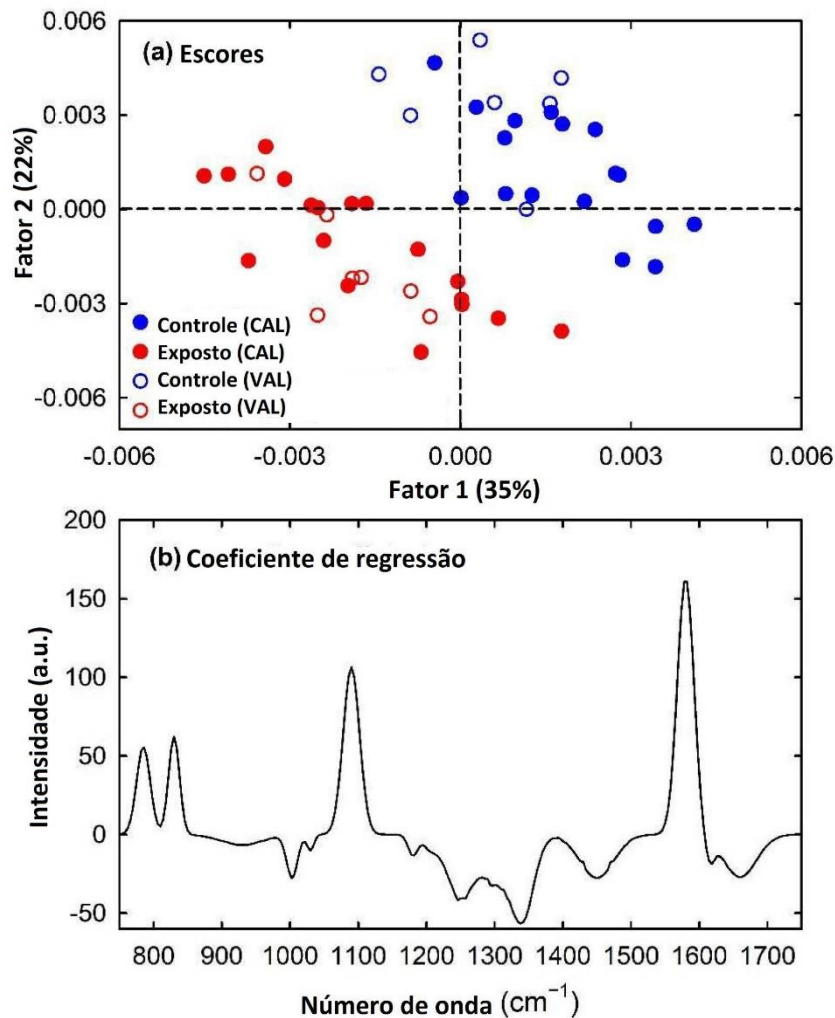


Figura 42. (A) Gráfico de escores (VL1 vs. VL2) de um modelo de PLS-DA, mostrando as amostras do conjunto de calibração (círculos preenchidos) e do conjunto de validação (círculos vazados). Observa-se a separação dos grupos controle (azul) e exposto (vermelho); (B) Coeficiente de regressão do modelo com duas variáveis latentes, mostrando que as variáveis mais importantes são os números de onda de 780, 830, 1090 e 1058 cm^{-1} , aproximadamente. Fonte: adaptado de Lasalvia et al. (2022) (198).

Como na modelagem PLS, o número ótimo de variáveis latentes no modelo é determinado pela validação cruzada, analisando-se principalmente a sensibilidade e especificidade (188). O número ótimo é aquele que apresenta a maior sensibilidade e especificidade, sem causar um superajuste do modelo (importante também considerar a norma da ASTM mencionada anteriormente). Com as classes codificadas em 0 e 1, o modelo estima valores para as amostras e, a partir desses valores, atribui elas às classes. Espera-se que amostras que pertencem à classe 0 apresentem valores próximos de 0, enquanto amostras que pertencem à classe 1 apresentem valores próximos de 1. Assim como nos modelos de regressão, os valores

de RMSECV (no conjunto de calibração) e RMSEP (no conjunto de validação) são calculados através dos erros nos valores previstos para as amostras. Baseando-se no valor estimado para cada amostra, é estabelecido um limiar entre as classes, ou seja, um valor limite entre 0 e 1, que determina a qual classe as amostras pertencem (Figura 43).

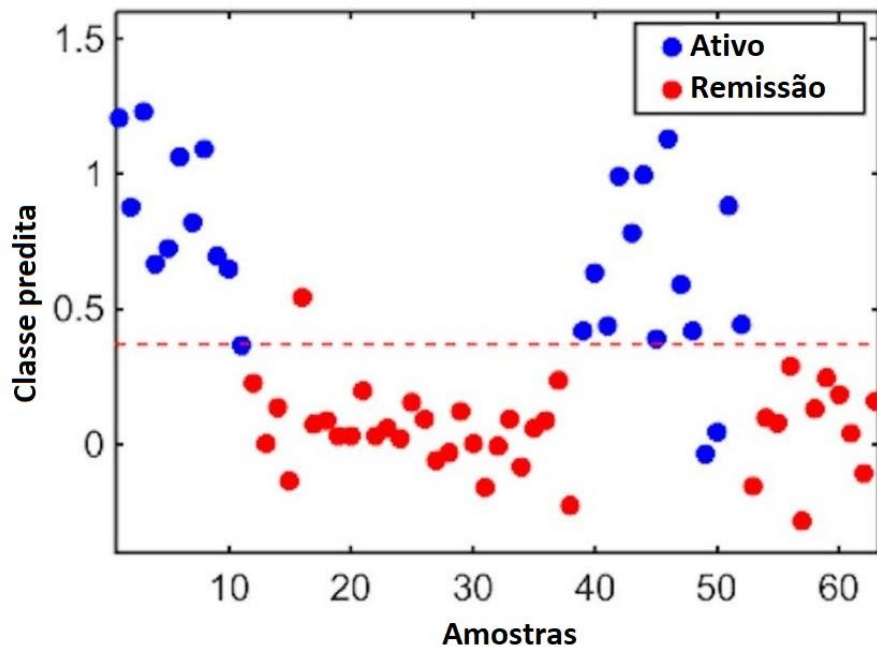


Figura 43. Resultado da classificação com um modelo de análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), com cinco variáveis latentes. Foram utilizadas amostras de plasma, lidas com espectroscopia FTIR e classificadas nos grupos doença ativa (classe 1) ou remissão (classe 0). No caso, está sendo mostrado o conjunto de calibração, que obteve acurácia de 93,6%, sensibilidade de 96,3% e especificidade de 90,9%.

Fonte: adaptado de Morris et al. (2021) (207).

Destaca-se que o método PLS-DA é que o resultado é um classificador binário (194). Quando mais de duas classes são analisadas, é construída uma **matriz** para **Y**, que contém 1 quando a amostra pertence à classe de interesse e 0 quando não pertence. Não é possível codificar as amostras com números sequenciais (por exemplo, 1, 2, 3...), pois isso representaria que existe uma relação de distância entre elas. Assim, quando mais de duas classes são analisadas, é formada uma matriz **Y** com *m* linhas (amostras) e *n* colunas (classes) (189). Existem duas variantes do PLS-DA, que são o PLS1-DA e o PLS2-DA. A primeira usualmente é utilizada para problemas com apenas duas classes pois, para cada coluna de **Y**, é construído um modelo. Assim, caso existam quatro classes, serão construídos quatro modelos, um para

cada classe, o que torna o método mais trabalhoso. Portanto, para problemas multiclasse, usualmente é utilizada a variante PLS2-DA, na qual é construído apenas um modelo para todas as classes, com um único conjunto de escores e pesos para todas as colunas da matriz \mathbf{Y} . Nesse método, a comparação ainda é da classe de interesse versus todas as demais classes, e o PLS-DA segue apresentando uma classificação binária. Porém, a vantagem é gerar apenas um modelo, simplificando a análise, mas obrigando a utilizar o mesmo número de variáveis latentes para modelar todas as classes (204).

2.3.2.4 Aplicação das análises quimiométricas

A finalidade das análises quimiométricas, tanto não supervisionadas como supervisionadas, usualmente é o desenvolvimento de uma aplicação prática, que atenda a algum objetivo pré-estabelecido. Essas aplicações têm como pilares as amostras, os espectros e os métodos matemáticos utilizados, que devem estar alinhados e serem cuidadosamente analisados. A sua vantagem em relação a outros métodos analíticos é a possibilidade de uma visão holística dos sistemas ou amostras, uma vez que a espectroscopia vibracional fornece a “impressão digital” do material analisado (208). Na Figura 44, foram esquematizadas as etapas para desenvolvimento de uma aplicação prática a partir de dados espectroscópicos, com ênfase para análises quimiométricas supervisionadas. Esse desenvolvimento é iniciado pela definição das características do estudo, com seus objetivos e os tipos de variáveis que serão analisadas (se contínuas ou categóricas). A partir disso, escolhe-se um método de amostragem e as amostras são coletadas. A variável de interesse do estudo é determinada para essas amostras a partir do método padrão-ouro para análise e, concomitantemente, são adquiridos os espectros das amostras. Esses espectros são pré-tratados e, então, é desenvolvido o modelo quimiométrico com o algoritmo escolhido de acordo com o objetivo do estudo e o tipo de variável (algoritmos de regressão para variáveis contínuas e algoritmos de classificação para variáveis categóricas). Por fim, o modelo desenvolvido para prever a variável de interesse é validado com parâmetros estatísticos específicos (Figura 44).

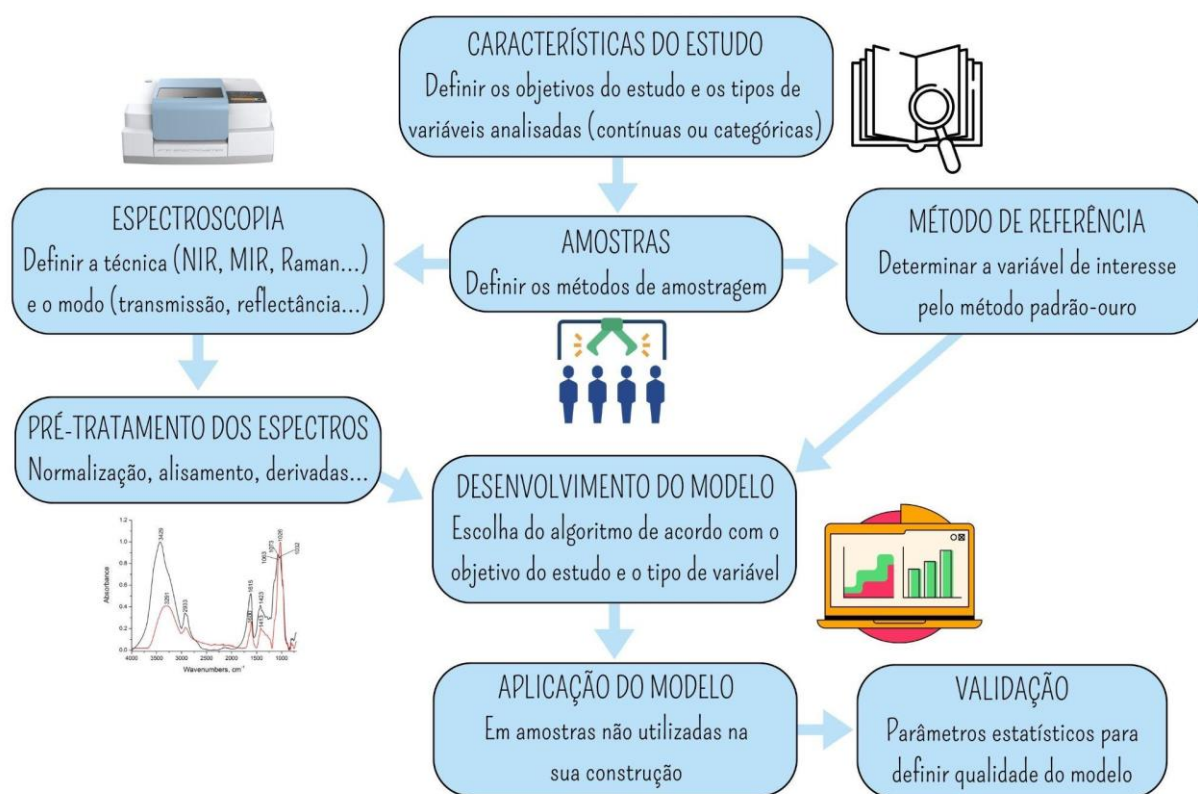


Figura 44. Etapas para desenvolvimento de uma aplicação prática das análises quimiométricas supervisionadas. Para as não supervisionadas, desconsidera-se o item “método de referência”, pois nessas análises não são utilizadas variáveis dependentes.

Fonte: autoria própria, elaborado com base em Cozzolino (2020) (208).

2.3.3 Uso no diagnóstico clínico

Uma das aplicações práticas da integração de dados de espectroscopia no infravermelho e análises quimiométricas é o diagnóstico de doenças. As condições patológicas geram alterações estruturais e funcionais no organismo, que são refletidas em alterações nos espectros vibracionais (12). Os biomarcadores de doenças podem ser encontrados em diferentes amostras biológicas, como biofluidos, células e tecidos (13) (Figura 45). O diagnóstico em biofluidos como sangue, saliva e urina tem destaque pela sua natureza não invasiva ou minimamente invasiva, permitindo a detecção de alteração em metabólitos até mesmo nos estágios iniciais de diversas condições patológicas (209).

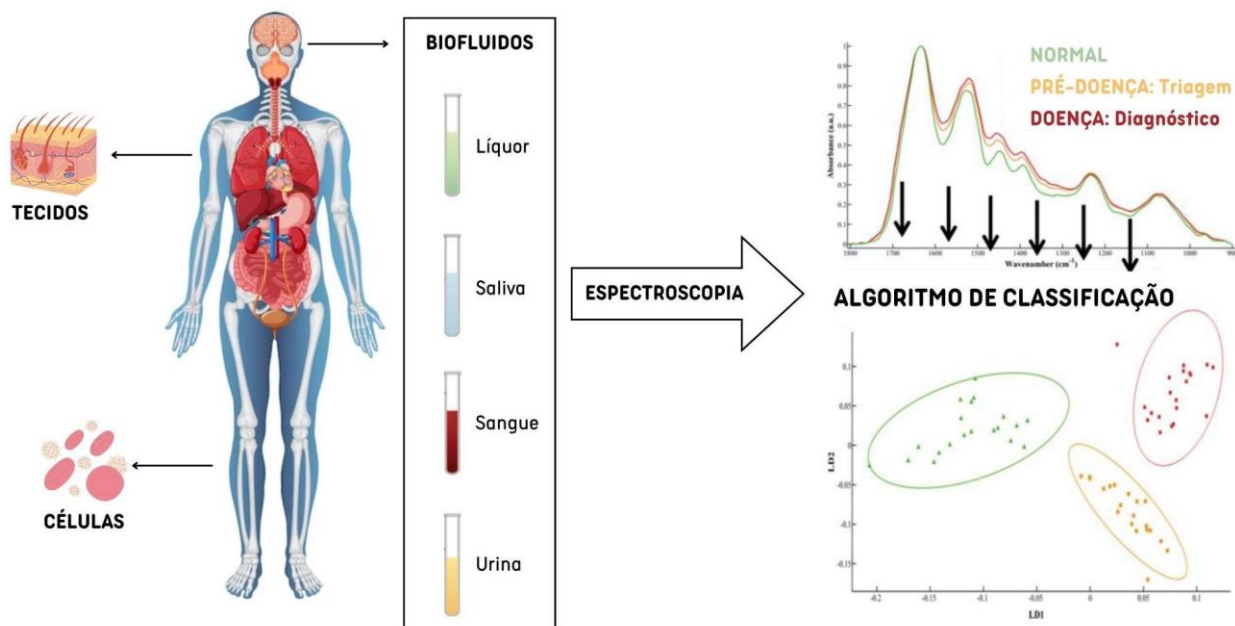


Figura 45. Esquema da utilização clínica da espectroscopia no infravermelho para diagnóstico de doenças. Diversos biofluidos e outros materiais biológicos como células e tecidos podem ser obtidos, nos quais podem existir biomarcadores de patologias. Os espectros que contêm a “impressão digital” dessas amostras podem detectar essas diferenças e permitir a triagem e diagnóstico dos pacientes, a partir da análise com métodos matemáticos.

Fonte: autoria própria, elaborado a partir de Mitchell et al. (2014) (210).

A espectroscopia no infravermelho já foi proposta para o diagnóstico de inúmeras condições patológicas, como vários tipos de câncer (pele, mama, colo uterino, próstata, sistema gastrointestinal, cérebro, bexiga, cavidade oral, esôfago, fígado, entre outros), doenças neurológicas (doença de Alzheimer, doença de Parkinson, epilepsia, esclerose múltipla, acidente vascular cerebral, entre outras), diabetes, aterosclerose, entre outras diversas doenças (12,211). No âmbito das patologias infecciosas, alguns estudos já utilizaram a espectroscopia no infravermelho para diagnóstico, principalmente para infecções bacterianas e virais em humanos, como no caso de infecção por *Helicobacter pylori* (212–215), infecções bacterianas diversas (216), infecção por poliovírus (217), HIV (218,219), artrite séptica (220), HPV (221,222), doenças infecciosas bacterianas e virais em crianças (223), dengue (224), infecção por *Salmonella typhi* (225), COVID-19 (226–231) e infecção por zika vírus (232). Ademais, a espectroscopia no infravermelho também já foi proposta para diagnóstico de doenças causadas por protozoários, nematelmintos e platelmintos, como para malária em humanos (233,234), leishmaniose em cães (235), parasitas gastrointestinais em ovelhas (236) e equinococose cística em ovelhas (237). Na área de micologia, a espectroscopia no infravermelho é utilizada

principalmente para identificação de fungos de importância médica a partir de culturas puras, como para leveduras do gênero *Candida*, fungos dermatófitos e fungos dematiáceos (238,239). Para diagnóstico de doenças fúngicas a partir de amostras biológicas, a técnica foi utilizada de maneira escassa, apesar de apresentar potencial para tal aplicação.

Assim, a espectroscopia no infravermelho já mostrou potencial para diagnóstico de uma ampla gama de condições patológicas. Ademais, ela apresenta vantagens em relação a outras técnicas, pois é altamente sensível a alterações moleculares, é não invasiva e não destrutiva, não necessita de reagentes e tem custo acessível, não gera resíduos e não exige preparação das amostras, além de ser simples e rápida de executar (12,13). Com essas vantagens, a técnica já é amplamente utilizada em aplicações diversas nas indústrias farmacêutica, de alimentos, de análises ambientais e de análises forenses. Na área clínica, entretanto, a espectroscopia no infravermelho tem se limitado majoritariamente apenas a estudos de prova de conceito, sem uma aplicação prática efetiva. De fato, demonstrar potencial como uma ferramenta clínica poderosa não necessariamente demonstra adequação para uso clínico. Apesar das vantagens citadas acima, a espectroscopia no infravermelho na sua atual forma pode não ser adequada para o uso clínico, devido a diversos fatores. Dentre estes, cita-se o fato de os espectrômetros utilizados em pesquisas serem em geral instrumentos caros e de grandes dimensões, incompatíveis com automação, apesar de já existirem equipamentos mais compactos. Ademais, nem sempre os resultados das análises quimiométricas são intuitivos. Assim, algumas iniciativas têm proposto o desenvolvimento de dispositivos de espectroscopia FTIR no formato de *point-of-care* (POC) *testing*, que são testes diagnósticos rápidos em biofluidos que podem ser realizados diretamente no ponto de atendimento, apresentando os resultados de maneira simplificada. Esses dispositivos eliminam os custos de transporte de amostras e análises laboratoriais, permitindo uma análise imediata e que pode ser repetida inúmeras vezes para monitorar o surgimento de condições patogênicas (13,210) (Figura 46).

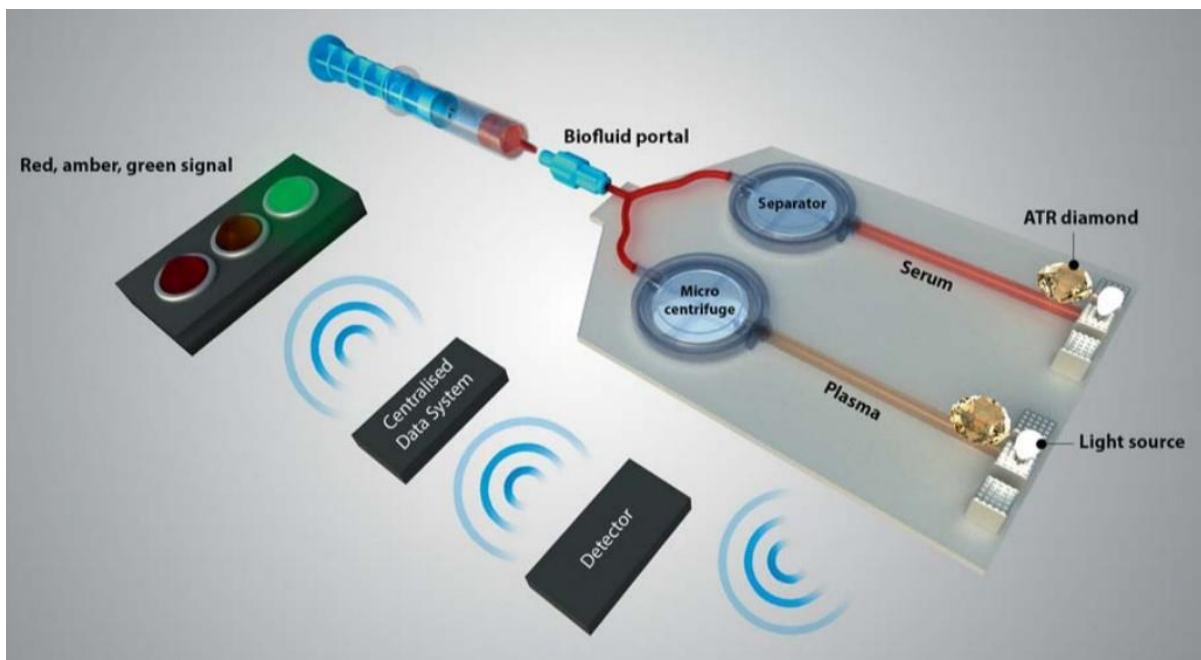


Figura 46. Exemplo de um dispositivo de *point-of-care* (POC) testing. Nele, uma lanceta é utilizada para coletar uma pequena quantidade de sangue, o qual passa por uma microcentrífuga para separação do soro e do plasma. As amostras são direcionadas diretamente para um sensor interno, como um diamante de ATR, e uma fonte de luz promove a geração dos espectros. Os espectros são direcionados para uma base de dados centralizada, que permite seu pré-tratamento sua e classificação de forma automática. Baseado no resultado, um sinal luminoso é acionado, com luz verde (resultado normal), âmbar (sinais precoces de doença) ou vermelha (diagnóstico da doença).

Fonte: Mitchell et al. (2014) (210).

Destaca-se, por fim, que as condições para a adequação clínica da espectroscopia no infravermelho provêm principalmente de duas perguntas que analisam sua custo-efetividade: (1) A técnica proposta irá melhorar os desfechos clínicos? (2) A técnica proposta irá aliviar o impacto financeiro nos sistemas de saúde ao mesmo tempo em que gera receitas? Satisfazer a essas duas condições de custo-efetividade é indispensável para realizar a translação clínica de métodos baseados em espectroscopia no infravermelho (13).

2.3.4 Uso na paracoccidioidomicose

Especificamente em análises relativas aos fungos do gênero *Paracoccidioides* e à paracoccidioidomicose, foram encontrados três estudos utilizando espectroscopia no infravermelho.

O primeiro data de 2014 e teve um enfoque no diagnóstico. Porém, a técnica principal não foi a espectroscopia FTIR, mas sim nanopartículas de ouro, elaboradas com sequências de DNA ribossômico específicas de *P. brasiliensis*. Para realizar o teste diagnóstico, essas nanopartículas foram incubadas com fragmentos amplificados de DNA complementar (teste positivo, com formação de dupla-hélice) e não complementar (teste negativo, sem formação de dupla-hélice). A formação de dupla-hélice promove mudança de cor da solução, indicando um teste positivo. Entretanto, para que ocorra uma mudança de cor visível a olho nu, é necessária uma boa quantidade de DNA; se é misturado menos DNA, são necessárias técnicas mais sensíveis para que se identifique um teste positivo. Nesse contexto, foi utilizada a espectroscopia FTIR, que permite caracterizar as soluções positivas e negativas ao fornecer a “impressão digital” das amostras. Os autores conseguiram classificar os testes positivos e negativos com base nos modos vibracionais das amostras, sendo que os que mais contribuíram foram aqueles relacionados à dupla hélice de DNA (NHN e NHO). Assim, neste estudo, a espectroscopia foi utilizada como análise complementar no diagnóstico da PCM (240).

Em 2016, a espectroscopia FTIR foi utilizada para caracterizar *P. brasiliensis* na forma de levedura e na forma de micélio. Para isso, o fungo foi cultivado nas duas formas e os espectros foram obtidos no modo de transmissão. As diferenças nos espectros das formas de levedura e de micélio foram encontradas em bandas de proteínas, lipídios e carboidratos, correspondentes às diferenças estruturais entre as duas formas. As principais diferenças encontradas foram nos modos vibracionais relativos à estrutura da parede celular fúngica, especificamente ao 1,3- β -glucano, usualmente encontrado na forma micelial, e ao 1,3- α -glucano, usualmente encontrado na forma de levedura. Assim, foi possível obter uma “assinatura química” de espectroscopia FTIR capaz de distinguir as duas formas de *P. brasiliensis*. Os autores ressaltaram a importância dessa técnica como uma ferramenta para comparar a mesma forma do fungo exposta a diferentes condições experimentais, por exemplo, na exposição a antifúngicos ou a estresses ambientais (241).

Já em 2022, foi publicado o primeiro estudo com enfoque para o diagnóstico da PCM utilizando somente espectroscopia FTIR. Neste trabalho, foram utilizadas amostras de soro de 20 pacientes com PCM e 20 amostras de soro de indivíduos saudáveis, constituindo o grupo controle. Os espectros foram adquiridos pela técnica ATR, na região de 4000 a 600 cm^{-1} , e pré-tratados por padronização normal de sinal (SNV). Inicialmente, foi realizada uma PCA para redução da dimensionalidade dos dados, permitindo a obtenção das componentes principais no lugar das variáveis originais. As PCs foram utilizadas na elaboração de modelos de classificação

baseadas nos algoritmos de análise discriminante (DA), máquina de vetores de suporte (SVM) e KNN. Esses algoritmos trabalham com a distribuição das amostras nas PCs, sendo que cada um estabelece determinado critério de separação das classes, utilizando esse critério para classificar novas amostras. Foram testadas várias abordagens no desenvolvimento dos modelos, com número de PCs otimizado e diferentes regiões espectrais, e a acurácia dos modelos foi determinada pela validação-cruzada *leave-one-out*. Os melhores resultados foram obtidos com o algoritmo SVM na região de 3100 a 2800 cm^{-1} e utilizando três PCs, com 100% de sensibilidade, 83,3% de especificidade e 91,67% de acurácia. Como destacado pelos autores, o estudo deve ser considerado como uma prova de conceito, pois não utilizou conjunto de amostras de validação externa, nem incluiu no grupo controle outras micoses que podem ser confundidas com a PCM (14).

Considerando que foram encontrados apenas três trabalhos, a espectroscopia no infravermelho ainda foi pouco utilizada em estudos sobre a PCM. Levando em conta as vantagens na utilização desta técnica, e que a mesma já mostrou potencial para diagnóstico da PCM, destaca-se a oportunidade do desenvolvimento de novos estudos mais aprofundados sobre o assunto.

3. MARCO CONCEITUAL

A Figura 47 mostra o marco conceitual da pesquisa realizada, organizado como um mapa conceitual que evidencia os principais elementos e como estes relacionam-se entre si.

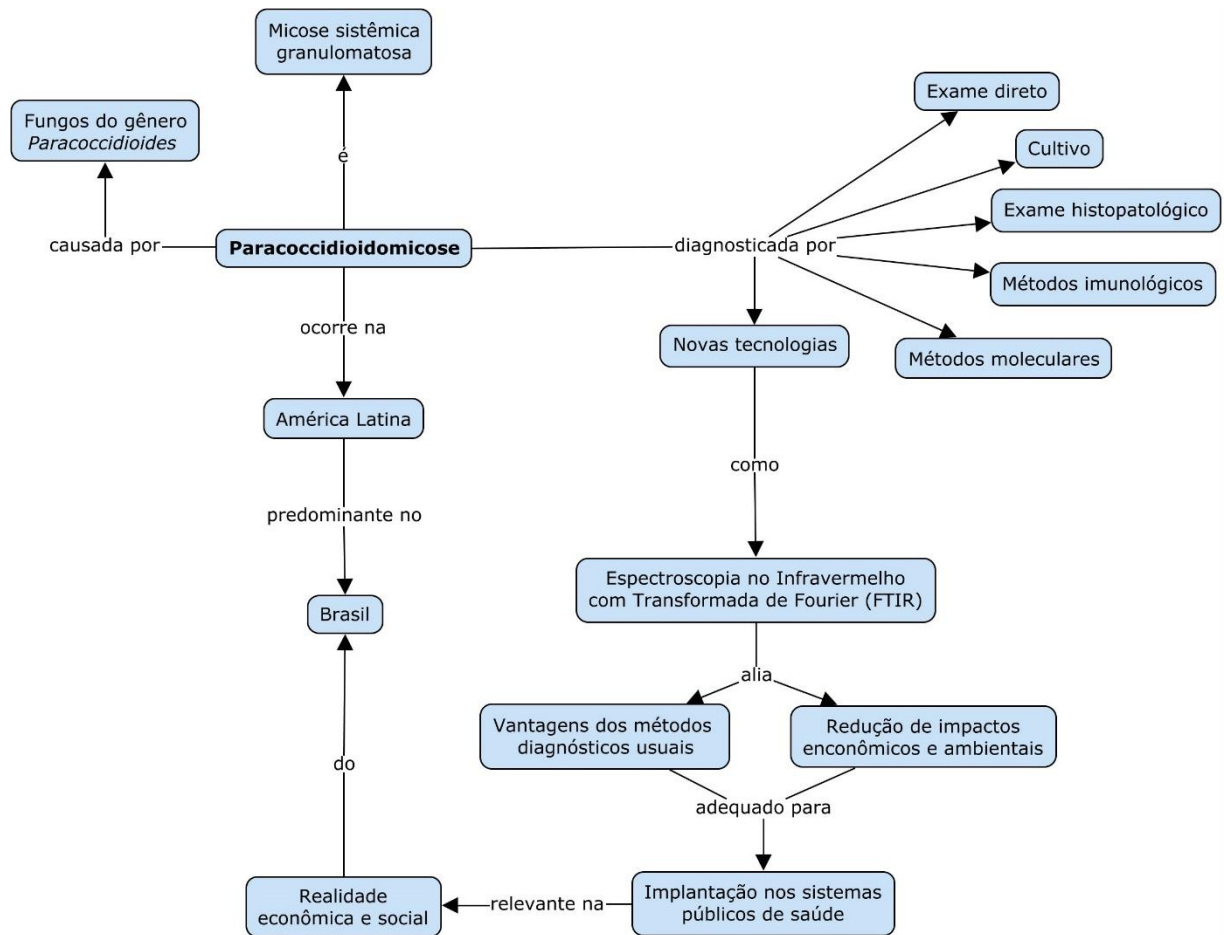


Figura 47. Marco conceitual da pesquisa realizada.

Fonte: autoria própria.

4. JUSTIFICATIVA

Por ser uma doença tropical negligenciada e endêmica de nosso país, existe de maneira contínua a necessidade de desenvolver pesquisas sobre a PCM, principalmente no contexto do Brasil. Assim, esse projeto de pesquisa foi proposto para o desenvolvimento de aplicações da espectroscopia FTIR no manejo clínico da PCM, principalmente para o diagnóstico, além do uso para a titulação de anticorpos. Esse estudo se constitui num primeiro passo para simplificação de diagnóstico laboratorial com a realização de testes moleculares e imunológicos simultâneos e diferenciados em uma única análise espectroscópica. Desta maneira, espera-se contribuir para a produção e o uso de evidências científicas nas políticas de regulação de saúde e nos padrões de incorporação e de utilização de tecnologias. Com a avaliação da eficácia dos novos métodos baseados em espectroscopia FTIR, almeja-se apresentar uma nova metodologia com maior possibilidade de acesso e custo reduzido de exames diagnósticos para infecções fúngicas invasivas em hospitais públicos terciários.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Desenvolver novos métodos diagnósticos para a PCM baseados em espectroscopia FTIR e análises quimiométricas.

5.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a amostra selecionada para o estudo quanto ao seu perfil demográfico clínico, em relação à PCM;
- Avaliar o perfil de impressão digital metabólica por espectroscopia FTIR de soro de pacientes com PCM;
- Desenvolver um método multivariado à base de espectroscopia FTIR para diagnosticar pacientes com PCM a partir de amostras de soro;
- Desenvolver um método multivariado à base de espectroscopia FTIR supervisionado por imunodifusão sérica para prever os títulos de anticorpos de pacientes com PCM;
- Avaliar o desempenho (sensibilidade, especificidade, acurácia) dos novos métodos desenvolvidos em relação aos métodos de supervisão.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mendes RP, Cavalcante R de S, Marques SA, Marques MEA, Venturini J, Sylvestre TF, et al. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. *Open Microbiol J.* 2017;11:224–82.
2. Griffiths J, Lopes Colombo A, Denning DW. The case for paracoccidioidomycosis to be accepted as a neglected tropical (fungal) disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13(5):e0007195.
3. Millington MA, Nishioka S de A, Martins ST, Santos ZMG Dos, Lima Júnior FEF de, Alves RV. Paracoccidioidomicose: abordagem histórica e perspectivas de implantação da vigilância e controle. *Epidemiol e Serv saude - Rev do Sist Unico Saude do Bras.* 2018;27(spe):e0500002.
4. Vilela R, de Hoog S, Bensch K, Bagagli E, Mendoza L. A taxonomic review of the genus *Paracoccidioides*, with focus on the uncultivable species. *PLoS Negl Trop Dis.* 2023;17(4):e0011220.
5. Sil A, Andrianopoulos A. Thermally dimorphic human fungal pathogens—Polyphyletic pathogens with a convergent pathogenicity trait. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(8):1–17.
6. Hahn RC, Hagen F, Mendes RP, Burger E, Nery AF, Siqueira NP, et al. Paracoccidioidomycosis: Current Status and Future Trends. *Clin Microbiol Rev.* 2022;35(4):e0023321.
7. Puccia R, Vallejo MC, Matsuo AL, Longo LVG. The *Paracoccidioides* cell wall: past and present layers toward understanding interaction with the host. *Front Microbiol.* 2011;2:16137.
8. Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL, Telles F de Q, Kono A, Paniago AMM, et al. II Consenso Brasileiro em Paracoccidioidomicose - 2017. *Epidemiol e Serv saude - Rev do Sist Unico Saude do Bras.* 2018;27(spe):e0500001.

9. Peçanha PM, Peçanha-Pietrobon PM, Grão-Velloso TR, Rosa Júnior M, Falqueto A, Gonçalves SS. Paracoccidioidomycosis: What We Know and What Is New in Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *J Fungi*. 2022;8(10):1098.
10. Teles FRR, Martins ML. Laboratorial diagnosis of paracoccidioidomycosis and new insights for the future of fungal diagnosis. *Talanta*. 2011;85(5):2254–64.
11. Pinheiro BG, Hahn RC, Camargo ZP de, Rodrigues AM. Molecular Tools for Detection and Identification of *Paracoccidioides* Species: Current Status and Future Perspectives. *J Fungi* . 2020;6(4):293.
12. Balan V, Mihai C-T, Cojocaru F-D, Uritu C-M, Dodi G, Botezat D, et al. Vibrational Spectroscopy Fingerprinting in Medicine: from Molecular to Clinical Practice. *Mater*. 2019;12(18):2884.
13. Finlayson D, Rinaldi C, Baker MJ. Is Infrared Spectroscopy Ready for the Clinic? *Anal Chem*. 2019;91(19):12117–28.
14. de Brito ECA, Franca T, Canassa T, Weber SS, Paniago AMM, Cena C. Paracoccidioidomycosis screening diagnosis by FTIR spectroscopy and multivariate analysis. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2022;39:102921.
15. Benchimol JL, Sá MR. *Adolpho Lutz: Dermatologia e Micologia*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ; 2004.
16. Moreira APV. Paracoccidioidomicose: histórico, etiologia, epidemiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos. *BEPA - Bol Epidemiol Paul*. 2008;5(51):11–23.
17. Jiang Y, Dukik K, Muñoz JF, Sigler L, Schwartz IS, Govender NP, et al. Phylogeny, ecology and taxonomy of systemic pathogens and their relatives in Ajellomycetaceae (Onygenales): *Blastomyces*, *Emergomyces*, *Emmonsia*, *Emmonsiiellopsis*. *Fungal Divers*. 2018;90(1):245–91.

18. Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol.* 2006;23(1):65–73.
19. Theodoro RC, Teixeira M de M, Felipe MSS, Paduan KDS, Ribolla PM, San-Blas G, et al. Genus *Paracoccidioides*: Species recognition and biogeographic aspects. *PLoS One.* 2012;7(5):e37694.
20. Batista Júnior J, Berzaghi R, Arnaud ADM do M, Fontes CJF, de Camargo ZP, Hahn RC. Simultaneous infection of human host with genetically distinct isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010;105(1):62–5.
21. Teixeira M de M, Theodoro RC, Oliveira FFM de, Machado GC, Hahn RC, Bagagli E, et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. *Med Mycol.* 2014;52(1):19–28.
22. Turissini DA, Gomez OM, Teixeira MM, McEwen JG, Matute DR. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. *Fungal Genet Biol.* 2017;106:9–25.
23. Cabañes FJ. Lobomycosis and paracoccidioidomycosis meet again. *Rev Iberoam Micol.* 2022;39(3–4):59–60.
24. Rodrigues AM, Hagen F, Puccia R, Hahn RC, de Camargo ZP. *Paracoccidioides* and Paracoccidioidomycosis in the 21st Century. *Mycopathologia.* 2023;188(1–2):129–33.
25. Bagagli E, Matute DR, Garces HG, Tenório BG, Garces AG, Alves LG de B, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* Isolated from Nine-Banded Armadillos (*Dasypus novemcinctus*) Reveal Population Structure and Admixture in the Amazon Basin. *J Fungi.* 2021;7(1).
26. Teixeira M de M, Cattana ME, Matute DR, Muñoz JF, Arechavala A, Isbell K, et al. Genomic diversity of the human pathogen *Paracoccidioides* across the South American continent. *Fungal Genet Biol.* 2020;140:103395.

27. Muñoz JF, Farrer RA, Desjardins CA, Gallo JE, Sykes S, Sakthikumar S, et al. Genome Diversity, Recombination, and Virulence across the Major Lineages of *Paracoccidioides*. *MSphere*. 2016;1(5):10.1128.
28. Sturme MHJ, Puccia R, Goldman GH, Rodrigues F. Molecular biology of the dimorphic fungi *Paracoccidioides* spp. *Fungal Biol Rev*. 2011;25(2):89–97.
29. Zaitz C. *Compêndio de Micologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.
30. Gomes-Rezende J. Functional and genetic analysis of sexual reproduction in the thermodimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides* spp. Braga. Tese [Doutorado em Ciências da Vida e Saúde] – Universidade do Minho;2017.
31. Gonzalez A, Hernandez O. New insights into a complex fungal pathogen: the case of *Paracoccidioides* spp. *Yeast*. 2016;33(4):113–28.
32. Teixeira MM, Theodoro RC, Nino-Vega G, Bagagli E, Felipe MSS. *Paracoccidioides* species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. *PLoS Pathog*. 2014;10(10):e1004397.
33. Camacho E, Niño-Vega GA. *Paracoccidioides* Spp.: Virulence Factors and Immune-Evasion Strategies. *Mediat Inflamm*. 2017;2017:5313691.
34. Casadevall A, Fu MS, Guimaraes A, Albuquerque P. The ‘amoeboid predator-fungal animal virulence’ hypothesis. *J Fungi*. 2019;5(1):10.
35. Albuquerque P, Nicola AM, Magnabosco DAG, Derengowski L da S, Crisóstomo LS, Xavier LCG, et al. A hidden battle in the dirt: Soil amoebae interactions with *Paracoccidioides* spp. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(10):e0007742.
36. de Macedo PM, Scramignon-Costa B de S, Almeida-Paes R, Trilles L, de Oliveira LSC, Zancopé-Oliveira RM, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* habitat: far beyond armadillo burrows? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2020;115:e200208.

37. Hrycyk MF, Garcia Garces H, Bosco S de MG, de Oliveira SL, Marques SA, Bagagli E. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*, *P. lutzii* and related species: infection in armadillos, soil occurrence and mycological aspects. *Med Mycol.* 2018;56(8):950–62.
38. Arantes TD, Theodoro RC, Da Graça Macoris SA, Bagagli E. Detection of *Paracoccidioides* spp. in environmental aerosol samples. *Med Mycol.* 2012;51(1):83–92.
39. Terçarioli GR, Bagagli E, Reis GM, Theodoro RC, Bosco SDMG, Macoris SA da G, et al. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiol.* 2007;7:92.
40. Arantes TD, Theodoro RC, Teixeira M de M, Bosco S de MG, Bagagli E. Environmental Mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil Reveals New Clues into Genetic Diversity, Biogeography and Wild Host Association. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(4):e0004606.
41. Mendes JF, Poester VR, Groll A Von, Meireles MCA, Xavier MO. Molecular detection of *Paracoccidioides* in soil from an urban area of southern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2020;53:e20190172.
42. Mendes JF, Von Groll A, Poester VR, Brasil CL, Brandolt TM, Klafke GB, et al. *Paracoccidioides* spp. in Soil from the Pampa Biome in Southern Brazil. *Curr Microbiol.* 2019;76(2):258–62.
43. Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia.* 1985;23(5):323–34
44. Simões LB, Marques SA, Bagagli E. Distribution of paracoccidioidomycosis: determination of ecologic correlates through spatial analyses. *Med Mycol.* 2004;42(6):517–23.
45. Barrozo LV, Benard G, Silva MES, Bagagli E, Marques SA, Mendes RP. First description of a cluster of acute/subacute paracoccidioidomycosis cases and its association with a climatic anomaly. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(3):e643.

46. Teles AJ, Klafke GB, Cabana ÂL, Albano APN, Xavier MO, Meireles MCA. Serological Investigation into *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Dogs from Southern Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathologia*. 2015;181(3–4):323–8.
47. Canteros CE, Madariaga MJ, Lee W, Rivas MC, Davel G, Iachini R. Endemic fungal pathogens in a rural setting of Argentina: seroepidemiological study in dogs. *Rev Iberoam Micol*. 2010;27(1):14–9.
48. Fontana FF, dos Santos CTB, Esteves FM, Rocha A, Fernandes GF, do Amaral CC, et al. Seroepidemiological survey of paracoccidioidomycosis infection among urban and rural dogs from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Mycopathologia*. 2009;169(3):159–65.
49. Albano APN, Klafke GB, Brandolt TM, Da Hora VP, Nogueira CEW, Xavier MO, et al. Seroepidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in horses from Rio Grande do Sul, Brazil. *Braz J Microbiol*. 2015;46(2):513–7.
50. Ramos-e-Silva M, Lima CMO, Schechtman RC, Trope BM, Carneiro S. Systemic mycoses in immunodepressed patients (AIDS). *Clin Dermatol*. 2012;30(6):616–27.
51. Silveira LH, Paes RCS, Medeiros E V, Itano EN, Camargo ZP, Ono MA. Occurrence of Antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in dairy cattle from Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mycopathologia*. 2008;165(6):367–71
52. Belitardo DR, Calefi AS, Sbeghen MR, de Oliveira GG, Watanabe MAE, de Camargo ZP, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Mycoses*. 2013;57(4):222–7.
53. Oliveira GG de, Belitardo DR, Balarin MRS, Freire RL, Camargo ZP de, Ono MA. Serological survey of paracoccidioidomycosis in cats. *Mycopathologia*. 2013;176(3–4):299–302.
54. Ferreira JB, Navarro IT, Freire RL, Oliveira GG, Omori AM, Belitardo DR, et al. Evaluation of *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in dairy goats. *Mycopathologia*. 2013;176(1–2):95–9.

55. Oliveira GG, Silveira LH, Itano EN, Soares RM, Freire RL, Watanabe MAE, et al. Serological evidence of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in chickens from Paraná and Mato Grosso do Sul States, Brazil. *Mycopathologia*. 2010;171(3):197–202.
56. Belitardo DR, Calefi AS, Borges IK, de Oliveira GG, Sbeghen MR, Itano EN, et al. Detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in free-range domestic pigs (*Sus scrofa*). *Mycopathologia*. 2014;177(1–2):91–5.
57. Corte AC, Svoboda WK, Navarro IT, Freire RL, Malanski LS, Shiozawa MM, et al. Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Paraná State, Brazil. *Mycopathologia*. 2007;164(5):225–8.
58. da Paz GS, Adorno BM V, Richini-Pereira VB, Bosco SMG, Langoni H. Infection by *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus* spp. and *Paracoccidioides brasiliensis* in bats collected in urban areas. *Transbound Emerg Dis*. 2018;65(6):1797–805.
59. Minakawa T, Shumoto G, Kezuka C, Izawa T, Sasaki K, Yamaguchi S, et al. Seroprevalence of Antibodies Against *Paracoccidioides* spp. in Captive Dolphins from Three Aquaria in Japan. *Mycopathologia*. 2020;185(6):1013–20.
60. Richini-Pereira VB, Bosco S de MG, Griese J, Theodoro RC, Macoris SAG, da Silva RJ, et al. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. *Med Mycol*. 2008;46(1):35–40.
61. Richini-Pereira VB, Bosco SMG, Theodoro RC, Barrozo L, Pedrini SCB, Rosa PS, et al. Importance of xenarthrans in the eco-epidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *BMC Res Notes*. 2009;2:1-6.
62. de Souza Scramignon-Costa B, Almeida-Silva F, Wanke B, Weksler M, Moratelli R, do Valle ACF, et al. Molecular eco-epidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed mammals reveals *Cerdocyon thous* and *Cuniculus paca* as new hosts harboring this fungal pathogen. *PLoS One*. 2021;16(8):e0256668.

63. de Souza Suguiura IM, Macagnan R, Omori AM, Buck EL, Scarpassa JA, Pretto-Giordano LG, et al. First report of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in fish. *Med Mycol.* 2020;58(6):737–43.
64. Garcia NM, Del Negro GMB, Heins-Vaccari EM, Melo NT de, Assis CM de, Lacaz C da S. *Paracoccidioides brasiliensis*, nova amostra isolada de fezes de um pinguim (*Pygoscelis adeliae*). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1993;35(3):227–35.
65. Headley SA, Pretto-Giordano LG, Di Santis GW, Gomes LA, Macagnan R, da Nóbrega DF, et al. *Paracoccidioides brasiliensis*-associated dermatitis and lymphadenitis in a dog. *Mycopathologia.* 2016;182(3–4):425–34.
66. de Farias MR, Condas LAZ, Ribeiro MG, Bosco S de MG, Muro MD, Werner J, et al. Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly. *Mycopathologia.* 2011;172(2):147–52.
67. Trejo-Chávez A, Ramírez-Romero R, Ancer-Rodríguez J, Nevárez-Garza AM, Rodríguez-Tovar LE. Disseminated paracoccidioidomycosis in a Southern two-toed sloth (*Choloepus didactylus*). *J Comp Pathol.* 2010;144(2–3):231–4.
68. Naiff RD, L Ferreira LC, Barrett T V, Naiff MF, Arias JR. Paracoccidioidomicose enzoótica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no estado do Pará. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1986;28(1):19–27.
69. Bagagli E, Franco M, Bosco SDMG, Hebler-Barbosa F, Trinca LA, Montenegro MR. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. *Med Mycol.* 2003;41(3):217–23.
70. Canteros CE. Paracoccidioidomycosis: chronicle of a neglected disease. *Med (B Aires).* 2018;78(3):180–4.
71. Queiroz-Telles F, Fahal AH, Falci DR, Caceres DH, Chiller T, Pasqualotto AC. Neglected endemic mycoses. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(11):e367-77.

72. Restrepo A, Gómez BL, Tobón A. Paracoccidioidomycosis: Latin America's own fungal disorder. *Curr Fungal Infect Rep*. 2012;6(4):303–11.
73. Ashraf N, Kubat RC, Poplin V, Adenis AA, Denning DW, Wright L, et al. Re-drawing the Maps for Endemic Mycoses. *Mycopathologia*. 2020;185(5):843–65.
74. Wagner G, Moertl D, Glechner A, Mayr V, Klerings I, Zachariah C, et al. Paracoccidioidomycosis Diagnosed in Europe-A Systematic Literature Review. *J Fungi*. 2021;7(2):157.
75. Murray HW, Littman ML, Roberts RB. Disseminated paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis) in the United States. *Am J Med*. 1974;56(2):209–20.
76. Cho S-H, Yu Y-B, Park J-S, Yook K-D, Kim Y-K. Epidemiological characterization of imported systemic mycoses occurred in Korea. *Osong Public Heal Res Perspect*. 2018;9(5):255–60.
77. Martinez R. New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. *J Fungi*. 2017;3(1):1.
78. Barrozo L V, Mendes RP, Marques SA, Benard G, Silva MES, Bagagli E. Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil. *Int J Epidemiol*. 2009;38(6):1642–9.
79. Bellissimo-Rodrigues F, Machado AA, Martinez R. Paracoccidioidomycosis epidemiological features of a 1,000-cases series from a hyperendemic area on the southeast of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;85(3):546–50.
80. Vieira G de D, Alves T da C, Lima SMD de, Camargo LMA, Sousa CM de. Paracoccidioidomycosis in a western Brazilian Amazon State: Clinical-epidemiologic profile and spatial distribution of the disease. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014;47(1):63–8.
81. Krakhecke-Teixeira AG, Yamauchi DH, Rossi A, de Sousa HR, Garces HG, Júnior JL, et al. Clinical and Eco-Epidemiological Aspects of a Novel Hyperendemic Area of

Paracoccidioidomycosis in the Tocantins-Araguaia Basin (Northern Brazil), Caused by *Paracoccidioides* sp. *J Fungi*. 2022;8(5):502.

82. Mota MA de L, Damasceno LS, Bandeira SP, Leitão T do MJS. An autochthonous case of paracoccidioidomycosis in a new area of Ceara State, Northeastern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2019;61:e58.

83. Façanha MC, Souza AQ, Café VS, Wanke B. Paracoccidioidomycosis - Description of two cases autochthonous in Ceará. *Brazilian J Infect Dis*. 2010;14(1):86–8.

84. Matos WB de, Dos Santos GMC, Silva VEB da, Rosário Gonçalves EG do, Silva AR da. Paracoccidioidomycosis in the state of Maranhão, Brazil: geographical and clinical aspects. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;45(3):385–9.

85. de Sugiura IMS, Ono MA. Compulsory notification of paracoccidioidomycosis: A 14-year retrospective study of the disease in the state of Paraná, Brazil. *Mycoses*. 2022;65(3):354–61.

86. Koehler A, Scroferneker ML. Clinical-epidemiological characteristics of paracoccidioidomycosis and presence of *Paracoccidioides* spp. in the natural environment in Rio Grande do Sul, southern Brazil: an 81-year literature survey. *Rev Res Med Microbiol*. 2024:10.1097

87. Giusiano G, Aguirre C, Vratnica C, Rojas F, Corallo T, Cattana ME, et al. Emergence of acute/subacute infant-juvenile paracoccidioidomycosis in Northeast Argentina: Effect of climatic and anthropogenic changes? *Med Mycol*. 2019;57(1):30–7.

88. do Valle ACF, Marques de Macedo P, Almeida-Paes R, Romão AR, Lazéra MDS, Wanke B. Paracoccidioidomycosis after Highway Construction, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(11):1917–9.

89. Shankar J, Restrepo A, Clemons K V, Stevens DA. Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24(2):296–313.

90. Nogueira MG dos S, Andrade GMQ. Paracoccidioidomicose em crianças e adolescentes. *Rev méd Minas Gerais*. 2015;25(2):249-57.
91. Zeminian de Oliveira LB, Della Coletta AM, Gardizani TP, Barrozo LV, Miot HA, De Faveri J, et al. Paracoccidioimycosis and white individuals: Susceptibility and biogeographic aspects in an important endemic area in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021;15(2):e0009086.
92. Martinez R, Moya MJ. The relationship between paracoccidioidomycosis and alcoholism. *Rev Saude Publica*. 1992;26(1):12-6.
93. dos Santos WA, da Silva BM, Passos ED, Zandonade E, Falqueto A. Association between smoking and paracoccidioidomycosis: a case-control study in the State of Espírito Santo, Brazil. *Cad Saude Publica*. 2003;19(1):245-53.
94. Schimke LF, Hibbard J, Martinez-Barricarte R, Khan TA, Cavalcante R de S, Oliveira Junior EB de, et al. Paracoccidioidomycosis associated with a heterozygous STAT4 mutation and impaired IFN-gama immunity. *J Infect Dis*. 2017;216(12):1623-34.
95. Carvalho FMC, Busser FD, Freitas VLT, Furucho CR, Sadahiro A, Kono ASG, et al. Polymorphisms on IFNG, IL12B and IL12RB1 genes and paracoccidioidomycosis in the Brazilian population. *Infect Genet Evol*. 2016;43:245-51.
96. Koehler A, Girardi FM, Kraether Neto L, de Moraes PC, Fontanive Junior V, Scroferneker ML. Head and neck manifestations of paracoccidioidomycosis: A retrospective study of histopathologically diagnosed cases in two medical centers in southern Brazil. *J Med Mycol*. 2022;32(3):101292.
97. Coutinho ZF, Wanke B, Travassos C, Oliveira RM, Xavier DR, Coimbra Jr CEA. Hospital morbidity due to paracoccidioidomycosis in Brazil (1998-2006). *Trop Med Int Heal*. 2015;20(5):673-80.
98. Coutinho ZF, Silva D da, Lazera M, Petri V, Oliveira RM de, Sabroza PC, et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saude Publica*. 2002;18(5):1441-54.

99. Prado M, Silva MB da, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(3):513–21.
100. Damaceno LS, Pessoa GMF, Timbó SS, Lima NBG de, Barbosa Neto J de P, Coelho RC, et al. Trends and patterns of mortality arising from fungal infections in Brazil in a period of 11 years. *J Heal Biol Sci*. 2021;9(1):1–9.
101. Bittencourt JIM, de Oliveira RM, Coutinho ZF. Paracoccidioidomycosis mortality in the State of Paraná, Brazil, 1980/1998. *Cad Saude Publica*. 2005;21(6):1856–64.
102. Santo AH. Tendência da mortalidade relacionada à paracoccidioidomicose, Estado de São Paulo, Brasil, 1985 a 2005: estudo usando causas múltiplas de morte. *Rev Panam Salud Públ*. 2008;23(5):313-24.
103. Fortes MRP, Miot HA, Kurokawa CS, Marques MEA, Marques SA. Immunology of paracoccidioidomycosis. *An Bras Dermatol*. 2011;86(3):516–24.
104. Pacheco FB, Venier NAB, Bueno AL, Almeida AL de, Milman L, Koehler A, et al. Isolated cutaneous lesions in paracoccidioidomycosis: a suggestive case of acquisition through cutaneous inoculation. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2021;63:e22.
105. Benard G. Pathogenesis and Classification of Paracoccidioidomycosis: New Insights From Old Good Stuff. *Open Forum Infect Dis*. 2021;8(3):ofaa624.
106. Franco M, Montenegro R, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Gherusa N, et al. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1987;20:129-32.
107. Santos AR Dos, Dionizio A, Fernandes M da S, Buzalaf MAR, Pereira B, Donanzam D de FA, et al. Proteomic analysis of serum samples of paracoccidioidomycosis patients with severe pulmonary sequel. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021;15(8):e0009714.

108. Pissurno NSCA, Esteves L da M, Benedito JM, Giglio VP, de Carvalho LR, Mendes RP, et al. Impact of laryngeal sequelae on voice- and swallowing-related outcomes in paracoccidioidomycosis. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2020;26:e20200008.
109. da Costa AD, Vargas AP, Lucena MM, Ruas ACN, Braga F da SS, Bom-Braga MP, et al. Voice disorders in residual paracoccidioidomycosis in upper airways and digestive tract. *Rev Iberoam Micol*. 2017;34(3):180–4.
110. Ribeiro EB, Pochat VD de, Magaldi EN de, Figueiredo BS, Alonso N, Meneses JV de L. Complex nasal reconstruction after paracoccidioidomycosis infection—Case report. *An Bras Dermatol*. 2015;90(3 Suppl 1):203–5.
111. Peçanha PM, Batista Ferreira ME, Massaroni Peçanha MA, Schmidt EB, Lamas de Araújo M, Zanotti RL, et al. Paracoccidioidomycosis: Epidemiological and Clinical Aspects in 546 Cases Studied in the State of Espírito Santo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2017;97(3):836–44.
112. Alvarado P, Teixeira M de M, Cavallera E, Paes HC, Guerra G, Santander G, et al. Epidemiology of paracoccidioidomycosis in Venezuela: a retrospective study from 1954 to 2019. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2021;116:e210203.
113. Giusiano G, Tracogna F, Santiso G, Rojas F, Messina F, Sosa V, et al. Clinical and Demographic Features of Paracoccidioidomycosis in Argentina: A Multicenter Study Analysis of 466 Cases. *J Fungi*. 2023;9(4):482.
114. Barreto MM, Marchiori E, De Brito A, Escuissato DL, Hochhegger B, Souza AS, et al. CT morphological features of the reversed halo sign in pulmonary paracoccidioidomycosis. *Br J Radiol*. 2015;88(1055):20150246.
115. de Macedo PM, Almeida-Paes R, Freitas DFS, Varon AG, Paixão AG, Romão AR, et al. Acute juvenile Paracoccidioidomycosis: A 9-year cohort study in the endemic area of Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(3):e0005500.
116. Wagner G, Moertl D, Eckhardt A, Sagel U, Wrba F, Dam K, et al. Chronic

Paracoccidioidomycosis with adrenal involvement mimicking tuberculosis - A case report from Austria. *Med Mycol Case Rep.* 2016;14:12–6.

117. Marinho Falcão EM, da Costa Medeiros M, Freitas ADÁ, de Almeida Soares JC, Fernandes Pimentel MI, Quintella LP, et al. Acute paracoccidioidomycosis worsened by immunosuppressive therapy due to a misdiagnosis of Crohn's disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2023;17(1):e0011023.

118. Veasey JV, Pessotti NS, Lellis RF. Paracoccidioidomycosis in a child: exuberant presentation due to the inadvertent use of systemic corticosteroids. *An Bras Dermatol.* 2019;94(4):470–2.

119. Santos JWA Dos, Silveira ML da, Santos FP, Mathias AC, Bertolazi AN, Melo CRA, et al. Simultaneous chronic pulmonary paracoccidioidomycosis and disseminated cryptococcosis in a non-HIV patient. *Mycopathologia.* 2005;159(3):373–6.

120. de Faria Ferreira M, Brito-Santos F, Henrique Nascimento Theodoro P, de Abreu Almeida M, Lazera MDS, Trilles L. Mixed infection by *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* and coinfection with paracoccidioidomycosis in PLHIV. *Med Mycol Case Rep.* 2022;35:48–50.

121. Torres Esteche V, Arteta Z, Torres G, Vaucher A, Gezuele E, Balleste R. Concomitant pulmonary paracoccidioidomycosis and pulmonary histoplasmosis: a rare case. *J Bras Pneumol.* 2012;38(2):264–8.

122. Merino-Alado R, Pineda J, Rasquin JH, Landaeta ME, Mata-Essayag S. Granulomatous mastitis due to coinfection with *Histoplasma* sp. and *Paracoccidioides* sp.: A case report. *Med Mycol Case Rep.* 2020;27:52–4.

123. Heleine M, Blaizot R, Cissé H, Labaudinière A, Guerin M, Demar M, et al. A case of disseminated paracoccidioidomycosis associated with cutaneous lobomycosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2019;34(1):e18–20.

124. de Jesus Oliveira Gonçalves CA, Carneiro Jr JT, de Souza Cruz EL, de Sousa Neves

Filho F, Rivadeneira Cárdenas RC, Guimarães DM. Parasitological association between human leishmaniosis mucosa and paracoccidioidomycosis. Case report. *Int J Surg Case Rep.* 2020;76:170–3.

125. Peçanha PM, Bahiense IC, Kruschewsky WLL, Biasutti C, Júnior CUGF, Pinheiro BG, et al. Paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides brasiliensis* S1 associated with acquired immunodeficiency syndrome: A case report. *Rev Iberoam Micol.* 2020;38(1):5–8.

126. Falcão EM, de Macedo PM, Freitas DFS, Freitas AD, Grinsztejn B, Veloso VG, et al. Paracoccidioidomycosis in people living with HIV/AIDS: A historical retrospective cohort study in a national reference center for infectious diseases, Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2022;16(6):e0010529.

127. de Macedo PM, Benko LMP, Falcão EMM, Nosanchuk JD, Almeida-Paes R, do Valle ACF. COVID-19 in patients with paracoccidioidomycosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2023;17(5):e0011322.

128. Reyes MA, Weidmann J, Guardati M V, Díaz MG, Carbó Amoroso E, Henares J, et al. Paracoccidioidomycosis perianal asociada a lepra lepromatosa: Presentación de un caso clínico. *Rev argent dermatol.* 2008;89(2):107–11.

129. Rodrigues ML, Nosanchuk JD. Fungal diseases as neglected pathogens: A wake-up call to public health officials. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020;14(2):e0007964.

130. Zancope-Oliveira RM, Pizzini C V, de Medeiros Muniz M, do Valle ACF, Almeida-Paes R. Diagnostic Aspects of Paracoccidioidomycosis. *Curr Trop Med Reports.* 2014;1(2):111–8

131. Sivieri De Araújo M, Sousa SCOM, Correia D. Avaliação do exame citopatológico como método para diagnosticar a paracoccidioidomycose crônica oral. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;36:427-30.

132. Iwama De Mattos MCF, Mendes RP, Marcondes-Machado J, Meira DA, Morceli J, Pereira PCM, et al. Sputum cytology in the diagnosis of pulmonary paracoccidioidomycosis.

Mycopathologia. 1991;114:187-91.

133. Jensen HE. Histopathology in the Diagnosis of Invasive Fungal Diseases. *Curr Fungal Infect Rep.* 2021;15(1):23–31.

134. de Camargo ZP. Serology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 2008;165(4–5):289–302.

135. Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho F de Q, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. Consenso em paracoccidioidomicose. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006;39(3):297–310.

136. Mineo JR. Manual ilustrado de práticas laboratoriais em Imunologia. Uberlândia: EDUFU; 2016. 114 p.

137. da Silva J de F, de Oliveira HC, Marcos CM, Assato PA, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJS. Advances and challenges in paracoccidioidomycosis serology caused by *Paracoccidioides* species complex: an update. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015;84(1):87–94.

138. Vidal MSM, Del Negro GMB, Vicentini AP, Svidzinski TIE, Mendes-Giannini MJ, Almeida AMF, et al. Serological diagnosis of paracoccidioidomycosis: high rate of inter-laboratorial variability among medical mycology reference centers. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(9):e3174.

139. Cocio TA, Martinez R. Serological diagnosis of paracoccidioidomycosis using a *Paracoccidioides* spp. comercial antigen and the counterimmunoelectrophoresis method. *Braz J Infect Dis.* 2021;25(5):101607.

140. Moses A. Fixação do complemento na blastomicose. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1916;8:68–70.

141. Higueta-Gutiérrez LF, Quintero-Quinchía C, Madera-Miranda IC, Cardona-Arias JA. Meta-analysis of immunological tests for the diagnosis of *Paracoccidioides* infection, 1972-2017. *Infectio.* 2019;23(2):167–74.

142. Puccia R, Schenkman S, Gorin PAJ, Travassos LR. Exocellular Components of *Paracoccidioides brasiliensis*: Identification of a Specific Antigen. *Infect Immun*. 1986;53(1):199-206.
143. Cisalpino PS, Puccia R, Yamauchi LM, Cano MIN, Franco Da Silveira J, Travassos LR. Cloning, Characterization, and Epitope Expression of the Major Diagnostic Antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Biol Chem*. 1996;271(8):4553-60.
144. Franco M, Bagagli E, Cunha M, Chamma LG, Fecchio D. *Paracoccidioides brasiliensis* antigen batches from the same isolate show immunological and biochemical differences. *Mycopathologia*. 1996;135(1):13-9.
145. Carvalho KC, Vallejo MC, Camargo ZP, Puccia R. Use of recombinant gp43 isoforms expressed in *Pichia pastoris* for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2008;15(4):622-9.
146. Fernandes VC, Coitinho JB, Veloso JMR, Araújo SA, Pedroso EP, Goes AM. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant rPb27 and rPb40 antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Immunol Methods*. 2011;367(1-2):78-84.
147. Mattos K, Cocio TA, Chaves EGA, Borges CL, Venturini J, de Carvalho LR, et al. An update on the occurrence of *Paracoccidioides* species in the Midwest region, Brazil: Molecular epidemiology, clinical aspects and serological profile of patients from Mato Grosso do Sul State. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021;15(4):e0009317.
148. De Macedo PM, De Melo Teixeira M, Barker BM, Zancopé-Oliveira RM, Almeida-Paes R, Do Valle ACF. Clinical features and genetic background of the sympatric species *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides americana*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(4):e0007309.
149. Batista Jr J, de Camargo ZP, Fernandes GF, Vicentini AP, Fontes CJF, Hahn RC. Is the geographical origin of a *Paracoccidioides brasiliensis* isolate important for antigen production for regional diagnosis of paracoccidioidomycosis? *Mycoses*. 2009;53(2):176-80.

150. Machado GC, Moris DV, Arantes TD, Silva LRF, Theodoro RC, Mendes RP, et al. Cryptic species of *Paracoccidioides brasiliensis*: impact on paracoccidioidomycosis immunodiagnosis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108(5):637–43.
151. Rodrigues AM, Kubitschek-Barreira PH, Pinheiro BG, Teixeira-Ferreira A, Hahn RC, de Camargo ZP. Immunoproteomic Analysis Reveals Novel Candidate Antigens for the Diagnosis of Paracoccidioidomycosis Due to *Paracoccidioides lutzii*. J Fungi. 2020;6(4):357.
152. Gegembauer G, Araujo LM, Pereira EF, Rodrigues AM, Paniago AMM, Hahn RC, et al. Serology of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(7):e2986.
153. Moreto TC, Marques MEA, de Oliveira MLSC, Moris D V, de Carvalho LR, Mendes RP. Accuracy of routine diagnostic tests used in paracoccidioidomycosis patients at a university hospital. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2011;105(8):473–8.
154. Koishi AC, Vituri DF, Dionízio Filho PSR, Sasaki AA, Felipe MSS, Venancio EJ. A semi-nested PCR assay for molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples. Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43(6):728–30.
155. Rocha-Silva F, Gomes LI, Gracielle-Melo C, Goes AM, Caligorne RB. Real Time Polymerase Chain Reaction (rt-PCR): A New Patent to Diagnostic Purposes for Paracoccidioidomycosis. Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov. 2017;10(2):143–9.
156. Gaviria M, Rivera V, Muñoz-Cadavid C, Cano LE, Naranjo TW. Validation and clinical application of a nested PCR for paracoccidioidomycosis diagnosis in clinical samples from Colombian patients. Braz J Infect Dis. 2015;19(4):376–83.
157. Rocha-Silva F, Maria de Figueiredo S, Rutren La Santrer EF, Machado AS, Fernandes B, Assunção CB, et al. Paracoccidioidomycosis: Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* genome in biological samples by quantitative chain reaction polymerase (qPCR). Microb Pathog. 2018;121:359–62.

158. Pinheiro BG, Pôssa AP, Della Terra PP, de Carvalho JA, Ricci G, Nishikaku AS, et al. A New Duplex PCR-Assay for the Detection and Identification of *Paracoccidioides* Species. *J Fungi*. 2021;7(3):169.
159. Pinheiro BG, Pôssa AP, Ricci G, Nishikaku AS, Hagen F, Hahn RC, et al. Development of a Multiplex qPCR Assay for Fast Detection and Differentiation of Paracoccidioidomycosis Agents. *J Fungi*. 2023;9(3):358.
160. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJA, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol*. 2009;52(2):273–83.
161. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol*. 2015;6:144398.
162. Lacroix C, Gicquel A, Sendid B, Meyer J, Accoceberry I, François N, et al. Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of *Candida* species. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(2):153–8.
163. De Carolis E, Posteraro B, Lass-Flörl C, Vella A, Florio AR, Torelli R, et al. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(5):475–84.
164. De Almeida JN, Del Negro GMB, Grenfell RC, Vidal MSM, Thomaz DY, De Figueiredo DSY, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for differentiation of the dimorphic fungal species *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. *J Clin Microbiol*. 2015;53(4):1383–6.
165. do Carmo Silva L, de Oliveira AA, de Souza DR, Barbosa KLB, Freitas E Silva KS, Carvalho Júnior MAB, et al. Overview of Antifungal Drugs against Paracoccidioidomycosis: How Do We Start, Where Are We, and Where Are We Going? *J Fungi*. 2020;6(4):300.

166. Shikanai-Yasuda MA. Paracoccidioidomycosis treatment. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015;57(Suppl 19):31–7.
167. Menezes VM, Soares BG, Fontes CJ. Drugs for treating paracoccidioidomycosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;(2):CD004967.
168. Shikanai-Yasuda MA, Benard G, Higaki Y, Del Negro GMB, Hoo S, Vaccari EH, et al. Randomized trial with itraconazole, ketoconazole and sulfadiazine in paracoccidioidomycosis. *Med Mycol*. 2002;40(4):411–7.
169. Queiroz-Telles F, Goldani LZ, Schlamm HT, Goodrich JM, Espinel-Ingroff A, Shikanai-Yasuda MA. An open-label comparative pilot study of oral voriconazole and itraconazole for long-term treatment of paracoccidioidomycosis. *Clin Infect Dis*. 2007;45(11):1462–9.
170. Andrade UV, Oliveira SM do VL de, Chang MR, Pereira EF, Marques AP da C, Carvalho LR de, et al. Treatment compliance of patients with paracoccidioidomycosis in Central-West Brazil. *J Bras Pneumol*. 2019;45(2):e20180167.
171. da Silva Costa C, Caixeta Albuquerque F, Vieira Andrade R, Camilo de Oliveira G, Fernandes de Almeida M, de Macedo Brigido M, et al. Transporters in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome: insights on drug resistance. *Gen Mol Res*. 2005;4(2):390-408.
172. Hahn RC, Fontes CJF, Batista RD, Hamdan JS. In vitro comparison of activities of terbinafine and itraconazole against *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol*. 2002;40(8):2828–31.
173. Cermeño JR, Alvarado P, Mendoza M, de Cuesta IH. In vitro susceptibility of isolates of *Paracoccidioides* spp. complex to systemic antifungals using the microdilution method. *Investig Clin*. 2015;56(3):243–64.
174. Hahn RC, Hamdan JS. In vitro susceptibilities of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form to antifungal drugs. *Mycoses*. 2000;43(11–12):403–7.

175. Takahagi-Nakaira E, Sugizaki MF, Peraçoli MTS. Microdilution procedure for antifungal susceptibility testing of *Paracoccidioides brasiliensis* to amphotericin b and itraconazole. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2009;15(4):718–31.
176. Hahn RC, Morato Conceição YT, Santos NL, Ferreira JF, Hamdan JS. Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and in vitro resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. *Mycoses*. 2003;46(8):342–7.
177. Lima E de O, Navarro LC, Morishita KN, Kamikawa CM, Rodrigues RGM, Dabaja MZ, et al. Metabolomics and Machine Learning Approaches Combined in Pursuit for More Accurate Paracoccidioidomycosis Diagnoses. *mSystems*. 2020;5(3):101128.
178. Rossi SA, de Araújo M V, Taira CL, Travassos LR, Taborda CP. Vaccine Development to Systemic Mycoses by Thermally Dimorphic Fungi. *Curr Trop Med Reports*. 2019;6(2):64–75.
179. Taborda CP, Urán ME, Nosanchuk JD, Travassos LR. Paracoccidioidomycosis: challenges in the development of a vaccine against an endemic mycosis in the Americas. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015;57(Suppl 19):21–4.
180. de Oliveira LF. Espectroscopia molecular. *Química Nov na Esc*. 2001;(4):24–30.
181. Martí BL, González B. The eletromagnetic spectrum. CESAR’s Booklet - Cooperation through Education in Science and Astronomy Research [internet]. [acesso em 10 jan 2024]. Disponível em: https://cesar.esa.int/upload/201807/electromagnetic_spectrum_booklet.pdf
182. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR. Introdução à espectroscopia. 2nd ed. São Paulo: Cengage Learning; 2015.
183. Forato LA, Filho RB, Osiro D, Bicudo T de C, Colnago LA. A Espectroscopia na região do infravermelho e algumas aplicações [internet]. São Paulo: Embrapa Instrumentação Agropecuária; 2010 [acesso em 10 jan 2024]. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/884592/1/DOC512010.pdf>

184. Thermo Nicolet. Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry [internet]. 2001 [acesso em 10 jan 2024]. Disponível em: <https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Fundamentals/FTIR%20principles.pdf>
185. Baker MJ, Trevisan J, Bassan P, Bhargava R, Butler HJ, Dorling KM, et al. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nat Protoc.* 2014;9(8):1771–91.
186. Souza RM. ATR: Avanço da Espectroscopia de Infravermelho na análise de materiais plásticos. *Bol Tecnol e Desenvolv Embalagens.* 2009;21(3):3.
187. Baker MJ, Hussain SR, Lovergne L, Untereiner V, Hughes C, Lukaszewski RA, et al. Developing and understanding biofluid vibrational spectroscopy: a critical review. *Chem Soc Rev.* 2016;45(7):1803–18.
188. Ferreira MMC. *Quimiometria - Conceitos, Métodos e Aplicações.* Campinas: Editora da Unicamp; 2015.
189. Morais CLM, Lima KMG, Singh M, Martin FL. Tutorial: multivariate classification for vibrational spectroscopy in biological samples. *Nat Protoc.* 2020;15(7):2143–62.
190. Trevisan J, Angelov PP, Carmichael PL, Scott AD, Martin FL. Extracting biological information with computational analysis of Fourier-transform infrared (FTIR) biospectroscopy datasets: Current practices to future perspectives. *Analyst.* 2012;137(14):3202–15.
191. Wold S, Antti H, Lindgren F, Ohman J, Sweden S. Orthogonal signal correction of near-infrared spectra. *Chem Intell Lab Syst.* 1998;44(1-2):175-85.
192. Ferreira MMC. *Quimiometria III - Revisitando a análise exploratória dos dados multivariados.* *Quim Nova.* 2022;45(10):1251–64.
193. Infometrix Inc. *Pirouette Multivariate Data Analysis Software* [internet]; 2011 [acesso em 10 jan 2024]. Disponível em: <https://infometrix.com/wp->

content/uploads/2016/07/pirouette.pdf

194. Abraham EJ, Kellogg JJ. Chemometric-Guided Approaches for Profiling and Authenticating Botanical Materials. *Front Nutri.* 2021;8:780228.
195. Peris-Díaz MD, Krężel A. A guide to good practice in chemometric methods for vibrational spectroscopy, electrochemistry, and hyphenated mass spectrometry. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2021;135:116157.
196. Guerrero Sanchez M, Passot S, Campoy S, Olivares M, Fonseca F. Effect of protective agents on the storage stability of freeze-dried *Ligilactobacillus salivarius* CECT5713. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2022;106(21):7235–49.
197. Boffo EF, Tavares LA, Ferreira MMC, Ferreira AG. Classification of Brazilian vinegars according to their ¹H NMR spectra by pattern recognition analysis. *LWT – Food Sci Technol Int.* 2009;42(9):1455–60.
198. Lasalvia M, Capozzi V, Perna G. A Comparison of PCA-LDA and PLS-DA Techniques for Classification of Vibrational Spectra. *Appl Sci.* 2022;12(11):5345.
199. Marcelo de Souza A, Cristina Breitreitz M, Roberto Filgueiras P, José Rodrigues Rohwedder Ronei Jesus Poppi J. Experimento didático de quimiometria para calibração multivariada na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho próximo: um tutorial, parte II. *Quim Nova.* 2013;36:1057-65.
200. American Society for Testing and Materials (ASTM). Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis, ASTM International E1655-17. West Conshohocken: ASTM; 2017.
201. Westad F, Marini F. Validation of chemometric models - A tutorial. *Anal Chim Acta.* 2015;893:14-24.
202. Koehler A, de Moraes PC, Heidrich D, Scroferneker ML, Ferrão MF, Corbellini VA. Prediction of melanin content of *Fonsecaea pedrosoi* using Fourier transform infrared

spectroscopy (FTIR) and chemometrics. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2024;310:123945.

203. Williams P, Dardenne P, Flinn P. Tutorial: Items to be included in a report on a near infrared spectroscopy project. *J Near Infrared Spectrosc.* 2017;25(2):85–90.

204. de Santana FB, de Souza AM, Almeida MR, Breikreitz MC, Filgueiras PR, Sena MM, et al. Experimento didático de quimiometria para classificação de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio combinado com análise discriminante por mínimos quadrados parciais: um tutorial, parte V. *Quim Nova.* 2020;43(3):371–81.

205. Oliveri P, Downey G. Discriminant and class-modelling chemometric techniques for food PDO verification. *Compr Anal Chem.* 2013;60:317-38.

206. Sabin JG, Ferrão MF, Furtado JC. Análise multivariada aplicada na identificação de fármacos antidepressivos. Parte II: Análise por componentes principais (PCA) e o método de classificação SIMCA. *Rev Bras Ciências Farm.* 2004;40(3):387–96.

207. Morris AD, Morais CLM, Lima KMG, Freitas DLD, Brady ME, Dhaygude AP, et al. Distinguishing active from quiescent disease in ANCA-associated vasculitis using attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy. *Sci Rep.* 2021;11(1):9981.

208. Cozzolino D. The Sample, the Spectra and the Maths-The Critical Pillars in the Development of Robust and Sound Applications of Vibrational Spectroscopy. *Molecules.* 2020;25(16):3674.

209. Maiti KS. Non-Invasive Disease Specific Biomarker Detection Using Infrared Spectroscopy: A Review. *Molecules.* 2023;28(5):2320.

210. Mitchell AL, Gajjar KB, Theophilou G, Martin FL, Martin-Hirsch PL. Vibrational spectroscopy of biofluids for disease screening or diagnosis: translation from the laboratory to a clinical setting. *J Biophotonics.* 2014;7(3–4):153–65.

211. Anderson DJ, Anderson RG, Moug SJ, Baker MJ. Liquid biopsy for cancer diagnosis

using vibrational spectroscopy: systematic review. *BJS Open*. 2020;4(4):554–62.

212. Motta O, De Caro F, Quarto F, Proto A. New FTIR methodology for the evaluation of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio in *Helicobacter pylori* infection diagnosis. *J Infect*. 2009;59(2):90–4.

213. Marques V, Cunha B, Couto A, Sampaio P, Fonseca LP, Aleixo S, et al. Characterization of gastric cells infection by diverse *Helicobacter pylori* strains through Fourier-transform infrared spectroscopy. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2019;210:193–202.

214. Gonciarz W, Lechowicz Ł, Urbaniak M, Kaca W, Chmiela M. Attenuated total reflectance fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and artificial neural networks applied to investigate quantitative changes of selected soluble biomarkers, correlated with *H. pylori* infection in children and presumable consequent delayed growth. *J Clin Med*. 2020;9(12):1–14.

215. Gonciarz W, Lechowicz Ł, Urbaniak M, Kaca W, Chmiela M. Use of fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) for monitoring experimental *Helicobacter pylori* infection and related inflammatory response in Guinea pig model. *Int J Mol Sci*. 2021;22(1):1–17.

216. Mordehai J, Ramesh J, Huleihel M, Cohen Z, Kleiner O, Talyshinsky M, et al. Studies on Acute Human Infections Using FTIR Microspectroscopy and Cluster Analysis. *Biopolymers*. 2004;73(4):494-502.

217. Lee-Montiel FT, Reynolds KA, Riley MR. Detection and quantification of poliovirus infection using FTIR spectroscopy and cell culture. *J Biol Eng*. 2011;5:1-13.

218. Sakudo A, Suganuma Y, Sakima R, Ikuta K. Diagnosis of HIV-1 infection by near-infrared spectroscopy: Analysis using molecular clones of various HIV-1 subtypes. *Clin Chim Acta*. 2012;413(3–4):467–72.

219. Silva LG, Péres AFS, Freitas DLD, Morais CLM, Martin FL, Crispim JCO, et al. ATR-FTIR spectroscopy in blood plasma combined with multivariate analysis to detect HIV infection in pregnant women. *Sci Rep*. 2020;10(1):20156.

220. Albert J-D, Monbet V, Jolivet-Gougeon A, Fatih N, Le Corvec M, Seck M, et al. A novel method for a fast diagnosis of septic arthritis using mid infrared and deported spectroscopy. *Jt Bone Spine*. 2016;83(3):318–23.
221. Rymysza T, Ribeiro EA, de Carvalho LFDCES, Bhattacharjee T, de Azevedo Canevari R. Human papillomavirus detection using PCR and ATR-FTIR for cervical cancer screening. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2018;196:238–46.
222. Alves Melo IM, Pereira Viana MR, Pupin B, Bhattacharjee TT, de Azevedo Canevari R. PCR-RFLP and FTIR-based detection of high-risk human papilloma virus for cervical cancer screening and prevention. *Biochem Biophys Reports*. 2021;26:100993.
223. Kapelushnik J, Beck Rosen G, Agbariaa AH, Salman A, Mahmoud H, Mordrchai S. Differential diagnosis of infectious etiology in febrile Pediatric Hematology/oncology patients using infrared spectroscopy of peripheral blood. *Pediatr Blood Cancer*. 2018;65:S513–4.
224. Naseer K, Ali S, Mubarik S, Hussain I, Mirza B, Qazi J. FTIR spectroscopy of freeze-dried human sera as a novel approach for dengue diagnosis. *Infrared Phys Technol*. 2019;102:102998.
225. Naseer K, Ali S, Mubarik S, Zajif Hussain S, Qazi J. Use of ATR-FTIR for detection of *Salmonella typhi* infection in human blood sera. *Infrared Phys Technol*. 2020;110:103473.
226. Banerjee A, Gokhale A, Bankar R, Palanivel V, Salkar A, Robinson H, et al. Rapid Classification of COVID-19 Severity by ATR-FTIR Spectroscopy of Plasma Samples. *Anal Chem*. 2021;93(30):10391–6.
227. Kitane DL, Loukman S, Marchoudi N, Fernandez-Galiana A, El Ansari FZ, Jouali F, et al. A simple and fast spectroscopy-based technique for Covid-19 diagnosis. *Sci Rep*. 2021;11(1):16740.
228. Nogueira MS, Leal LB, Macarini W, Pimentel RL, Muller M, Vassallo PF, et al. Rapid diagnosis of COVID-19 using FT-IR ATR spectroscopy and machine learning. *Sci Rep*.

2021;11(1):15409.

229. Barauna VG, Singh MN, Barbosa LL, Marcarini WD, Vassallo PF, Mill JG, et al. Ultrarapid On-Site Detection of SARS-CoV-2 Infection Using Simple ATR-FTIR Spectroscopy and an Analysis Algorithm: High Sensitivity and Specificity. *Anal Chem.* 2021;93(5):2950–8.

230. Kazmer ST, Hartel G, Robinson H, Richards RS, Yan K, van Hal SJ, et al. Pathophysiological Response to SARS-CoV-2 Infection Detected by Infrared Spectroscopy Enables Rapid and Robust Saliva Screening for COVID-19. *Biomedicines.* 2022;10(2):351.

231. Glöckler J, Mizaikoff B, Díaz de León-Martínez L. SARS CoV-2 infection screening via the exhaled breath fingerprint obtained by FTIR spectroscopic gas-phase analysis. A proof of concept. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2023;302:123066.

232. Oliveira SW, Cardoso-Sousa L, Georjutti RP, Shimizu JF, Silva S, Caixeta DC, et al. Salivary Detection of Zika Virus Infection Using ATR-FTIR Spectroscopy Coupled with Machine Learning Algorithms and Univariate Analysis: A Proof-of-Concept Animal Study. *Diagnostics.* 2023;13(8):1443.

233. Roy S, Perez-Guaita D, Andrew DW, Richards JS, McNaughton D, Heraud P, et al. Simultaneous ATR-FTIR Based Determination of Malaria Parasitemia, Glucose and Urea in Whole Blood Dried onto a Glass Slide. *Anal Chem.* 2017;89(10):5238–45.

234. Veettil TCP, Kochan K, Edler KJ, De Bank P, Heraud P, Wood BR. Disposable Coverslip for Rapid Throughput Screening of Malaria Using Attenuated Total Reflection Spectroscopy. *Appl Spectrosc.* 2022;76(4):451–61.

235. Larios G, Ribeiro M, Arruda C, Oliveira SL, Canassa T, Baker MJ, et al. A new strategy for canine visceral leishmaniasis diagnosis based on FTIR spectroscopy and machine learning. *J Biophotonics.* 2021;14(11):e202100141.

236. Santos IB, Ferreira AUC, Rabelo MD, Anholeto LA, Sousa GA, Gaínza YA, et al. Portable near-infrared spectroscopy: A rapid and accurate blood test for diagnosis of

Haemonchus contortus infection and for targeted selective treatment of sheep. Int J Parasitol. 2023;53(2):119–27.

237. Dawuti W, Dou J, Zheng X, Lü X, Zhao H, Yang L, et al. Rapid and accurate screening of cystic echinococcosis in sheep based on serum Fourier-transform infrared spectroscopy combined with machine learning algorithms. J Biophotonics. 2023;16(5):e202200320.

238. Mohammed YF, Salem EZ, I Shahin IM, Abdo HM, Emam HE, Fawzy M, et al. Clinical trial Applicability of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy in rapid identification of some *Candida* and dermatophyte species infections in humans. Int J Dermatol. 2016;55(10):1164-71.

239. Heidrich D, Koehler A, Ramírez-Castrillón M, Pagani DM, Ferrão MF, Scroferneker ML, et al. Rapid classification of chromoblastomycosis agents genera by infrared spectroscopy and chemometrics supervised by sequencing of rDNA regions. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2021;254:119647.

240. Fagundes J, Castilho ML, Téllez Soto CA, Vieira L de S, Canevari RA, Fávero PP, et al. Ribosomal DNA nanoprobe studied by Fourier transform infrared spectroscopy. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2013;118:28–35.

241. Ferreira I, Ferreira-Strixino J, Castilho ML, Campos CBL, Tellez C, Raniero L. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* by FT-IR spectroscopy and nanotechnology. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2015;152:397–403.

7. ARTIGOS

Abaixo, serão apresentados os artigos publicados durante a realização do doutorado.

7.1 ARTIGOS PRINCIPAIS

Foram publicados três artigos com os resultados obtidos durante a realização do doutorado. Estes são os resultados principais, com os dados oriundos das análises que foram propostas no projeto do doutorado.

ARTIGO 1: Using infrared spectroscopy of serum and chemometrics for diagnosis of paracoccidioidomycosis

Data de publicação: 30/11/2022

Revista: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*

DOI: 10.1016/j.jpba.2022.115021

Alessandra Koehler¹, Maria Lúcia Scroferneker^{1,2}, Beatriz Aparecida Soares Pereira³, Nikolas Mateus Pereira de Souza⁴, Ricardo de Souza Cavalcante³, Rinaldo Pôncio Mendes³, Valeriano Antonio Corbellini^{5*}

¹ Postgraduate Program of Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

² Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

³ Tropical Diseases Area, School of Medicine, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, Brazil.

⁴ Department of Life Sciences, Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC, Santa Cruz do Sul, Brazil.

⁵ Department of Sciences, Humanities and Education, Postgraduate Program in Health Promotion, Postgraduate Program in Environmental Technology, Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC, Santa Cruz do Sul, Brazil.

*Corresponding author: Valeriano Antonio Corbellini. Department of Sciences, Humanities and Education, Postgraduate Program in Health Promotion, Postgraduate Program in Environmental Technology, Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil. valer@unisc.br

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic granulomatous mycosis endemic to Latin America, whose etiologic agents are fungi of the genus *Paracoccidioides*. PCM is usually diagnosed by microscopic observation of the fungus in biological samples, combined or not with other techniques such as serological methods. However, all currently used diagnostic methods have limitations. The objective of this study was to develop a method based on Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and chemometric analysis for PCM diagnosis. We

included 224 serum samples: 132 PCM sera, 24 aspergillosis sera, 10 cryptococcosis sera, 8 histoplasmosis sera, and 50 sera from healthy blood donors. Samples were analyzed by attenuated total reflection (ATR), and chemometric analyses including exploratory analysis through principal component analysis (PCA) and a classification method (PCM and non-PCM) through orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). The spectra were similar, with the main bands up to approximately 1652 cm^{-1} and 1543 cm^{-1} (amide I and amide II bands). This same region was mainly responsible for the partial separation of the samples in PCA. The OPLS-DA model correctly classified all serum samples with only one latent variable, with a determination coefficient (R^2) higher than 0.999 for both the calibration set and prediction set. Sensitivity and specificity were 100% for both sets, showing better performance than the reference diagnostic methods. Therefore, the use of FTIR/ATR together with OPLS-DA modeling proved to be a promising method for PCM diagnosis.

Keywords: paracoccidioidomycosis; Fourier transform infrared spectroscopy; orthogonal partial least squares discriminant analysis; multivariate analysis; photodiagnosis; systemic mycosis

1. INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic granulomatous mycosis endemic to Latin America [1]. Approximately 80% of cases occur in Brazil, with a wide endemic area comprising mainly the Southeast, Midwest, and South regions [2]. Cases also occur in the North region, where some hyperendemic areas have more than 40 cases/year [3]. The etiologic agents of PCM are the thermally dimorphic fungi of the genus *Paracoccidioides*, whose saprophytic (mycelial) phase is found mainly in soil. The disease is acquired in the respiratory tract through inhalation of fungal propagules suspended in the air [2,4]. In the lungs, the fungus transforms into its pathogenic yeast form and can spread to any organ and system through the lymphatic and hematogenous routes. If not diagnosed early, PCM can progress to death, or leave severe sequelae such as fibrosis and pulmonary emphysema [1].

PCM is diagnosed mainly through microscopic observation of the fungus in biological samples, such as sputum and biopsy of affected organs. However, this technique has low sensitivity and the necessary clinical samples are often difficult to obtain. It is also possible to culture *Paracoccidioides* spp. isolated from clinical samples, although this is uncommon due to the difficulty of isolating the fungus [1,5,6]. Other supplementary diagnostic methods are available, such as serological and molecular techniques. In serological methods, the most often

used technique is double immunodiffusion (DID) with the gp43 antigen [6]. However, the lack of standardization in the methods used [7], in addition to the different antigenic profiles of different species of *Paracoccidioides* [8], lead to inconsistencies in the results of serological diagnosis, which can compromise its clinical application. Molecular techniques, such as those based on polymerase chain reaction (PCR) are not yet routinely applied due to the lack of standardization and high costs involved [9]. The above considerations emphasize the need to develop new diagnostic methods.

One promising method is FTIR. In this analysis, the interactions of infrared radiation with chemical bonds generate a spectrum that contains the fingerprint of a sample. The main advantages of FTIR are the speed of analysis, its accuracy and reproducibility, use of a very small amount of sample, and generation of minimum waste [10]. In the medical field, FTIR analysis of minimally invasive biological fluids allows the diagnosis and monitoring of various diseases [11]. Specifically, blood serum is the most complex biofluid, as it perfuses organs throughout the body and provides information about intracellular and extracellular events [12], making serum analysis useful for the diagnosis of various diseases. In order to use spectroscopic data in the development of diagnostic methods, the use of supervised classification methods is necessary. These methods are machine-learning techniques that create models to perform class assignments from the spectroscopic data, after the supervised learning procedure. Frequently used supervised techniques are artificial neural networks, support vector machines, and analyses based on linear discriminant analysis (LDA) and partial least square analysis (PLS) [13,14].

In the area of infectology, FTIR has been increasingly explored as an alternative for the diagnosis of diseases, using whole blood or its components. For bacterial infections, the method has been proposed for the diagnosis of several acute infections using white blood cells (WBCs) [15]; *Salmonella typhi* infection, using serum [16]; and *Helicobacter pylori* infection, also using serum [17]. For viral infections, FTIR has been proposed for diagnosis of dengue, in serum [18]; HIV, in plasma [19]; and COVID-19, in plasma [20]. For infections caused by protozoa, FTIR has been used for the diagnosis of malaria, in whole blood artificially infected in the laboratory with *Plasmodium falciparum* [21]; and for the diagnosis of leishmaniasis in canine serum [22].

In mycology, FTIR has been proposed mainly for the identification of fungi from cultures that have previously been isolated in the laboratory, such as yeasts of the genus *Candida*, dermatophyte fungi [23], and black fungi that cause chromoblastomycosis [24]. FTIR has also been used to identify and characterize an isolate of *Paracoccidioides brasiliensis* [25].

For the diagnosis of fungal infections directly from biological samples from patients, FTIR has been seldom used. One study [26] used FTIR combined with machine learning algorithms to screen for PCM in 20 serum samples from patients and 20 serum samples from healthy individuals, and obtained an accuracy of 91.67%. Although the authors proposed this method as a screening diagnostic tool, their study did not attempt to differentiate PCM from other systemic mycoses, an essential step in validation.

The aim of the present study was to develop a method for the diagnosis of paracoccidioidomycosis, including its differentiation from other systemic mycoses, through the use of FTIR and supervised chemometric analyses, specifically the orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA).

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Patients and serum samples

A total of 224 retrospective serum samples from a repository at the School of Medicine of Botucatu, UNESP, were analyzed. Of these, 132 samples were from patients with paracoccidioidomycosis treated at the Infectious Diseases Service of the School of Medicine of Botucatu, UNESP, from the Botucatu region, São Paulo, Brazil. These patients were characterized as to sex, age, clinical form of PCM, and diagnostic criteria. The case definition, according to Mendes *et al.* (2017) [1], is based on identification of the fungus of the genus *Paracoccidioides* in clinical samples by direct mycological examination or culture, histopathological and/or cytopathological examination by cyto-inclusion. For all cases, a serological diagnosis was also performed, with the identification of specific serum antibodies, using the double immunodiffusion (DID) reaction on agar gel.

The control group consisted of 92 serum samples. Of these, 50 samples were from blood donors without PCM suspicion at the Botucatu Blood Center, from the same region of origin of the PCM patients. The other 42 samples from the control group consisted of other systemic mycoses: 24 serum samples from patients with aspergillosis, 10 serum samples from patients with cryptococcosis, and 8 serum samples from patients with histoplasmosis. All these patients were also treated at the Infectious Diseases Service of the School of Medicine of Botucatu, UNESP.

The study was approved by the ethics committees of the universities participating in the study (CAAE 37684720.2.1001.5343).

2.2 FTIR/ATR analysis

Serum samples were thawed, homogenized, and rapidly analyzed in triplicate by attenuated total reflection (ATR) on a Spectrum 400 FTIR/FTNIR spectrometer (Perkin-Elmer, Inc., Waltham, MA, USA), coupled to a standard Universal ATR Sampling Accessory (UATR, Perkin-Elmer, Inc.; Registration number L1250050). A 1 μL aliquot of each sample was deposited on the crystal of the instrument and dehydrated in air current (60–65 °C) for 1 min, an essential drying step for good FTIR spectra acquisition [14]. The acquisition range was from 4000 to 650 cm^{-1} using the spectral resolution of 4 cm^{-1} and 8 scans. Between the spectral acquisitions of each of the serum samples (in triplicate), a blank acquisition was performed under the same conditions.

2.3 Chemometrics

All chemometric analyses were conducted in the software Pirouette 4.5 (Infometrix, Bothell, WA, USA), and figures were constructed in the software OriginPro70 (OriginLab, Northampton, MA, USA).

Initially, an exploratory analysis was carried out through principal component analysis (PCA), to evaluate the possible separation of the paracoccidioidomycosis serum samples from the other serum samples included in the study (healthy blood donors, aspergillosis, cryptococcosis, and histoplasmosis). The average spectrum of the triplicates of each serum sample was obtained after correction of the ATR spectra followed by vector normalization of each replicate. Then, the dataset was pre-processed with the second derivative (Savitzky-Golay, 11 points) and PCA was performed with mean-centering. To represent the results, the principal components (PCs) that best separated the samples were chosen (through a t-test of the scores, $p < 0.05$), with their respective loadings.

Supervised analysis with OPLS-DA was used to classify the samples into two groups: cases (PCM) and controls (healthy blood donors and patients with other systemic mycoses). For this, the average spectrum of the triplicates of each serum sample was obtained after correction of the ATR spectra followed by amplitude normalization (0–1, min-max normalization) of each replicate. OPLS-DA models were initially developed with the total dataset, using different regions of the spectra, different pre-processing techniques (raw data, mean centering, or autoscaling), and different variable transformation algorithms (1st or 2nd derivative), to determine the best model.

After defining the best conditions for the model, the dataset was systematically divided in a 1:1 ratio into a calibration set (CS) and a prediction set (PS). The maximum number of

latent variables (LV) allowed in the OPLS-DA model was defined according to the recommendation of the ASTM E1655-05 guidelines, using the equation $N = 6(A+1)$, where N is the number of CS samples and A is the maximum number of LV allowed in the model. Considering $N = 112$ samples, the maximum number of LV is 17 [27]. The CS was submitted to leave-one-out cross-validation with one to 17 latent variables, and the presence of possible outliers was assessed through analysis of the Mahalanobis distance. External validation was performed, including each mean spectrum of a serum sample from PS in the OPLS-DA model obtained with CS (training set), and the respective class was predicted. The performance of the OPLS-DA models was evaluated by the root mean square error of cross-validation (RMSECV), root mean square error of prediction (RMSEP), coefficient of determination (R^2), t_{bias} , linear class, sensitivity, specificity, and accuracy.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Epidemiological data of PCM patients

The 132 patients with paracoccidioidomycosis included in the study had a mean age of 44.2 ± 17.1 years, ranging from 4 to 85 years old. The predominant sex was male, with a male:female ratio of 3.71:1. PCM cases with different clinical forms and severity, classified according to Mendes *et al.* 2017 [1], were included. The moderate chronic form predominated in 51.5% ($n = 68$) of the cases; the relationship between the clinical forms was approximately three chronic cases to one acute case (Table 1). The characteristics of age, sex, and clinical form of the cases included in the study are in accordance with the PCM epidemiological data found in the literature [28].

Table 1. Distribution of 132 patients with paracoccidioidomycosis according to sex, clinical form and severity.

Characteristics	n	%
Sex		
Male	104	78.8
Female	28	21.2
Clinical form and severity		
Moderate acute	6	4.5
Severe acute	27	20.5
Chronic mild	7	5.3
Chronic moderate	68	51.5
Chronic severe	20	15.2
Not informed	4	3.1

Regarding diagnostic criteria, 118 cases (89.4%) had *Paracoccidioides* spp. identification in a clinical sample; yet, in ten of these cases, the immunodiffusion reaction was negative. The other 14 cases were defined only as possible cases, as the fungus was not identified in clinical samples. However, there was a positive reaction in the immunodiffusion, and the clinical picture of the patients was in accordance with the PCM (Table 2). Thus, none of the methods used for the diagnosis of the included cases showed 100% sensitivity, which is expected for both techniques (fungus identification in clinical samples and DID) [5,6].

Table 2. Diagnostic criteria and case definition of 132 cases of paracoccidioidomycosis included in the study.

DIAGNOSTIC CRITERIA	DID+	DID-
With identification of <i>Paracoccidioides</i> spp. in clinical samples	108	10
Without identification of <i>Paracoccidioides</i> spp. in clinical samples*	14	0

*Possible cases of PCM, according to the case definition of Mendes et al. (2017) [1].
Abbreviations: DID – double immunodiffusion.

3.2 FTIR/ATR spectra of serum samples

The average spectrum of each type of serum samples included in the study is shown in Figure 1. The spectra are similar, with the main bands at approximately 1652 cm^{-1} and 1543 cm^{-1} , corresponding to the amide I and amide II bands, respectively [29]. Table 3 summarizes the vibrational modes and the biomolecular attributions of the bands marked in Figure 1F, comprising the main bands present in the human serum FTIR/ATR spectrum.

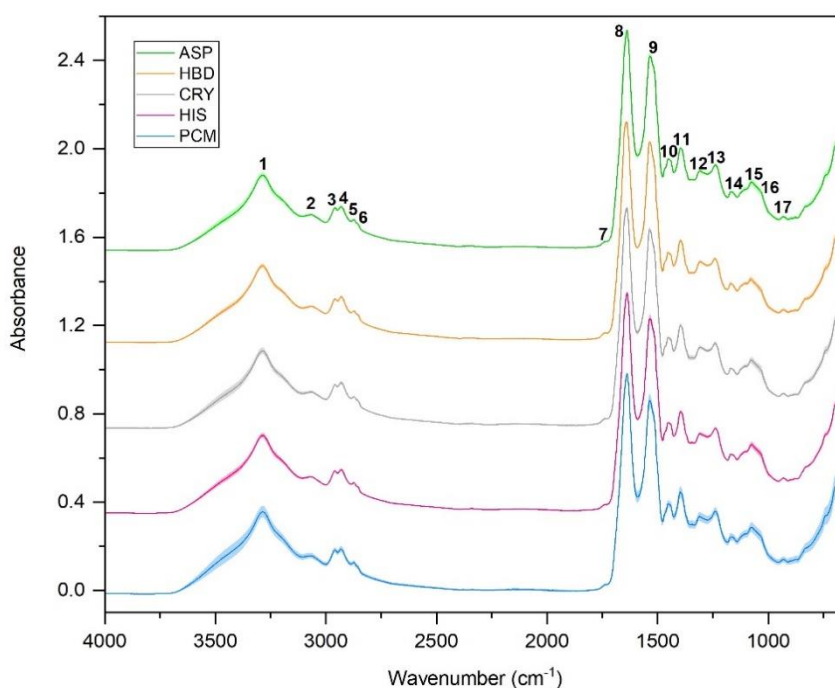


Figure 1. Average FTIR/ATR spectra of each group of serum samples, with their respective standard deviations. Averaging from each group was obtained calculating the arithmetic mean of absorption for each frequency of the three normalized min-max spectra from each sample, followed by the arithmetic mean of all the samples from the group. Abbreviations: ASP – aspergillosis; HBD – healthy blood donors; CRY – cryptococcosis; HIS – histoplasmosis; PCM – paracoccidioidomycosis.

Table 3. Characteristics of the main bands found in the analyzed sera samples spectra.

Band number	Frequency (cm ⁻¹)	Vibrational mode/molecular bond	Biomolecular attribution
1	~3303	O-H vibration mode Stretching vibration of N-H	Proteins (amide A)
2	~3068	Overtone of amide II band	Proteins (amide B)
3	~2960	Symmetric stretching vibrations of CH ₃	Lipids (fatty acids, cholesterol esters); proteins
4	~2927	Asymmetric stretching vibrations of CH ₂	Lipids (fatty acids)
5	~2873	Symmetric stretching vibrations of CH ₃	Lipids (fatty acids, cholesterol esters); proteins
6	~2852	Symmetric stretching vibrations of CH ₂	Lipids (fatty acids)
7	~1739	Stretching vibrations of C=O	Lipids (fatty acids, cholesterol esters)
8	~1652	Stretching vibrations of C=O	Proteins (amide I)
9	~1543	Bending vibrations of N-H	Proteins (amide II)
10	~1455	Bending vibrations of CH ₂ and CH ₃	Lipids (fatty acids); proteins
11	~1403	Symmetric stretching vibrations of CH ₃	Proteins
12	~1319	Amide III band	Proteins (amide III)
13	~1240	Asymmetric stretching vibration of PO ₂	Phospholipids
14	~1170	Stretching vibrations of C-O	Proteins
15	~1080	Symmetric stretching vibration of PO ₂	Phospholipids
16	~1035	Stretching vibrations of C-O	Carbohydrates
17	~970	Symmetric stretching vibration of P-O	Phospholipids

Ref: Naseer *et al.* 2020 [16]; Oleszko *et al.* 2017 [30]; Gunasekaran *et al.* 2010 [31].

3.3 Exploratory analysis of serum samples

The principal components (PCs) that best separated the serum samples were PC1 (with 41.0% of the variance) and PC3 (with 7.4% of the variance), according to the t-test of PCA scores ($p < 0.05$). The best separation was observed between PCM and the healthy individuals, on both the PC1 and PC3 axes. For the other mycoses, the PCM samples were separated mainly on the PC3 axis, although the separation was not very evident (Figure 2A).

The main region that contributed to the separation of the groups was from 1700 to 1450 cm⁻¹, where the amide I and amide II bands are found, and there is also absorption of immunoglobulins IgG₂, IgG₃ and IgG₄; apolipoproteins Apo-A1 and Apo-C3; urea; and albumin [32]. The main loadings responsible for separation of the samples were 1650 cm⁻¹ (positive) and 1643 cm⁻¹ (negative) in PC1; and 1657 cm⁻¹ (negative) and 1633 cm⁻¹ (positive) in PC3 (Figure 2B and 2C). The separation of samples from the different groups may have been due mainly to immunoglobulins; it is known that in the humoral immune response against *Paracoccidioides* spp., there is an increase in IgG levels, mainly of the IgG₄ class [33,34]. In the discrete separation of PCM from other systemic mycoses, considering the main bands in

PC3 loadings, the absorption of immunoglobulins may also have been determinant, mainly of IgG₂, IgG₃, and IgG₄, around 1650–1500 cm⁻¹ [32].

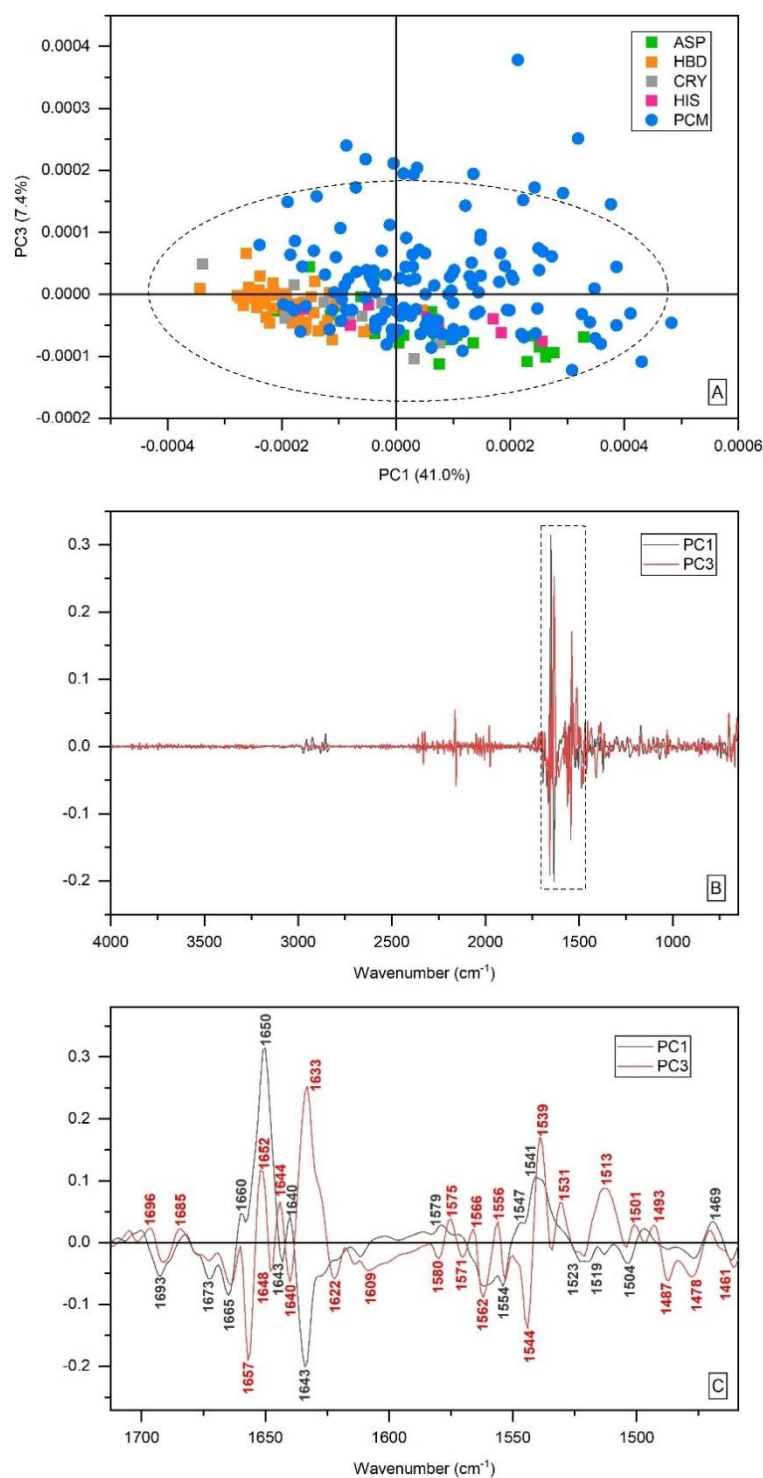


Figure 2. (A) Two-dimensional PCA scores plots PC1 vs. PC3 of FTIR spectral data set concerning 24 aspergillosis (ASP), 50 healthy blood donors (HBD), 10 cryptococcosis (CRY), 8 histoplasmosis (HIS) and 132 paracoccidioidomycosis (PCM) serum samples. Ellipse

represents the 95% confidence level. (B) PC1 and PC3 loadings, full spectra. (C) PC1 and PC3 loadings, enlarged in the most representative region of the spectra (approximately 1700 to 1450 cm^{-1}).

3.4 ATR/OPLS-DA model for PCM diagnostics

The use of FTIR generates a spectrum that contains the complete molecular composition of a biological sample. A pathological condition may cause specific changes in the sample, which can be detected in the spectrum through supervised chemometric analyses. These infrared molecular fingerprints (IMFs) in blood samples have been explored as a possibility for liquid biopsy in the diagnosis of several diseases [35].

In our study, the best ATR/OPLS-DA model for PCM diagnosis was obtained using the full spectrum, indicating that the alterations in serum caused by PCM can be found along the entire spectrum, not only in the main region of proteins, as seen in the PCA (1700 to 1450 cm^{-1}), and that the set of these alterations provides the best ATR/OPLS-DA modeling for PCM diagnosis. The second derivative of the spectra was used, without any pre-processing, and with the use of one orthogonal signal correction (OSC) component, which made the predictive quality of the model satisfactory.

The ATR/OPLS-DA models showed figures of merit (R^2 and RMSECV/RMSEP) compatible with high performance, even with one latent variable. The R^2 , RMSECV, and RMSEP values stabilized with four LVs; due to this stabilization, it was selected to represent the figures of merit of the models with up to ten LVs, even though the ASTM E1655-05 standard allows up to 17 LVs in the model without causing overfitting [27] (Figure 3). One latent variable was sufficient, since it already correctly classified all samples, with a low RMSECV value, in addition to having the lowest t_{bias} value ($t_{\text{crit}} = 1.98$ for 112 samples) (Figure 3, Table 4). No sample was detected as an outlier in the Mahalanobis distance analysis (Supplementary Figure 1). The main region responsible for the separation of the samples, with one latent variable, was 1700–1360 cm^{-1} . Other regions that contributed were 2970–2845 cm^{-1} and 1340–700 cm^{-1} .

The models were able to correctly classify all serum samples into the two groups. Even the serum samples from patients with PCM who had a negative serological reaction ($n = 10$), and also the sera from patients for whom the etiologic agent had not been diagnosed visually, but who had specific serum antibodies ($n = 14$), were correctly classified in the PCM group. Thus, the ATR/OPLS-DA model with only one latent variable achieved 100% specificity, sensitivity, and accuracy, comparing well with the supervision methods (identification of

Paracoccidioides spp. in clinical samples and/or DID) (Table 4; Figure 4). Inclusion of other systemic mycoses with the potential to be misdiagnosed as PCM is important, especially those that may be cross-reactive in immunodiagnosis, which is one of the limitations of using DID for PCM diagnosis [1]. Notably, the model was able to correctly diagnose PCM sera with different clinical forms and degrees of severity, indicating possible future use for analyses with FTIR/ATR to perform this classification.

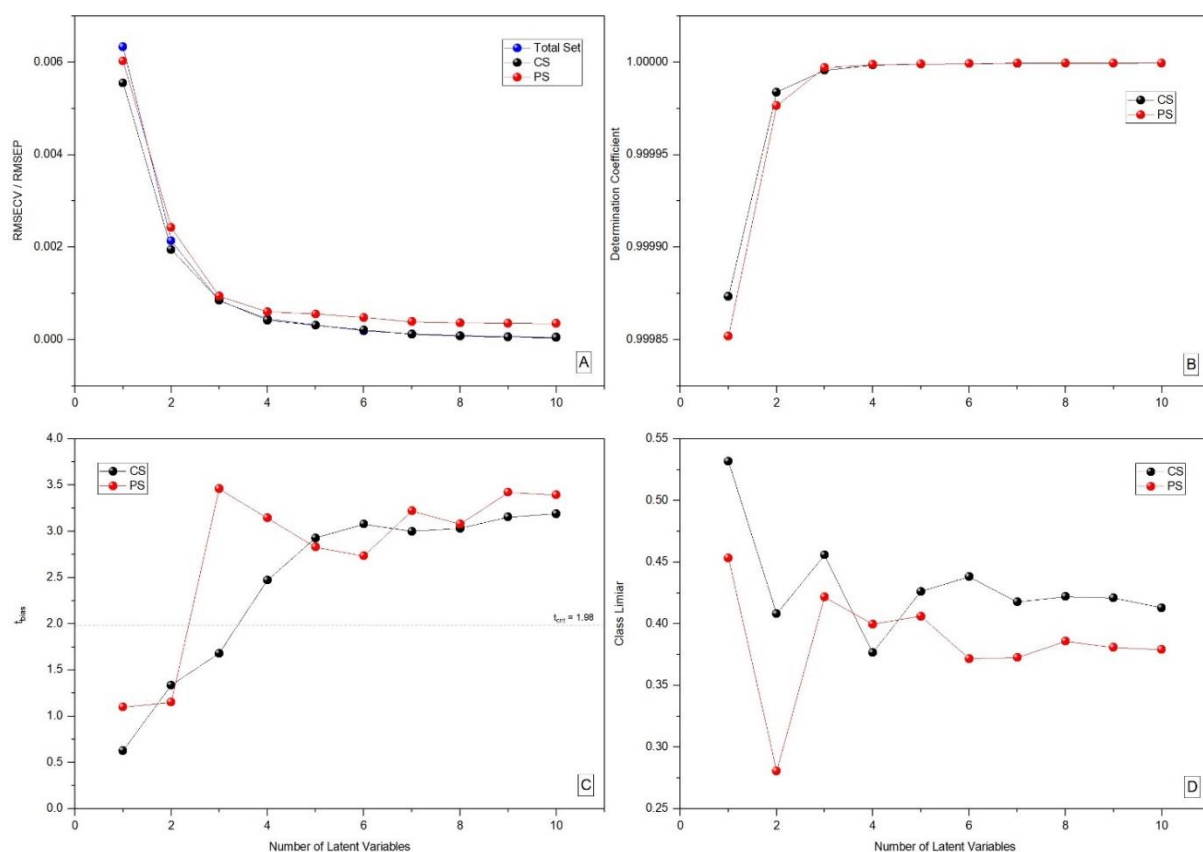


Figure 3. Figures of merit of OPLS-DA models for PCM diagnosis, from one to ten latent variables. **(A)** Root mean square error of cross-validation (RMSECV) of total set and calibration set (CS), and root mean square error of prediction (RMSEP) of prediction set (PS). **(B)** Determination coefficient (R^2) of CS and PS. **(C)** t_{bias} of CS and PS. **(D)** Class limiar of CS and PS.

Table 4. Figures of merit of ATR/OPLS-DA model for PCM diagnosis with one latent variable, after min–max normalization, second derivative by Savitzky-Golay (5 points) and one component of orthogonal signal correction (OSC).

Set/Figures of merit	Calibration set (CS) n = 112 samples	Prediction set (PS) n = 112 samples
RMSECV/RMSEP	0.0556	0.00602
R²	0.99987	0.99985
Class limiar	0.5317	0.4534
t_{bias}	0.62726	1.09876
Sensitivity (%)	100	100
Specificity (%)	100	100
Accuracy (%)	100	100

Abbreviations: RMSECV = root mean square error of cross-validation; RMSEP = root mean square error of prediction; R² = determination coefficient.

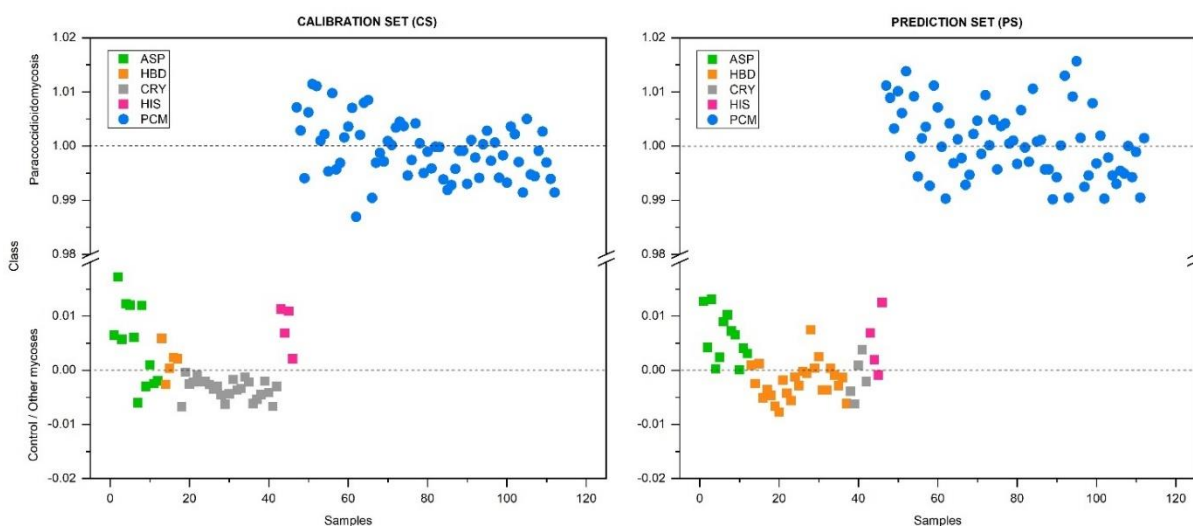


Figure 4. Predict class (in CS and in PS) for the ATR-FTIR/OPLS-DA model of classification of serum samples from patients with paracoccidioidomycosis (class = 1) and the other serum samples analyzed (healthy blood donors and patients with other systemic mycoses) (class = 0). Model elaborated with average spectra after min max normalization, non-processing, one component of orthogonal signal correction, and one latent variable. Abbreviations: ASP – aspergillosis; HBD – healthy blood donors; CRY – cryptococcosis; HIS – histoplasmosis; PCM – paracoccidioidomycosis.

4. CONCLUSIONS

The use of FTIR/ATR combined with OPLS-DA modeling proved to be a promising tool for PCM diagnosis, proving to be faster, less expensive, and more sensitive than traditional diagnostic methods. Moreover, this method showed 100% specificity, being able to differentiate the serum of patients with PCM from the serum of patients with other systemic mycoses. We emphasize the importance of future studies with a larger number of samples of other common systemic mycoses, such as systemic candidiasis.

Declaration of competing interest

None to declare.

Funding sources

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, without any role in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication.

REFERENCES

- [1] R.P. Mendes, R.S. Cavalcante, S.A. Marques, M.E.A. Marques, J. Venturini, T.F. Sylvestre, A.M.M. Paniago, A.C. Pereira, J.F. da Silva, A.T. Fabro, S.M.G. Bosco, E. Bagagli, R.C. Hahn, A.D. Levorato. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. *Open Microbiol. J.*, 11 (2017), pp 224-282. doi: 10.2174/1874285801711010224.
- [2] R. Martinez. Epidemiology of paracoccidioidomycosis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 57 (2015), pp. 11-20. doi: 10.1590/S0036-46652015000700004.
- [3] A.G. Krakhecke-Teixeira, D.H. Yamauchi, A. Rossi, H.R. de Sousa, H.G. Garces, J.L. Júnior, A.O.S. Júnior, M.S.S. Felipe, E. Bagagli, H.F. de Andrade Jr, M.M. Teixeira. Clinical and Eco-Epidemiological Aspects of a Novel Hyperendemic Area of Paracoccidioidomycosis in the Tocantins-Araguaia Basin (Northern Brazil), Caused by *Paracoccidioides* sp. *J. Fungi (Basel)*. 8 (2022), p. 502. doi: 10.3390/jof8050502.
- [4] S. Seyedmousavi, J. Guillot, A. Toloee, P.E. Verweij, G.S. de Hoog. Neglected fungal zoonoses: hidden threats to man and animals. *Clin. Microbiol. Infect.*, 21 (2015), pp. 416-425. doi: 10.1016/j.cmi.2015.02.031.

- [5] C. Silva Ferreira, E.M. de Castro Ribeiro, A. de M. Goes, B. de M. Silva. Current strategies for diagnosis of paracoccidioidomycosis and prospects of methods based on gold nanoparticles. *Future Microbiol.* 11 (2016), pp. 973-985. doi: 10.2217/fmb-2016-0062.
- [6] J.F. da Silva, H.C. de Oliveira, C.M. Marcos, P.A. Assato, A.M. Fusco-Almeida, M.J.S. Mendes-Giannini. Advances and challenges in paracoccidioidomycosis serology caused by *Paracoccidioides* species complex: an update. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 84 (2016), pp. 87-94. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.06.004.
- [7] M.S. Vidal, G.M. Del Negro, A.P. Vicentini, T.I. Svidzinski, M.J. Mendes-Giannini, A.M. Almeida, R. Martinez, Z.P. de Camargo, C.P. Taborda, G. Benard. Serological diagnosis of paracoccidioidomycosis: high rate of inter-laboratorial variability among medical mycology reference centers. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 8 (2014), p. e3174. doi: 10.1371/journal.pntd.0003174.
- [8] G. Gegembauer, L.M. Araujo, E.F. Pereira, A.M. Rodrigues, A.M. Paniago, R.C. Hahn, Z.P. de Camargo. Serology of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 8 (2014), p. e2986. doi: 10.1371/journal.pntd.0002986.
- [9] F.R. Teles, M.L. Martins. Laboratorial diagnosis of paracoccidioidomycosis and new insights for the future of fungal diagnosis. *Talanta*. 85 (2011), pp. 2254-2264. doi: 10.1016/j.talanta.2011.07.099.
- [10] G. Bellisola, C. Sorio. Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis. *Am. J. Cancer Res.*, 2 (2012), pp. 1-21.
- [11] V. Balan, C.T. Mihai, F.D. Cojocaru, C.M. Uritu, G. Dodi, D. Botezat, I. Gardikiotis. Vibrational Spectroscopy Fingerprinting in Medicine: from Molecular to Clinical Practice. *Materials (Basel)*, 12 (2019), p. 2884. doi: 10.3390/ma12182884.
- [12] A. Sala, D.J. Anderson, P.M. Brennan, H.J. Butler, J.M. Cameron, M.D. Jenkinson, C. Rinaldi, A.G. Theakstone, M.J. Baker. Biofluid diagnostics by FTIR spectroscopy: A platform technology for cancer detection. *Cancer Lett.*, 477 (2020), pp. 122-130. doi: 10.1016/j.canlet.2020.02.020
- [13] M.J. Baker, S.R. Hussain, L. Lovergne, V. Untereiner, C. Hughes, R.A. Lukaszewski, G. Thiéfin, G.D. Sockalingum. Developing and understanding biofluid vibrational spectroscopy: a critical review. *Chem. Soc. Rev.*, 45 (2016), pp. 1803-1818. doi: 10.1039/c5cs00585j.
- [14] M.J. Baker, J. Trevisan, P. Bassan, R. Bhargava, H.J. Butler, K.M. Dorling, P.R. Fielden, S.W. Fogarty, N.J. Fullwood, K.A. Heys, C. Hughes, P. Lasch, P.L. Martin-Hirsch, B.

- Obinaju, G.D. Sockalingum, J. Sulé-Suso, R.J. Strong, M.J. Walsh, B.R. Wood, P. Gardner, F.L. Martin. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nat. Protoc.* 9 (2014), pp. 1771-1991. doi: 10.1038/nprot.2014.110.
- [15] J. Mordehai, J. Ramesh, M. Huleihel, Z. Cohen, O. Kleiner, M. Talyshinsky, V. Erukhimovitch, A. Cabana, A. Salman, R.K. Sahu, H. Guterman, S. Mordechai. Studies on acute human infections using FTIR microspectroscopy and cluster analysis. *Biopolymers.* 73 (2004), pp. 494-502. doi: 10.1002/bip.10554.
- [16] K. Naseer, S. Ali, S. Mubarak, S.Z. Hussain, J. Qazi. Use of ATR-FTIR for detection of *Salmonella typhi* infection in human blood sera. *Infrared Phys. Technol.*, 110 (2020), p. 103473. doi: j.infrared.2020.103473.
- [17] W. Gonciarz, Ł. Lechowicz, M. Urbaniak, W. Kaca, M. Chmiela. Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Artificial Neural Networks Applied to Investigate Quantitative Changes of Selected Soluble Biomarkers, Correlated with *H. pylori* Infection in Children and Presumable Consequent Delayed Growth. *J. Clin. Med.*, 9 (2020), p. 3852. doi: 10.3390/jcm9123852.
- [18] K. Naseer, S. Ali, S. Mbarik, I. Hussain, B. Mirza, J. Qazi. FTIR spectroscopy of freeze-dried human sera as a novel approach for dengue diagnosis. *Infrared Phys. Technol.* 102 (2019), p. 102998. doi: 10.1016/j.infrared.2019.102998.
- [19] L.G. Silva, A.F.S. Péres, D.L.D. Freitas, C.L.M. Morais, F.L. Martin, J.C.O. Crispim, K.M.G. Lima. ATR-FTIR spectroscopy in blood plasma combined with multivariate analysis to detect HIV infection in pregnant women. *Sci. Rep.*, 10 (2020), p. 20156. doi: 10.1038/s41598-020-77378-3.
- [20] A. Banerjee, A. Gokhale, R. Bankar, V. Palanivel, A. Salkar, H. Robinson, J.S. Shastri, S. Agrawal, G. Hartel, M.M. Hill, S. Srivastava. Rapid Classification of COVID-19 Severity by ATR-FTIR Spectroscopy of Plasma Samples. *Anal. Chem.*, 93 (2021), pp. 10391-10396. doi: 10.1021/acs.analchem.1c00596.
- [21] S. Roy, D. Perez-Guaita, D.W. Andrew, J.S. Richards, D. McNaughton, P. Heraud, B.R. Wood. Simultaneous ATR-FTIR Based Determination of Malaria Parasitemia, Glucose and Urea in Whole Blood Dried onto a Glass Slide. *Anal. Chem.* 89 (2016), pp. 5238-5245. doi: 10.1021/acs.analchem.6b04578.
- [22] G. Larios, M. Ribeiro, C. Arruda, S.L. Oliveira, T. Canassa, M.J. Baker, B. Marangoni, C. Ramos, C. Cena. A new strategy for canine visceral leishmaniasis diagnosis based on FTIR spectroscopy and machine learning. *J. Biophotonics.* 14 (2021), p. e202100141. doi: 10.1002/jbio.202100141.

- [23] Y.F. Mohammed, E.Z. Salem, I.M. Shahin, H.M. Abdo, H.E. Emam, M. Fawzy, M.F. Abdel Salam. Applicability of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy in rapid identification of some *Candida* and dermatophyte species infections in humans. *Int. J. Dermatol.*, 55 (2016), pp. 1164-1171. doi: 10.1111/ijd.4957.
- [24] D. Heidrich, A. Koehler, M. Ramírez-Castrillón, D.M. Pagani, M.F. Ferrão, M. L. Scroferneker, V.A. Corbellini. Rapid classification of chromoblastomycosis agents genera by infrared spectroscopy and chemometrics supervised by sequencing of rDNA regions. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 254 (2021), p. 119647. doi: 10.1016/j.saa.2021.119647.
- [25] I. Ferreira, J. Ferreira-Strixino, M.L. Castilho, C.B. Campos, C. Tellez, L. Raniero. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* by FT-IR spectroscopy and nanotechnology. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 152 (2016), pp. 397-403. doi: 10.1016/j.saa.2015.07.061.
- [26] E.C.A. de Brito, T. Franca, T. Canassa, S.S. Weber, A.M.M. Paniago, C. Cena. Paracoccidioidomycosis screening diagnosis by FTIR spectroscopy and multivariate analysis. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 39 (2022), p. 102921. doi: 10.1016/j.pdpdt.2022.102921.
- [27] ASTM – American Society for Testing and Materials. Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis, ASTM International E1655-17. West Conshohocken, Pennsylvania, 2017.
- [28] R. Martinez. New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. *J. Fungi (Basel)*., 3 (2017), p. 1. doi: 10.3390/jof3010001.
- [29] A. Barth. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1767 (2007), pp. 1073-1101. doi: 10.1016/j.bbabbio.2007.06.004
- [30] A. Oleszko, J. Hartwich, A. Wójtowicz, M. Gąsior-Głogowska, H. Huras, M. Komorowska. Comparison of FTIR-ATR and Raman spectroscopy in determination of VLDL triglycerides in blood serum with PLS regression. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 183 (2017), pp. 239-246. doi: 10.1016/j.saa.2017.04.020.
- [31] S. Gunasekaran, D. Uthra, E. Sailatha, B. Anita. FTIR spectral study on jaundice blood samples before and after treatment. *Asian J. Chem.* 22 (2010), pp. 51-56.
- [32] C. Petibois, G. Cazorla, A. Cassaigne, G. Déléris. Plasma protein contents determined by Fourier-transform infrared spectrometry. *Clin. Chem.*, 47 (2001), pp. 730-738.
- [33] A. de S. Marquez, A.P.V. Moreira, P.C. Leonello, F.A. Nakanishi, E.N. Itano. Serum proteins and fractions, HDL-cholesterol and total IgG and IgE levels in cases of acute and

chronic paracoccidioidomycosis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 42 (2009), pp. 245-249. doi: 10.1590/S0037-86822009000300002.

[34] M.R. Fortes, H.A. Miot, C.S. Kurokawa, M.E. Marques, S.A. Marques. Immunology of paracoccidioidomycosis. *An. Bras. Dermatol.*, 86 (2011), pp. 516-524. doi: 10.1590/s0365-05962011000300014.

[35] L. Voronina, C. Leonardo, J.B. Mueller-Reif, P.E. Geyer, M. Huber, M. Trubetskov, K.V. Kepesidis, J. Behr, M. Mann, F. Krausz, M. Žigman. Molecular Origin of Blood-Based Infrared Spectroscopic Fingerprints. *Angew. Chem.*, 60 (2021), pp. 17060-17069. doi: 10.1002/anie.202103272.

ARTIGO 2: Antibody titer prediction from serum immunodiffusion test of patients with paracoccidioidomycosis using infrared spectroscopy and chemometrics

Data de publicação: 06/09/2023

Revista: *Analytica*

DOI: 10.3390/analytica4030028

Alessandra Koehler¹, Maria Lúcia Scroferneker^{1,2}, Paulo Cezar de Moraes¹, Beatriz Aparecida Soares Pereira³, Ricardo de Souza Cavalcante³, Rinaldo Pôncio Mendes³ and Valeriano Antonio Corbellini^{4,*}

¹ Postgraduate Program of Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, CEP 90035-003, Rio Grande do Sul, Brazil.

² Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, CEP 90050-170, Brazil.

³ Tropical Diseases Area, School of Medicine, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, CEP 18618-687, São Paulo, Brazil.

⁴ Department of Sciences, Humanities and Education, Postgraduate Program in Health Promotion, Postgraduate Program in Environmental Technology, Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC, Santa Cruz do Sul, CEP 96815-900, Rio Grande do Sul, Brazil.

*Correspondence: valer@unisc.br; Tel.: +5551 37177390

Abstract: Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by fungi of the genus *Paracoccidioides*. Serological tests are auxiliary in the diagnosis of PCM. However, the lack of standardization is a central problem in serodiagnosis and antibody titration. The objective of this study is to propose a methodology based on Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) for predicting antibody titers in patients with PCM. A total of 118 serum samples from patients with PCM were included, for which antibody titration using double immunodiffusion (DID) was previously performed. Serum samples were analyzed by attenuated total reflection (ATR) FTIR and a supervised analysis with partial least squares regression (PLS) was used to predict the antibody titers. The PLS model with two latent variables and with the use of one orthogonal signal correction (OSC) showed a determination coefficient (R^2) higher than 0.9999 for both the calibration and prediction set. The model was able to predict the antibody titers from patients with PCM with a minimal error. Therefore, modeling with FTIR/ATR and multivariate

calibration proved to be a fast and highly accurate method for antibody titration, replacing the need for antigen production and performance of traditional serological tests.

Keywords: paracoccidioidomycosis; FTIR spectroscopy; immunodiffusion; antibody titration; serodiagnosis.

1. Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic granulomatous mycosis endemic to Latin America, occurring from Mexico to Argentina, caused by the thermodimorphic fungi of the genus *Paracoccidioides*. The country with the highest occurrence of PCM is Brazil, with 80% of all reported cases, mainly in the Southeast, Center-West and South regions [1]. However, human occupation of new areas, together with environmental interventions, has modified the epidemiology of PCM [2], causing outbreaks of the disease in urban areas [3] and the emergence of new hyperendemic regions [4].

Paracoccidioides spp. is classified in the medium priority group in the WHO fungal priority pathogens list [5]. However, PCM is still not recognized by the World Health Organization as a neglected tropical disease (NTD), although it fulfills all the requirements to be in that list, due to its great social impact in Latin America [6]. PCM is responsible for 50% of deaths caused by systemic mycoses in Brazil [7] and is the eighth cause of death among chronic infectious diseases in the country [8].

Fungi of the genus *Paracoccidioides* are soil saprophytes, in addition to being commonly found in mammal reservoirs, mainly armadillos [9]. Thus, the major risk factor for PCM is soil exposure, being considered an occupational disease in people who work with the soil, such as farmers [10]. The habit of smoking is another important risk factor, and 90% of patients with the chronic form of PCM are smokers. The disease in the chronic form is more common in males aged between 30 and 60 years. However, in the acute form, it is common to affect children, adolescents, and young adults up to 30 years old of both sexes [2,11]. What differentiates the two forms (chronic and acute) is mainly the age of the affected individuals, the duration of symptoms and the organs involved. In the acute form, symptoms develop over a short period of time and the main organs involved are the lymph nodes, liver, and spleen. In the chronic form, symptoms develop on average for at least six months, and involvement of the lungs and upper aerodigestive tract mucosa is usually present [1].

The infection starts in the lungs, through the inhalation of fungal propagules. From them, the disease can spread to any organ or body system, resulting in a wide spectrum of

clinical manifestations. If not diagnosed and treated correctly, PCM can lead to hospitalizations and generate serious sequelae such as pulmonary fibrosis and emphysema [12,13].

Thus, early diagnosis of PCM is essential. It is established by demonstrating *Paracoccidioides* spp. in clinical samples, mainly through direct mycological examination of sputum, lesion scrapings, and bronchoalveolar lavage (BAL) fluid. Histopathological examination is also a frequent diagnostic method, through visualization of the typical yeast cells in tissue fragments [1,11]. Isolation and cultivation of the fungus from clinical specimens is difficult and can take between 3 to 6 weeks of growth [10]; therefore, it is not a routinely used diagnostic tool.

There are other auxiliary diagnostic methods, such as the serological tests for the detection of anti-*Paracoccidioides* antibodies [1]. Visualization of the fungus in clinical samples is not always possible, making serological tests a good option [14]. Positivity in serological tests does not establish the diagnosis, however, it makes the case probable. In addition to being useful for diagnosis, the titer of specific anti-*Paracoccidioides* antibodies correlates with the severity of the case and can be used as a criterion for cure [15]. The most used technique is double immunodiffusion (DID), whose specificity and sensitivity can vary from 65% to 100%, depending on the antigen used [14]. The lack of standardization of techniques and antigens is a central problem in serological tests [16].

Recently, our research group developed a method for diagnosing PCM in serum using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) [17]. Considering that FTIR is a technique that allows to determine the “molecular fingerprint” of a sample [18], we hypothesized that it would be possible to apply this technique for antibody titration, which is traditionally done by DID. Therefore, the aim of the present study is to propose an innovative methodology based on FTIR spectroscopy for predicting antibody titers in patients with PCM, facilitating the clinical management of this neglected endemic mycosis.

2. Materials and Methods

2.1 Patients and Serum Samples

A total of 118 retrospective serum samples from patients with PCM were analyzed. These samples were provenient from a repository at the School of Medicine of Botucatu, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP). The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the Ethics Committees of the

universities participating in the study (CAAE 37684720.2.1001.5343). All patients included were characterized as to sex, age, affected organs, and clinical form/severity, following the criteria by Mendes et al. (2017) [1].

All the patients were diagnosed and treated at the Infectious Diseases Service of the School of Medicine of Botucatu (UNESP), from the Botucatu region, São Paulo, Brazil. The cases were diagnosed by clinical suspicion followed by visualization of the fungus of the genus *Paracoccidioides* in clinical samples, by direct mycological examination and/or culture and/or histopathology and/or cytopathology by cyto-inclusion [1].

For all cases, antibody titration was performed at the Infectious Diseases Service. An in-house produced exoantigen was used, based on the methodology by Camargo et al. (2003) [19], from the sample of *P. brasiliensis* B-339 (=ATCC 200273; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). Antibody titration was performed using the double immunodiffusion technique (DID), with antibody titers ranging from 1:1024 to 1:1 (Table 1).

Table 1. Antibody titration from the double immunodiffusion test (DID) of 118 serum samples from patients with paracoccidioidomycosis.

Antibody titer*	Log ₂ (1/Antibody titer)	Number of samples (N = 118)	Percentage %
1:1024	10	4	3.39
1:256	8	8	6.78
1:128	7	10	8.47
1:64	6	16	13.56
1:32	5	16	13.56
1:16	4	23	19.49
1:8	3	9	7.63
1:4	2	12	10.17
1:2	1	16	13.56
1:1	0	4	3.39

2.2 FTIR-ATR Analysis

Serum samples were analyzed in triplicate by attenuated total reflection (ATR) on Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR (Perkin Elmer) spectrometer, coupled to standard Universal ATR Sampling Accessory (UATR, Perkin-Elmer Inc.; Registration number L1250050).

Triplicates of 1 µL of each sample were deposited on the crystal of the instrument and dehydrated in airstream (60-65 °C) for one minute. The acquisition range was from 4000 to 650 cm⁻¹ using the spectral resolution of 4 cm⁻¹ and 8 scans. Between the spectral acquisitions of

each of the serum samples and their triplicates, a blank acquisition was performed under the same conditions.

2.3 Chemometrics

All chemometric analyses were conducted in the software Pirouette 4.5 (Infometrix, Bothell, WA, USA), and figures were constructed in the software OriginPro70 (OriginLab, Northampton, MA, USA).

Antibody titers were transformed by the expression $\log_2 (1/\text{Antibody titer})$, obtaining inverse powers of 2 as described in Table 1. The average serum spectra were presented in two sets to analyze differences between samples with higher antibody titers and those with lower titers. Considering the mean value of the titers in $\log_2 (1/\text{Antibody titer})$, which is 4.6, one of the sets grouped the samples with values of titers less than or equal to 4.6 ($n=64$), and the other grouped the samples with titer values greater than 4.6 ($n=54$). Averaging was obtained by calculating the arithmetic mean of absorption for each frequency of the three min-max and vector normalized spectra from each sample, followed by the arithmetic mean of all samples in the set. A *t*-test with a significance level of 0.05 was performed between the sets to determine their differences [20].

Supervised analysis with partial least squares regression (PLS) was used to predict the antibody titers of the serum samples from patients with PCM. The average spectrum of the triplicates of each serum sample was obtained after amplitude normalization (0-1, min-max normalization) followed by vector normalization. PLS models were initially developed with the total dataset, different regions of the spectra, different pre-processing techniques (raw data, mean centering, or autoscaling), and different variable transformation algorithms (1st or 2nd derivative), to determine the best models.

After defining the best conditions for the model, the dataset was systematically divided in a 1:1 ratio into a calibration set (CS) and a prediction set (PS). The maximum number of latent variables (LV) allowed in the PLS models was defined according to the recommendation of the ASTM E1655–05 guidelines, using the equation $N = 6(A+1)$, where *N* is the number of CS samples and *A* is the maximum number of LV allowed in the model. Considering $N=59$ samples, the maximum number of LV is 8 [21]. The CS was submitted to leave-one-out cross-validation with one to eight latent variables. External validation was performed, including each mean spectrum of a serum sample from PS in the PLS model obtained with CS (training set), and the respective antibody titer value was predicted. The performance of the PLS model was

evaluated by the determination coefficient (R^2), root mean square error of cross-validation (RMSECV), root mean square error of prediction (RMSEP), and t_{bias} .

3. Results and Discussion

The 118 patients included in the study had a mean age of 42.6 ± 17.3 years, ranging from 4 to 85 years old. The predominant sex was male, with a male:female ratio of 3.33:1. The patients had a wide range of clinical presentations, predominantly the moderate chronic form, in 53.39% of the cases ($n=63$) (Table 2). In total, 13 organs were involved in the cases of PCM (lungs, skin, upper aerodigestive tract mucosa, lymph nodes, trachea, larynx, liver, spleen, adrenal glands, intestine, bones, central nervous system, and genitals), with 73.73% of the patients ($n=87$) having involvement of more than one organ. The most affected organs were the lungs, in 88 cases, the lymph nodes, in 45 cases, and the upper aerodigestive tract mucosa, in 37 cases. The inclusion of patients with different clinical presentations is important to make the model more robust, considering that PCM is a disease that presents a wide spectrum of manifestations [1].

Table 2. Distribution of 118 patients with paracoccidioidomycosis according to sex, clinical form, and severity.

Characteristics	n	Percentage %
Sex		
Male	90	76.27
Female	27	22.88
Not informed	1	0.85
Clinical form and severity*		
Moderate acute	6	5.09
Severe acute	26	22.03
Chronic mild	2	1.69
Chronic moderate	63	53.39
Chronic severe	18	15.26
Not informed	3	2.54

*Classified according to Mendes et al. (2017) [1].

The average spectra of the 118 serum samples are shown in Figure 1A. The main contributions in the spectra are related to proteins and lipids, and the main bands are amide I and amide II, at approximately 1652 cm^{-1} and 1543 cm^{-1} , respectively [22]. The main differences between the groups (antibody titer ≤ 4.6 and antibody titer > 4.6) are found in the

region from 1727 to 1403 cm^{-1} , which presented the lowest p values, highlighted in Figure 1B. In this region, absorption of immunoglobulins IgG2, IgG3, and IgG4 occurs [23], which could explain its contribution in differentiating samples with lower and higher concentrations of antibodies.

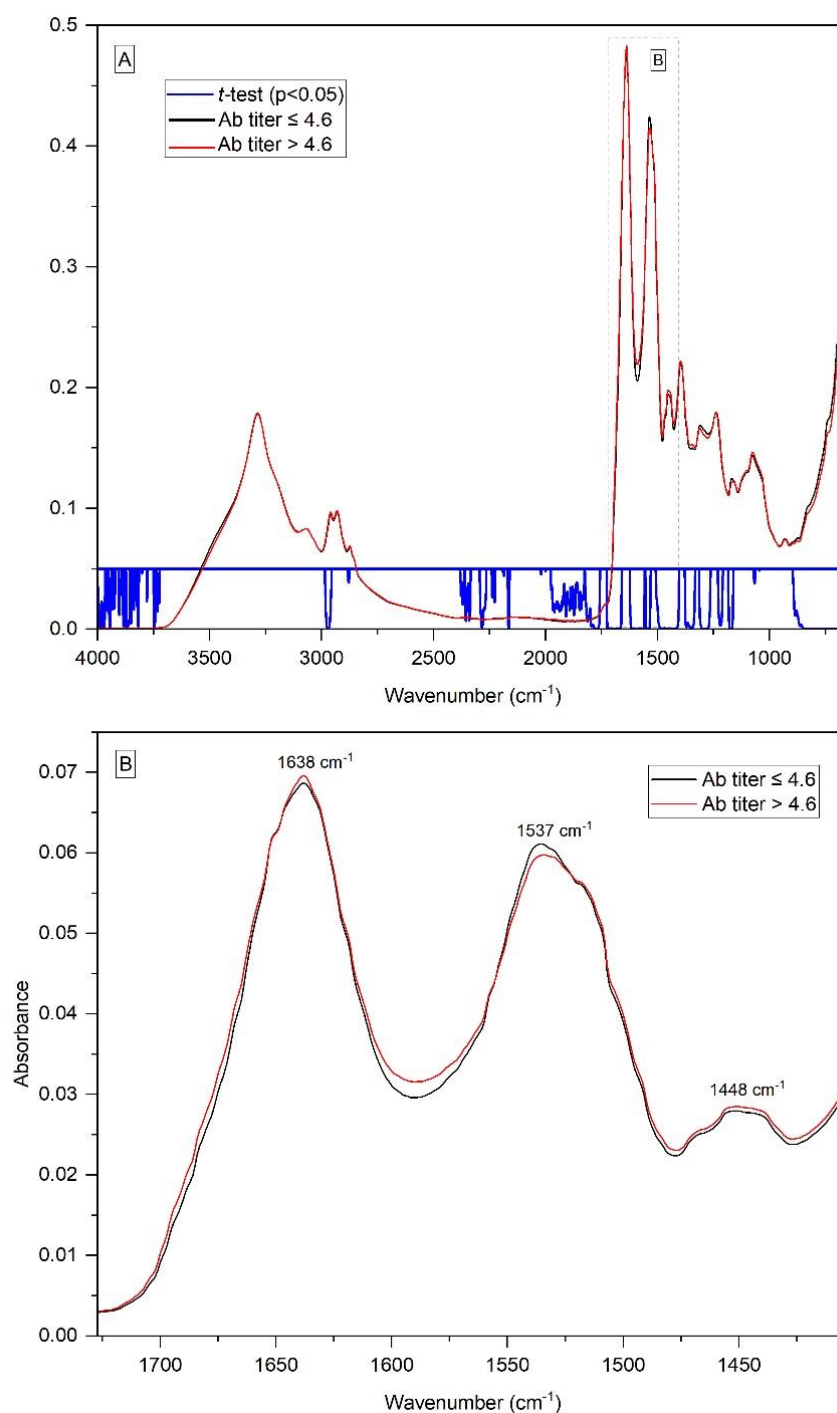


Figure 1. (A) Average FTIR/ATR spectra of serum from patients with paracoccidioidomycosis, considering two sets (antibody titer ≤ 4.6 and antibody titer > 4.6), showing regions with $p < 0.05$

in the *t*-test performed between the two groups. Averaging was obtained by calculating the arithmetic mean of absorption for each frequency of the three min-max and vector normalized spectra from each sample, followed by the arithmetic mean of all the samples of the set; **(B)** 1727-1403 cm^{-1} region enlarged, showing the differences between the two groups and the main bands found.

Despite the differences found in the region from 1727 to 1403 cm^{-1} , the best PLS models for the antibody titer prediction were obtained with the use of the full spectrum, evidencing that contributions showing antibody concentrations are present across the entire spectrum, not just in that specific region [17].

As can be seen in Figure 2, the best models were obtained using the 1st or 2nd derivative, without any pre-processing, as mean centering and autoscaling considerably impair the predictive quality of the models. Derivatives are powerful methods both for baseline correction and for resolving overlapping spectral bands, being very suitable for improving the quality of ATR-FTIR spectra of biofluids [24]. However, even so, the models showed insufficient predictive power, which was only optimized with the application of one orthogonal signal correction (OSC) component (Figure 2). OSC was proposed in 1998 by Wold et al., where it was developed for application in near-infrared (NIR) spectra. This filter removes from the spectral data (X matrix) only those that are totally unrelated to the property of interest to be inferred from the spectra (Y matrix). This is done through orthogonalization, ensuring that the information from the X matrix that was removed is mathematically orthogonal to Y. Thus, in the work in which it was initially proposed, the OSC was able to considerably improve the quality of the multivariate calibration, compared to the raw data and with other signal correction techniques [25].

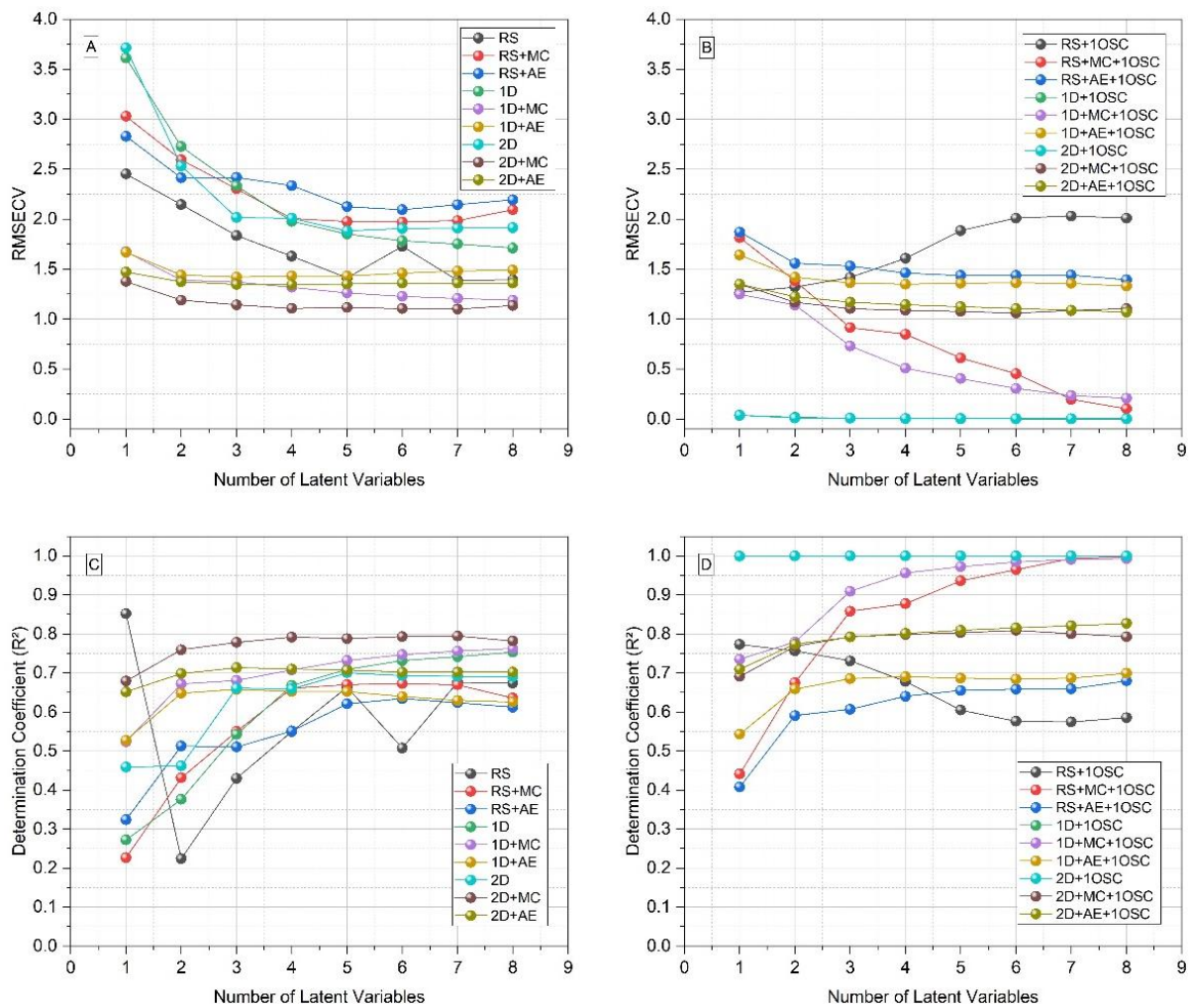


Figure 2. Figures of merit of PLS models for antibody titer prediction with different pre-processing methods, from one to eight latent variables, considering the total set of the samples (N=118). **(A)** Root mean square error of cross-validation (RMSECV), without orthogonal signal correction (OSC); **(B)** RMSECV with OSC; **(C)** Determination coefficient (R^2) without OSC; **(D)** R^2 with OSC. RS: raw spectra; MC: mean centering; AE: autoscaling; 1D: 1st derivative; 2D: 2nd derivative.

Several studies have already used OSC in different techniques and analyzes in order to improve the predictive quality of multivariate calibration models. In the field of medical mycology, our research group has already successfully applied OSC to identify fungi that cause chromoblastomycosis, using FTIR and PLS-DA [26], and for predicting the antifungal susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* isolates against itraconazole, using FTIR and PLS [27]. In the same way, in the present work we were able to optimize the results with the use of one OSC component, together with the use of 1st derivative. Although the figures of merit were very similar with the use of 1st or 2nd derivative and one OSC component (they are even

superimposed in Figures 2B and 2D), the values are slightly better with the 1st derivative. From the definition of the best conditions, the samples were divided 1:1 in the calibration and prediction sets and the modeling was carried out. Under these conditions, the models with one to eight latent variables showed determination coefficients and root mean square errors compatible with high performance (Figure 3).

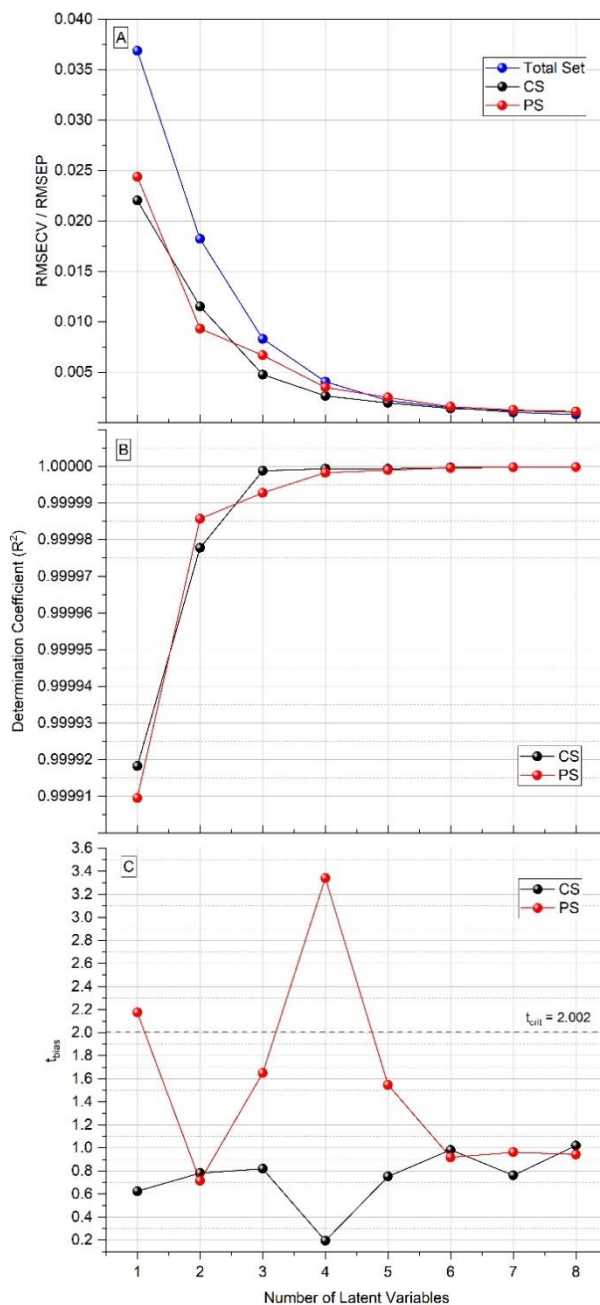


Figure 3. Figures of merit of PLS models for antibody titer prediction, from one to eight latent variables. (A) Root mean square error of cross-validation (RMSECV) of total set and calibration

set (CS), and root mean square error of prediction (RMSEP) of prediction set (PS). **(B)** Determination coefficient (R^2) of CS and PS. **(C)** t_{bias} of CS and PS.

As can be seen in Figure 3, the t_{bias} value in the prediction set using one latent variable was greater than the t_{crit} value ($=2.002$). The t_{bias} value is important, as it represents the mean bias between the predicted and actual values of the antibody titers and, therefore, must be below t_{crit} . The t_{bias} value were less than 2.002 in the PLS model with two latent variables, and considering that, with two LVs, the prediction error ($=0.0093$) was already about a hundred times smaller than the difference between the antibody titers (when considered as potency rather than fractions, the interval between titers equals 1), this was the chosen number of latent variables to be used in the PLS model (Table 3). In the developed model, to be considered negative, a sample must have a negative predicted value less than 2x the RMSECV value (i.e., predicted value ≤ -0.023), which can be a problem for samples with a titer of 1:1, or 0, if they have a predicted value equal or less than -0.023 . However, the two samples with antibody titer 0 included in the study had prediction error within the established limit, being correctly predicted with titer 1:1 (Figure 4). Thus, it was possible to predict the antibody titers of the serum samples from patients with PCM with a minimal error (Figure 4).

Table 3. Figures of merit of ATR/PLS model for antibody titer prediction with two latent variables, after min–max normalization followed by vector normalization, 1st derivative by Savitzky-Golay (5 points), and one component of orthogonal signal correction (OSC).

Set / Figures of merit	Calibration set (CS) n = 59 samples	Prediction set (PS) n = 59 samples
R^2	0.999978	0.999986
RMSECV/RMSEP	0.0115	0.0093
t_{bias}	0.7830	0.7155

Abbreviations: R^2 = determination coefficient; RMSECV = root mean square error of cross-validation; RMSEP = root mean square error of prediction.

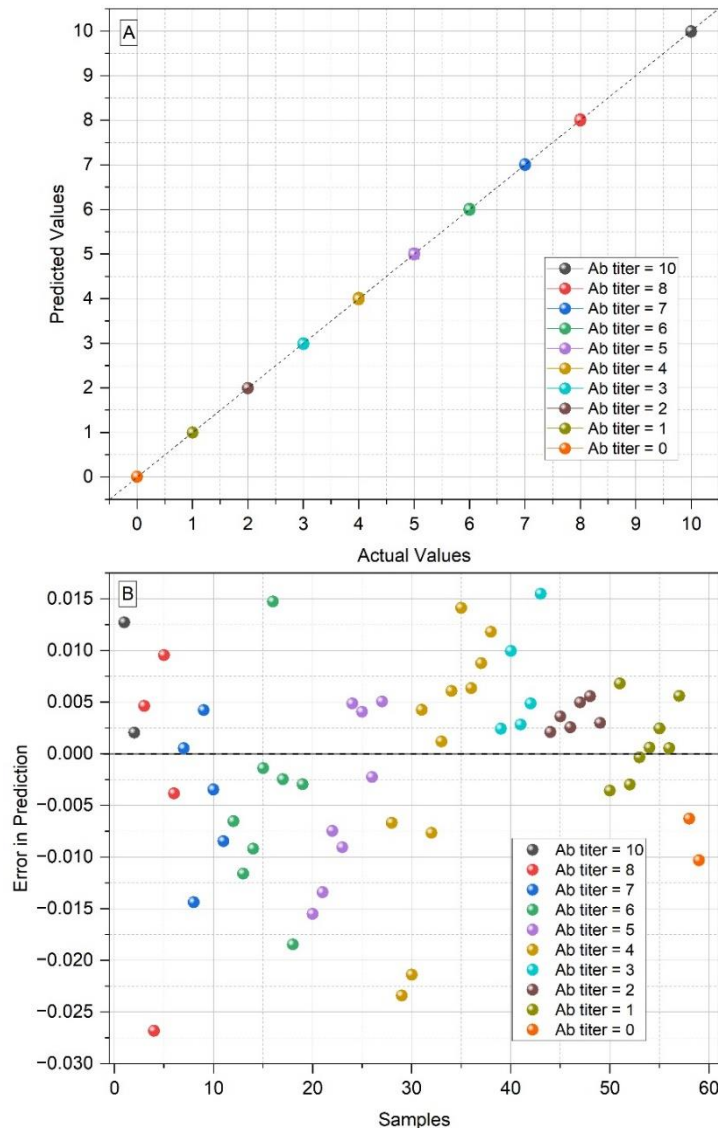


Figure 4. (A) Predicted values vs actual values of the antibody titers from the serum samples of patients with paracoccidioidomycosis, in the PLS prediction set with two latent variables (the points representing the samples are overlapped); (B) Errors in predicted values for each serum sample, in the PLS prediction set with two latent variables.

To the best of our knowledge, this was the first study to propose FTIR spectroscopy as an antibody titer prediction tool in serum. Reference values for antibody titers were highly correlated with the values predicted from FTIR spectra, with R^2 higher than 0.9999 in the PLS models. However, negative control samples from individuals without PCM were not included in the model. Thus, the model proposed here has no diagnostic validity, and the diagnosis must be previously performed using another method. As already shown by our research group, FTIR and multivariate calibration (specifically PLS-DA) can be used for PCM diagnosis, differentiating serum from these patients from healthy individuals and from patients with other

systemic mycoses [17]. Thus, one possibility would be to use FTIR for both approaches, i.e., the PLS-DA model for diagnosis and the PLS model for antibody titration.

However, it is important to highlight that this diagnostic limitation is already inherent to serological tests. According to the current guidelines for the clinical management of PCM, a case is only confirmed by the presence of two criteria together: clinical manifestations compatible with the disease and observation of *Paracoccidioides* sp. in clinical specimens (secretions, fluids, or lesion materials). In turn, a probable case presents clinical manifestations compatible with PCM and detection of serum antibodies, preferably through quantitative DID [28]. However, despite not confirming the diagnosis, antibody titration has other important uses, as it is useful for classifying the severity of PCM, in addition to being essential in monitoring the evolution of the disease during treatment and being used as a cure criterion [1].

It is important to note that DID, which is the most used technique for serodiagnosis and antibody titration, can take more than three days to be performed, in addition to involving the preparation and subsequent disposal of several reagents [29]. Furthermore, the most important limitation of serological methods for PCM is the need to use antigens and their lack of standardization. The most used antigen is the one produced from the standard B-339 strain of *P. brasiliensis*, whose main component is the 43-kDa glycoprotein (gp43) [30]. There is no standard protocol for its production, and the culture medium and incubation conditions, such as initial inoculum size, time, and temperature, vary depending on the laboratory [11]. Additionally, different laboratories use different techniques to produce antigens, such as sonic extracts or lyophilized filtrates, and for none of these there is an official standardization. Thus, standards can vary even in different batches produced in the same laboratory [31].

The antigen preparation method is directly related to the accuracy of serodiagnosis and antibody titration, and the lack of standardization leads to discordant results, also facilitating the occurrence of cross-reaction with other fungal diseases [1]. In addition, reproducibility is compromised. This has already been proven by a study that compared the results of immunodiffusion from six different Brazilian centers that are reference in the serological diagnosis of PCM. In that study, discordant results (antibody titers) were found in all centers, with an average of 20% of inconsistencies [16]. These differences are caused by the high variability in antigens, considering that each center uses its own antigen preparation. A review on PCM serology listed the lack of standardization in the antigens used as one of the most important issues to be studied [14], and the method proposed here can avoid this problem, as it rules out the need to use the gp43 antigen from B-339 strain.

Another issue in relation to antigens is the taxonomy of the genus *Paracoccidioides*, considered for 75 years to be formed by only *P. brasiliensis*. Now, the genus *Paracoccidioides* is divided into at least four phylogenetic species within the *P. brasiliensis* complex (*P. brasiliensis* sensu stricto, *P. americana*, *P. restrepiensis*, and *P. venezuelensis*), in addition to the species *P. lutzii* [32-34]. Recent studies have classified *P. americana* as a separate species of the *P. brasiliensis* complex, and have included in the genus *Paracoccidioides* two uncultivable species that cause lobomycosis (*P. ceti* and *P. lobogeorgii*) [35]. Furthermore, the high genetic diversity found in *Paracoccidioides* isolates suggests that there may be a greater number of lineages [36].

Based on proteomic studies, it is known that *P. lutzii* has a different antigenic composition than *P. brasiliensis* sensu stricto [37]. The region with the highest occurrence of *P. lutzii* is the Central-West region of Brazil, and it has already been found that sera from patients in this region do not always react with antigens produced from *P. brasiliensis* sensu stricto, generating false-negative results in immunodiffusion [38]. The species of the *P. brasiliensis* complex have similar protein profiles, and in these cases, there are no problems regarding the antigen used in the serodiagnosis, as already shown for *P. restrepiensis* and *P. americana*. Sera from patients infected with these species of *Paracoccidioides* react with antigens produced from *P. brasiliensis* cells [39,40]. As for *P. lutzii* infections, there is a need to develop and use specific antigens, produced by cells of this species [41,42]. The method proposed here is not able to avoid this problem, as the models were developed based on antigens from *P. brasiliensis* reference strain B-339. Thus, a future perspective is to develop a model with a reference method based on immunodiffusion using *P. lutzii* antigens.

5. Conclusions

Here, we developed a fast, reproducible, and highly accurate method to determine the antibody titers of patients with PCM. This new method replaces the need to use antigens, which is a problematic question in the serodiagnosis of PCM, due to the lack of standardization of antigen production. Additionally, the method replaces the traditional DID test, which can take several days to be performed. As limitations, we highlight the need to include negative control samples in the model. Furthermore, a model based on sera from patients infected with *P. lutzii* and antigens of this species should be developed, considering that the model based on *P. brasiliensis* cannot be transposed to this species. Despite these limitations, the method here proposed has potential to be transposed into clinical practice, and to be developed for other neglected fungal diseases.

Author Contributions: Conceptualization, A.K. and V.A.C.; methodology, A.K. and V.A.C.; software, A.K.; validation, P.C.M.; formal analysis, A.K.; investigation, A.K.; resources, B.A.S.P., R.S.C. and R.P.M.; data curation, B.A.S.P., R.S.C. and R.P.M.; writing-original draft preparation, A.K.; writing-review and editing, M.L.S. and V.A.C.; visualization, A.K. and P.C.M.; supervision, M.L.S. and V.A.C.; project administration, M.L.S. and V.A.C.; funding acquisition, M.L.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Projeto: Processo CNPq number 442448/2019-8 – Chamada Doenças Negligenciadas).

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to still being used for further studies.

Acknowledgments: None to declare.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Mendes, R.P.; Cavalcante, R.S.; Marques, S.A.; Marques, M.E.A.; Venturini, J.; Sylvestre, T.F.; Paniago, A.M.M.; Pereira, A.C.; Silva, J.F.; Fabro, A.T.; Bosco, S.M.G.; Bagagli, E.; Hahn, R.C.; Levorato, A.D. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. *Open Microbiol. J.* 2017, 11, 224-282. <https://doi.org/10.2174/1874285801711010224>
2. Martinez, R. New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology. *J. Fungi* 2017, 3, Article 1. <https://doi.org/10.3390/jof3010001>
3. Valle, A.C.F.; Macedo, P.M.; Almeida-Paes, R.; Romão, A.R.; Lazéra, M.S.; Wanke, B. Paracoccidioidomycosis after highway construction, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 2017, 23, 1917-1919. <https://doi.org/10.3201/eid2311.170934>
4. Krakhecke-Teixeira, A.G.; Yamauchi, D.H.; Rossi, A.; Sousa, H.R.; Garces, H.G.; Júnior, J.L.; Júnior, A.O.S.; Felipe, M.S.S.; Bagagli, E.; Andrade Jr, H.F.; Teixeira, M.M. Clinical and Eco-Epidemiological Aspects of a Novel Hyperendemic Area of

Paracoccidioidomycosis in the Tocantins-Araguaia Basin (Northern Brazil), Caused by Paracoccidioides sp. J. Fungi 2022, 8, Article 502. <https://doi.org/10.3390/jof8050502>

5. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action, World Health Organization, Geneva, 2022. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
6. Griffiths, J.; Colombo, A.L.; Denning, D.W. The case for paracoccidioidomycosis to be accepted as a neglected tropical (fungal) disease. PLoS Negl. Trop. Dis. 2019, 13, Article e0007195. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007195>
7. Prado, M.; Silva, M.B.; Laurenti, R.; Travassos, L.R.; Taborda, C.P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2009, 104, 513-521. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000300019>
8. Bittencourt, J.I.M.; Oliveira, R.M.; Coutinho, Z.F. Paracoccidioidomycosis mortality in the State of Paraná, Brazil, 1980/1998. Cad. Saúde Pública 2005, 21, 1856-1864. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2005000600035>
9. Bagagli, E.; Matute, D.R.; Garces, G.; Tenório, B.G.; Garces, A.G.; Alves, L.G.B.; Yamauchi, D.H.; Hrycyk, M.F.; Barker, B.M.; Teixeira, M.M. *Paracoccidioides brasiliensis* Isolated from Nine-Banded Armadillos (*Dasypus novemcinctus*) Reveal Population Structure and Admixture in the Amazon Basin. J. Fungi 2021, 7, Article 54. <https://doi.org/10.3390/jof7010054>
10. Peçanha, P.M.; Peçanha-Pietrobon, P.M.; Grão-Velloso, T.R.; Júnior, M.R.; Falqueto, A.; Gonçalves, S.S. Paracoccidioidomycosis: What We Know and What Is New in Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. J. Fungi 2022, 8, Article 1098. <https://doi.org/10.3390/jof8101098>
11. Hahn, R.C.; Hagen, F.; Mendes, R.P.; Burger, E.; Nery, A.F.; Siqueira, N.P.; Guevara, A.; Rodrigues, A.M.; Camargo, Z.P. Paracoccidioidomycosis: Current Status and Future Trends. Clin. Microbiol. Rev. 2022, 35, Article e00233-21. <https://doi.org/10.1128/cmr.00233-21>
12. Giacomazzi, J.; Baethgen, L.; Carneiro, L.C.; Millington, M.A.; Denning, D.W.; Colombo, A.L.; Pasqualotto, A.C. The burden of serious human fungal infections in Brazil. Mycoses 2016, 59, 145-150. <https://doi.org/10.1111/myc.12427>
13. Santos, A.R.; Dionizio, A.; Fernandes, M.S.; Buzalaf, M.A.R.; Pereira, B.; Donanzam, D.F.A.; Ribeiro, S.M.; Paniago, A.M.M., Cavalcante, R.S.; Mendes, R.P., Venturini, J. Proteomic analysis of serum samples of paracoccidioidomycosis patients with severe

pulmonary sequel. PLoS Negl. Trop. Dis. 2021, 15, Article e0009714. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009714>

14. Silva, J.F.; Oliveira, H.C.; Marcos, C.M.; Assato, P.A.; Fusco-Almeida, A.M.; Mendes-Giannini, M.J.S. Advances and challenges in paracoccidioidomycosis serology caused by *Paracoccidioides* species complex: an update. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 2016, 84, 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.06.004>

15. Shikanai-Yasuda, M.A.; Mendes, R.P.; Colombo, A.L.; Queiroz-Telles, F.; Kono, A.S.G.; Paniago, A.M.M.; Nathan, A.; Valle, A.C.F.; Bagagli, E.; Benard, G.; Ferreira, M.S.; Teixeira, M.M.; Silva-Vegara, M.L.; Pereira, R.M.; Cavalcante, R.S.; Hahn, R.; Durlacher, R.R.; Khoury, Z.; Camargo, Z.P.; Moretti, M.L.; Martinez, R. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2017, 50, 715-740. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0230-2017>

16. Vidal, M.S.M.; Del Negro, G.M.B.; Vicentini, A.P.; Svidzinski, T.I.E.; Mendes-Giannini, M.J.; Almeida, A.M.F.; Martinez, R.; Camargo, Z.P.; Taborda, C.P.; Benard, G. Serological Diagnosis of Paracoccidioidomycosis: High Rate of Inter-laboratorial Variability among Medical Mycology Reference Centers. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014, 8, Article e3174. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003174>

17. Koehler, A.; Scroferneker, M.L.; Pereira, B.A.S.; Souza, N.M.P.; Cavalcante, R.S.; Mendes, R.P.; Corbellini, V.A. Using infrared spectroscopy of serum and chemometrics for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2022, 221, Article 115021. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.115021>

18. Balan, V.; Mihai, C.T.; Cojocaru, F.D.; Uritu, C.M.; Dodi, G.; Botezat, D.; Gardikiotis, I. Vibrational Spectroscopy Fingerprinting in Medicine: from Molecular to Clinical Practice. *Materials* 2019, 12, Article 2884. <https://doi.org/10.3390/ma12182884>

19. Camargo, Z.P.; Berzaghi, R.; Amaral, C.C.; Silva, S.H.M. Simplified method for producing *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for use in immunodiffusion tests. *Med. Mycol.* 2003, 41, 539-542. <https://doi.org/10.1080/13693780310001615358>

20. Trevisan, J.; Angelov, P.P.; Carmichael, P.L.; Scott, A.D.; Martin, F.L. Extracting biological information with computational analysis of Fourier transform infrared (FTIR) biospectroscopy datasets: current practices to future perspectives. *Analyst* 2012, 137, 3202-3215. <https://doi.org/10.1039/c2an16300d>

21. ASTM – American Society for Testing and Materials. Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis, ASTM International E1655–17. West Conshohocken, Pennsylvania, USA, 2017.

22. Barth, A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 2007, 1767, 1073-1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.06.004>
23. Petibois, C.; Cazorla, G.; Cassaigne, A.; Déléris, G. Plasma protein contents determined by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Clin. Chem.* 2001, 47, 730-738. <https://doi.org/10.1093/clinchem/47.4.730>
24. Butler, H.J.; Smith, B.R.; Fritsch, R.; Radhakrishnan, P.; Palmer, D.S.; Baker, M.J. Optimized spectral pre-processing for discrimination of biofluids via ATR-FTIR spectroscopy. *Analyst* 2018, 143, 6121-6134. <https://doi.org/10.1039/c8an01384e>
25. Wold, S.; Antti, H.; Lindgren, F.; Öhman, J. Orthogonal signal correction of near-infrared spectra. *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 1998, 44, 175-185. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(98\)00109-9](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(98)00109-9)
26. Heidrich, D.; Koehler, A.; Ramírez-Castrillón, M.; Pagani, D.M.; Ferrão, M.F.; Scroferneker, M.L.; Corbellini, V.A. Rapid classification of chromoblastomycosis agents genera by infrared spectroscopy and chemometrics supervised by sequencing of rDNA regions. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2021, 254, Article e119647. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119647>
27. Koehler, A.; Corbellini, V.A.; Heidrich, D.; Scroferneker, M.L. Prediction of itraconazol minimum inhibitory concentration for *Fonsecaea pedrosoi* using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and chemometrics. *PloS One* 2020, 15, Article e0243231. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243231>
28. Shikanai-Yasuda, M.A.; Mendes, R.P.; Colombo, A.L.; Queiroz-Telles, F.; Kono, A.S.G.; Paniago, A.M.M.; Nathan, A.; Valle, A.C.F.; Bagagli, E.; Benard, G.; Ferreira, M.S.; Teixeira, M.M.; Silva-Vergara, M.L.; Pereira, R.M.; Cavalcante, R.S.; Hahn, R.; Durlacher, R.R.; Khoury, Z.; Camargo, Z.P.; Moretti, M.L.; Martinez, R. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2017, 50, 715-740. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0230-2017>
29. Camargo, Z.P.; Unterkircher, C.; Campoy, S.P.; Travassos, L.R. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* Exoantigens for Immunodiffusion Tests. *J. Clin. Microbiol.* 1988, 26, 2147-2151. <https://doi.org/10.1128/jcm.26.10.2147-2151.1988>
30. Puccia, R.; Schenkman, S.; Gorin, P.A.J.; Travassos, L.R. Exocellular Components of *Paracoccidioides brasiliensis*: Identification of a Specific Antigen. *Infect. Immun.* 1986, 53, 199-206. <https://doi.org/10.1128/iai.53.1.199-206.1986>
31. Camargo, Z.P. Serology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 2008, 165, 289-302. <https://doi.org/10.1007/s11046-007-9060-5>

32. Rodrigues, A.M.; Hagen, F.; Puccia, R.; Hahn, R.C.; Camargo, Z.P. *Paracoccidioides* and Paracoccidioidomycosis in the 21st Century. *Mycopathologia* 2023, 188, 129-133. <https://doi.org/10.1007/s11046-022-00704-y>
33. Turissini, D.A.; Gomez, O.M.; Teixeira, M.M.; McEwen, J.G.; Matute, D.R. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. *Fungal Genet. Biol.* 2017, 106, 9-25. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.05.007>
34. Teixeira, M.M.; Theodoro, R.C.; Carvalho, M.J.A.; Fernandes, L.; Paes, H.C.; Hahn, R.C.; Mendoza, L.; Bagagli, E.; San-Blas, G.; Felipe, M.S.S. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2009, 52, 273-283. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.04.005>
35. Vilela, R.; de Hoog, S.; Bensch, K.; Bagagli, E.; Mendoza, L. A taxonomic review of the genus *Paracoccidioides*, with focus on the uncultivable species. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2023, 17, Article e0011220. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011220>
36. Ricci, G.; Campanini, E.B.; Nishikaku, A.S.; Puccia, R.; Marques, M.; Bialek, R.; Rodrigues, A.M.; Batista, W.L. PbGP43 Genotyping Using Paraffin-Embedded Biopsies of Human Paracoccidioidomycosis Reveals a Genetically Distinct Lineage in the *Paracoccidioides brasiliensis* Complex. *Mycopathologia* 2022, 187, 157-168. <https://doi.org/10.1007/s11046-021-00608-3>
37. Júnior, L.P.Q.; Camargo, Z.P.; Tadano, T.; Rodrigues, A.M.; Takahara, D.T.; Gegembauer, G.; Araujo, L.M.; Hahn, R.C. Serological and antigenic profiles of clinical isolates of *Paracoccidioides* spp. from Central Western Brazil. *Mycoses* 2014, 57, 466-472. <https://doi.org/10.1111/myc.12183>
38. Gegembauer, G.; Araujo, L.M.; Pereira, E.F.; Rodrigues, A.M.; Paniago, A.M.M.; Hahn, R.C.; Camargo, Z.P. Serology of Paracoccidioidomycosis Due to *Paracoccidioides lutzii*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014, Article e2986. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002986>
39. Mattos, K.; Cocio, T.A.; Chaves, E.G.A.; Borges, C.L.; Venturini, J.; Carvalho, L.R.; Mendes, R.P.; Paniago, A.M.M.; Weber, S.S. An update on the occurrence of *Paracoccidioides* species in the Midwest region, Brazil: Molecular epidemiology, clinical aspects, and serological profile of patients from Mato Grosso do Sul State. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2021, 15, Article e0009317. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009317>
40. Macedo, P.M.; Teixeira, M.M.; Barker, B.M.; Zancopé-Oliveira, R.M.; Almeida-Paes, R.; Valle, A.C.F. Clinical features and genetic background of the sympatric species *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides americana*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2019, 13, Article e0007309. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007309>

41. Rodrigues, A.M.; Kubitschek-Barreira, P.H.; Pinheiro, B.G.; Teixeira-Ferreira, R.; Hahn, R.C; Camargo, Z.P. Immunoproteomic Analysis Reveals Novel Candidate Antigens for the Diagnosis of Paracoccidioidomycosis Due to *Paracoccidioides lutzii*. J. Fungi 2020, 6, Article 357. <https://doi.org/10.3390/jof6040357>
42. Grossklaus, D.A.; Takahara, D.T.; Kruger, C.S.; Gonzaga, A.M.; Camargo, Z.P.; Nery, A.F.; Almeida, H.L.; Hahn, R.C. Profile of exoantigens from clinical isolates of *Paracoccidioides lutzii* in Mato Grosso, Brazil. Rev. Patol. Trop. 2016, 45, 265-272. <https://doi.org/10.5216/rpt.v45i3.43514>

ARTIGO 3: Rapid classification of serum from patients with paracoccidioidomycosis using infrared spectroscopy, univariate statistics, and linear discriminant analysis (LDA)

Data de publicação: 12/02/2024

Revista: *Journal of Fungi*

DOI: 10.3390/jof10020147

Alessandra Koehler^a, Maria Lúcia Scroferneker^{a,b}, Nikolas Mateus Pereira de Souza^c, Paulo Cezar de Moraes^a, Beatriz Aparecida Soares Pereira^d, Ricardo de Souza Cavalcante^d, Rinaldo Pôncio Mendes^d and Valeriano Antonio Corbellini^{*e}

^a Postgraduate Program of Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, CEP 90035-003, Brazil;

^b Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, CEP 90050-170, Brazil;

^c Department of Life Sciences, Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC, Santa Cruz do Sul, CEP 96815-900, Brazil;

^d Tropical Diseases Area, School of Medicine, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, CEP 18618-687, Brazil;

^e Department of Sciences, Humanities and Education, Postgraduate Program in Health Promotion, Post-graduate Program in Environmental Technology, Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC, Santa Cruz do Sul, CEP 96815-900, Brazil.

*Correspondence: author: Tel. +5551 37177390; e-mail valer@unisc.br

Abstract: Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis that is diagnosed by visualizing the fungus in clinical samples or by other methods, like serological techniques. However, all PCM diagnostic methods have limitations. The aim of this study was to develop a diagnostic tool for PCM based on Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. Two hundred and twenty-four serum samples were included: 132 from PCM patients and 92 constituting the control group (50 from healthy blood donors and 42 from patients with other systemic mycoses). Samples were analyzed by attenuated total reflection (ATR) and a *t*-test was performed to find differences in the spectra of the two groups. The wavenumbers that had $p < 0.05$ had their diagnostic potential evaluated using Receiver Operating Characteristic (ROC) curves. The spectral region with the lowest *p* values was used for variable selection through

principal component analysis (PCA). The selected variables were used in the linear discriminant analysis (LDA). In univariate analysis, the ROC curves with the best performance were obtained in the region 1551-1095 cm^{-1} . The wavenumber that had the highest AUC value was 1264 cm^{-1} , achieving sensitivity of 97.73%, specificity of 76.01%, and accuracy of 94.22%. Total separation of groups was obtained in the PCA performed with the spectral range of 1551-1095 cm^{-1} . LDA performed with the eight wavenumbers with the greatest weight in group discrimination in PCA obtained 100% accuracy. The methodology proposed here is simple, fast, and highly accurate, proving its potential to be applied in the diagnosis of PCM. The proposed method is more accurate than the currently known diagnostic methods, which is particularly relevant for a neglected tropical mycosis such as paracoccidioidomycosis.

Keywords: paracoccidioidomycosis; Fourier transform infrared spectroscopy; photodiagnosis; ROC curve; linear discriminant analysis; systemic mycosis

1. Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic granulomatous mycosis caused by thermophilic fungi of the genus *Paracoccidioides*. PCM is endemic in Latin America, from Mexico to Argentina. Approximately 80% of cases occur in Brazil, which has areas of high endemicity in the Southeast, South, and Center-West regions, with progression to the North region [1,2]. For many years, it was considered that the genus *Paracoccidioides* was composed of just one species, *P. brasiliensis*. However, with the advent of molecular techniques, it became clear that the genetic diversity of the genus was much greater than initially speculated. Therefore, it is currently considered that there are at least five species of the genus *Paracoccidioides* that can cause PCM: *P. brasiliensis*, *P. lutzii*, *P. restrepiensis*, *P. venezuelensis* and *P. americana* [3,4]. *P. brasiliensis* is the most widely distributed species on the South American continent, followed by *P. lutzii* and *P. americana*. *P. restrepiensis* and *P. venezuelensis* have a more restricted distribution, mainly in Colombia and Venezuela, respectively, with some scattered cases in Argentina, Brazil, Peru, and Uruguay [5].

These fungi grow saprophytically as mycelium in the soil; however, due to the difficulty of isolation from nature, its habitat is little known. The infection is acquired by inhaling fungal propagules present in the bioaerosol, which pass through the respiratory tract and reach the lungs, one of the main organs affected in PCM. If the immune response is insufficient, the fungus proliferates and spreads to other organs in the body via the lymphatic system and

haematogenous route. Other areas of the body commonly affected are the mucous membranes of the upper aerodigestive tract, the skin, and the adrenal glands [1,2].

The diagnosis and adequate treatment of PCM are essential, as it is highly related to several sequelae. It is estimated that at least 60% of the patients with the chronic form of PCM will develop pulmonary fibrosis, the main sequela related to PCM [6]. The “gold standard” for PCM diagnosis is the visualization of the fungus in clinical samples, especially through direct examination by microscopy [7]. Other possibilities are through biopsy and histopathology and/or isolation and cultivation of the fungus from clinical samples. However, these methods of conventional microbiological diagnosis from clinical samples may present low sensitivity and be time consuming, in addition to the frequent difficulty in obtaining samples [8]. Another possibility is the serological diagnostics, performed mainly with the double immunodiffusion (DID) technique. However, the lack of standardization of the technique and of the preparation of the antigens leads to discordant results. Furthermore, it is known that different species of the genus *Paracoccidioides* have different antigenic profiles; however, most tests are performed with *P. brasiliensis* antigens, which can lead to a considerable number of false negative results [9,10]. Last but not least, there is the possibility of cross-reaction with other systemic mycoses such as histoplasmosis, aspergillosis and cryptococcosis, with false-positive results for PCM [11]. This risk can be minimized, but not excluded, with the standardization of antigens used in tests [1].

Therefore, there is a need to develop new diagnostic methods, with emphasis on some technologies, such as Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). MALDI-TOF has a wide possibility of use in infectious diseases, with use for identifying different species of bacteria and fungi [12]. For PCM, MALDI-TOF has already been successfully used to differentiate the species *P. brasiliensis* and *P. lutzii* [13]. In addition to MALDI-TOF, FTIR has gained prominence in medicine for the diagnosis of several diseases. This technique provides qualitative and quantitative information on compounds present in a sample, through the interaction of infrared radiation with the chemical bonds present in these compounds. In this way, a spectrum is generated that contains the fingerprint of the sample [14]. To validate FTIR data as a diagnostic tool, complex tools based on multivariate statistics (chemometrics) are mostly used, with the use of supervised classification methods [15]. FTIR has already been used for PCM diagnosis using the machine learning algorithms discriminant analysis (DA), k-nearest neighbor (KNN), support vector machine (SVM) [16], and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) [17].

Here, we are proposing the use of FTIR spectroscopy, univariate statistics and linear discriminant analysis (LDA), to differentiate serum from patients with PCM from healthy individuals and patients with other systemic mycoses in the same model. The main advantage in relation to other studies that have already used FTIR to diagnose PCM is the careful selection of variables for multivariate modelling, developing a more robust model and showing its potential as a rapid diagnostic tool for PCM.

2. Materials & Methods

2.1. Serum Samples

A total of 224 retrospective serum samples from a repository at the School of Medicine of Botucatu, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), were analyzed. Of these, 132 samples were from patients with paracoccidioidomycosis treated at the Infectious Diseases Service of the School of Medicine of Botucatu (UNESP), from the Botucatu region, São Paulo, Brazil. The cases were confirmed and diagnosed by clinical suspicion followed by visualization of the fungus of the genus *Paracoccidioides* in clinical samples, by direct mycological examination and/or culture and/or histopathology and/or cytopathology by cyto-inclusion [1]. These 132 samples constituted the group called PCM.

The other 92 serum samples consisted of the control group: 50 from healthy blood donors without PCM suspicion, at the Botucatu Blood Center, from the same region of origin of the PCM patients; 24 from patients with aspergillosis; 10 from patients with cryptococcosis; and 8 from patients with histoplasmosis. These other systemic mycoses can be confused with PCM in diagnostic tests using serum, which justifies the importance of their inclusion in the study in the control group.

The study was approved by the ethics committees of the universities participating in the study (CAAE 37684720.2.1001.5343).

2.2. FTIR/ATR Analysis

Serum samples were analyzed in triplicate by attenuated total reflection (ATR) on Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR (Perkin Elmer) spectrometer, coupled to standard Universal ATR Sampling Accessory (UATR, Perkin-Elmer Inc.; Registration number L1250050). Triplicates of 1 μL of each sample were deposited on the crystal of the instrument and dehydrated in airstream (60-65 $^{\circ}\text{C}$) for one minute. The acquisition range was from 4000 to 650 cm^{-1} using the spectral resolution of 4 cm^{-1} and 8 scans. Between the spectral acquisitions of each of the

serum samples and their triplicates, a blank acquisition was performed under the same conditions.

2.3. Statistical Analysis

For univariate analyzes, the average spectrum of each serum sample was obtained after vector normalization of the replicates in a Microsoft Excel spreadsheet (2019). The analyzes were conducted in the software OriginPro 2018 (OriginLab, Northampton, MA, USA).

Initially, a *t*-test with a significance level of 0.05 was performed between the PCM group and the control group, to determine which wavenumbers differentiate the serum of patients with PCM from the other serum samples [18]. To verify its diagnostic potential, Receiver Operating Characteristic (ROC) curves were performed with all wavenumbers, individually, in the segments of the spectra that presented $p < 0.05$ in the *t*-test. The ROC curves with the best performance were chosen by analyzing the values of the area under the curve (AUC). The optimal cut-points of the chosen ROC curve were determined according to the Youden index (J) [19], and the sensitivity and specificity parameters were determined considering these cut-points.

For multivariate analyses, the average spectrum of each serum sample was obtained after the application of 1st derivative (5-points) followed by vector normalization [15]. The analyzes were conducted in the software The Unscrambler® X 10.4 (Camo Analytics, Bedford, MA, USA).

Initially, a principal component analysis (PCA) with mean-centering was performed, to reduce data dimensionality and select variables. For PCA, instead of using the full spectrum, the spectral range of 1551-1095 cm^{-1} was used, which was selected in the univariate analysis because it presented the highest AUC values in the ROC curve analysis. There-fore, PCA was used as a second step in variable selection. The wavenumbers that best discriminated the groups (PCM and control) in the PCA loadings were selected for the development of a classification model based on linear discriminant analysis (LDA). For LDA, the total dataset (N=224) was systematically divided into a 1:1 ratio into a training set and prediction set, resulting in 112 serum samples in each set. The performance of the LDA model for diagnosing PCM was evaluated by parameters of sensitivity, specificity, and accuracy, obtained through classification of the samples from the prediction set.

3. Results

The average spectra of the serum samples from the patients with PCM and the control group are shown in Figure 1. The main regions of the spectrum are related to proteins and lipids, and the main bands are amide I and amide II, at approximately 1652 cm^{-1} and 1543 cm^{-1} , respectively [20].

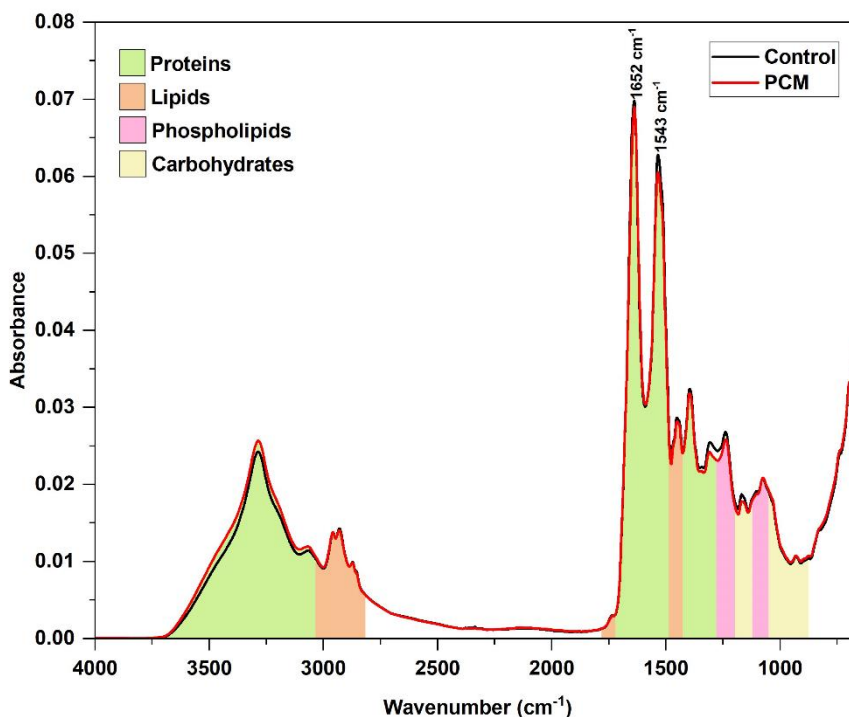


Figure 1. Average Fourier transform infrared (FTIR)/attenuated total reflection (ATR) spectra of serum from the 92 samples of the control group and from the 132 samples of the paracoccidioidomycosis (PCM) group. Averaging from each group was obtained calculating the arithmetic mean of absorption for each frequency of the three vector normalized spectra from each sample, followed by the arithmetic mean of all the samples from the group. The colours represent broad examples of blood serum constituents, based in Gray et al. (2018) [21]; are not necessarily the only components that show absorption in that region of the spectrum.

Several wavenumbers of the spectrum had statistically significant differences ($p < 0.05$) in terms of absorbance in the two groups analyzed (Figure 2A). The main regions, with the lowest p values, were $3700\text{-}2965\text{ cm}^{-1}$, mainly related to proteins, and $1551\text{-}1095\text{ cm}^{-1}$, mainly related to proteins, lipids, and phospholipids (Figure 2B and Figure 2C, respectively).

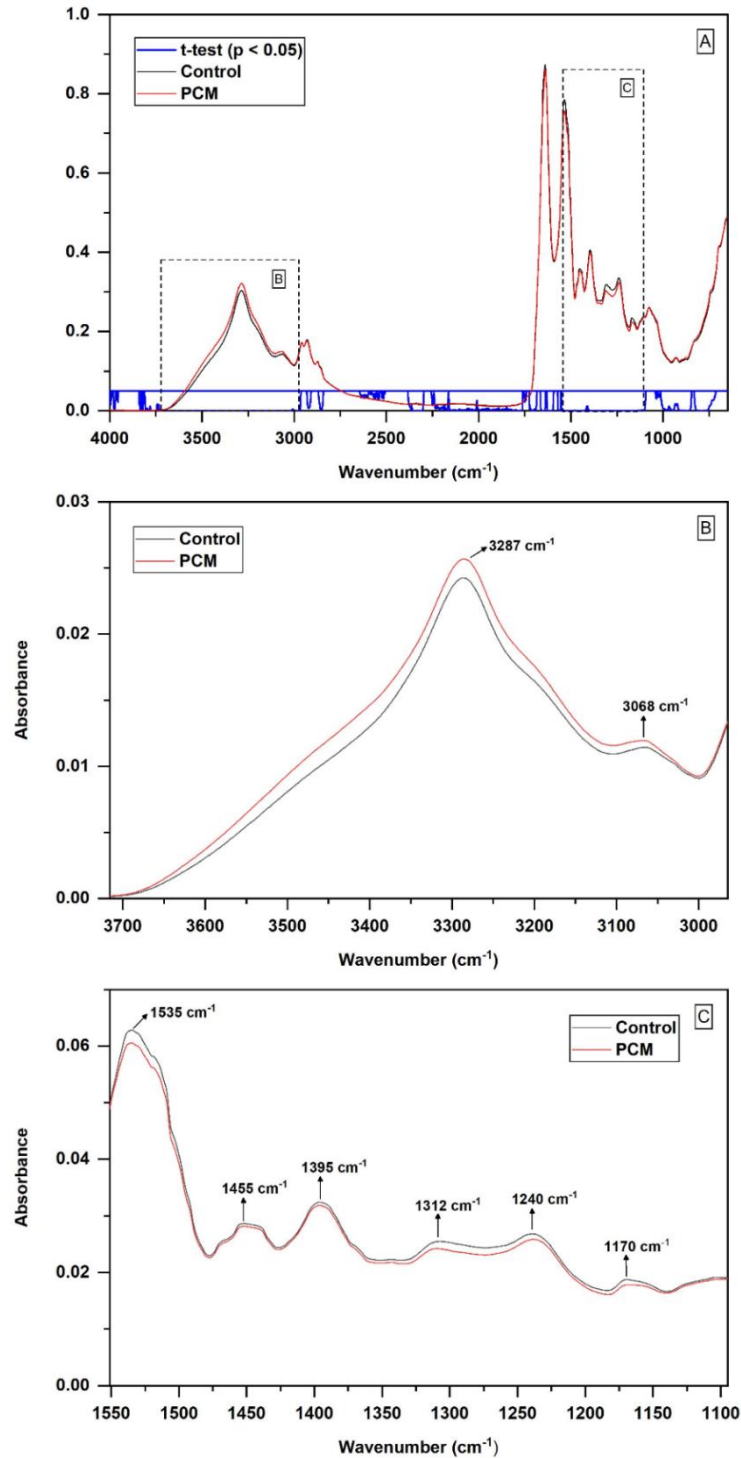


Figure 2. *t*-test performed between the averages of the spectra of 92 serum samples of the control group and the 132 serum samples of the paracoccidioidomycosis (PCM) group, showing the main differences between the groups. Averaging from each group was obtained calculating the arithmetic mean of absorption for each frequency of the three vector normalized spectra from each sample, followed by the arithmetic mean of all the samples from the group. (A) Spectrum regions that had $p < 0.05$ in the *t*-test; (B) 3700-2965 cm⁻¹ region enlarged, showing

the differences between the two groups and the main bands found; (C) 1551-1095 cm^{-1} region enlarged, showing the differences between the two groups and the main bands found.

The diagnostic potential of the wavenumbers with $p < 0.05$ was evaluated using the ROC curve. This curve is a graphical plot of the sensitivity versus the (1-)specificity, determining several possible cut-points for the test. AUC is equivalent to test accuracy; the closer to 1, the greater the accuracy. From the ROC curve, it is possible to determine a cut-point that maximizes the accuracy of the diagnostic test [22]. The ROC curves with the best performance were obtained in some wavenumbers in the region from 1551 to 1095 cm^{-1} . All other spectral regions, even with $p < 0.05$ in the t -test (Figure 2A), had low AUC values, indicating that they do not have a good diagnostic potential for PCM (Table 1).

Table 1. Area under the curve (AUC) obtained in the ROC curves developed with all wavenumbers, individually, which had $p < 0.05$ in the t -test, comparing the spectra of the 92 serum samples from the control group and the 132 samples from the paracoccidioidomycosis (PCM) group. The control group is composed by serum from 50 healthy blood donors, 24 patients with aspergillosis, 10 patients with cryptococcosis, and 8 patients with histoplasmosis. Represented in spectrum ranges and AUC ranges for better data visualization.

Interval (cm^{-1})	AUC – ROC curve (range)
3813 – 2965	0.11512 – 0.47785
2932 – 2908	0.62459 – 0.65514
2869 – 2843	0.65201 – 0.68248
1752 – 1742	0.60713 – 0.62731
1726 – 1686	0.35787 – 0.48271
1664 – 1638	0.61421 – 0.73814
1630 – 1594	0.21665 – 0.50091
1571 – 1556	0.31308 – 0.48295
1551 – 1095	0.57617 – 0.94219
1041 – 1032	0.39295 – 0.40110
1027 – 846	0.29076 – 0.37039
830 – 715	0.32633 – 0.37788

Abbreviations: AUC – area under the curve; ROC – receiver operating characteristic.

Among the region of 1551-1095 cm^{-1} , the wavenumber that had the highest AUC value was 1264 cm^{-1} , with an AUC of 0.94219 and $p < 0.0001$. The optimal cut-point was defined at ≤ 0.02433 , resulting in a sensitivity of 97.73%, specificity of 76.01%, and accuracy of 94.22% (Figure 3).

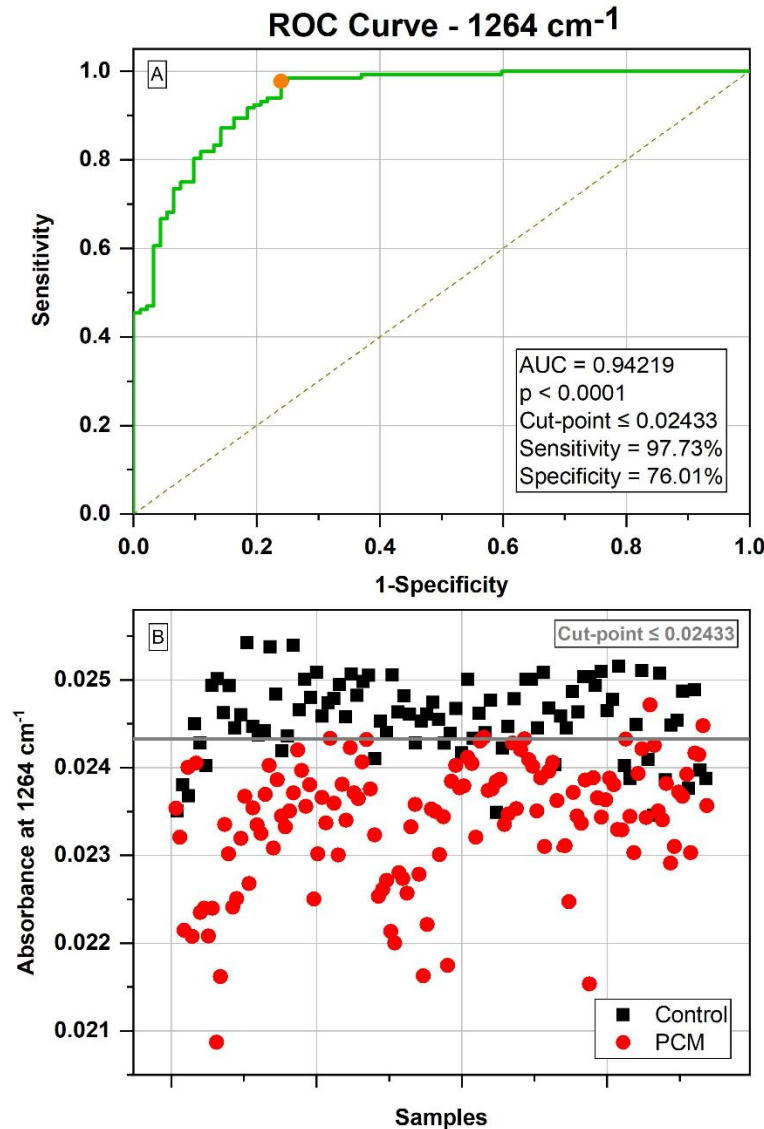


Figure 3. Potential of the wavenumber 1264 cm^{-1} in differentiating the spectra of the serum samples from the control group (92 samples) and the serum samples from the paracoccidioidomycosis (PCM) group (132 samples). (A) Receiver operating characteristic (ROC) curve developed considering the wavenumber of 1264 cm^{-1} , with its respective parameters, including the area under the curve (AUC); the dot represents the selected cut-point, defined based on the Youden index (J); (B) Classification of samples from the control group ($n = 92$) and from the paracoccidioidomycosis (PCM) group ($n = 132$), considering a cut-point ≤ 0.02433 .

In the multivariate analysis, total separation of groups was obtained in the PCA performed with the spectral range of 1551-1095 cm^{-1} (Figure 4A). PC1 and PC2 represented 99% of the variance of the original data, with PC1 alone representing 97% of the variance, due to the high correlation of the original variables in the spectral range used. PC1 was responsible for separating the groups, and the variables with the greatest weight in group discrimination were 1490, 1491, 1497, and 1498 cm^{-1} for PCM and 1405, 1406, 1407, and 1488 cm^{-1} for the control group (Figure 4B).

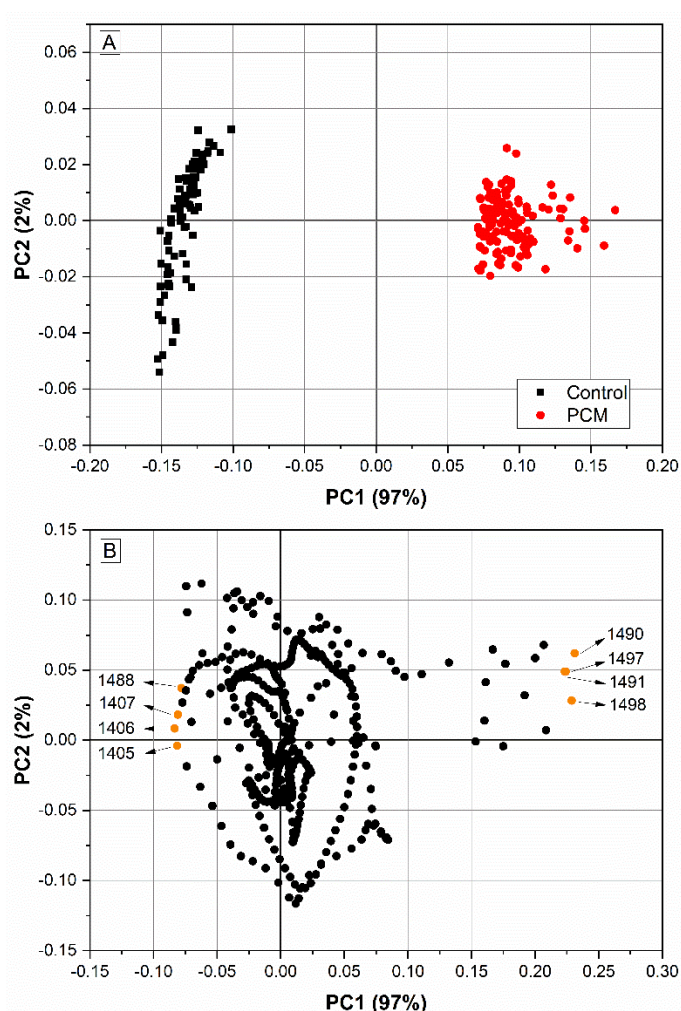


Figure 4. Principal Component Analysis (PCA) of the region 1551-1095 cm^{-1} , performed with the spectra of the 92 serum samples of the control group and the 132 serum samples of the paracoccidioidomycosis (PCM) group. The control group is composed by serum from 50 healthy blood donors, 24 patients with aspergillosis, 10 patients with cryptococcosis, and 8 patients with histoplasmosis. This region was chosen because it was the interval with the largest area under the curve (AUC) to discriminate between PCM and control group. (A) Scores (PC1

x PC2) with 99% explained variance. **(B)** Loadings (PC1 x PC2) indicating the variables with the greatest weight in group discrimination. The four wavenumbers (cm^{-1}) most associated with control and the four most associated with PCM are highlighted.

Linear discriminant analysis (LDA), performed with the eight wavenumbers with the greatest weight in group discrimination in PCA, obtained 100% sensitivity, specificity, and accuracy, both in the training set and in the prediction set (Figure 5A and B).

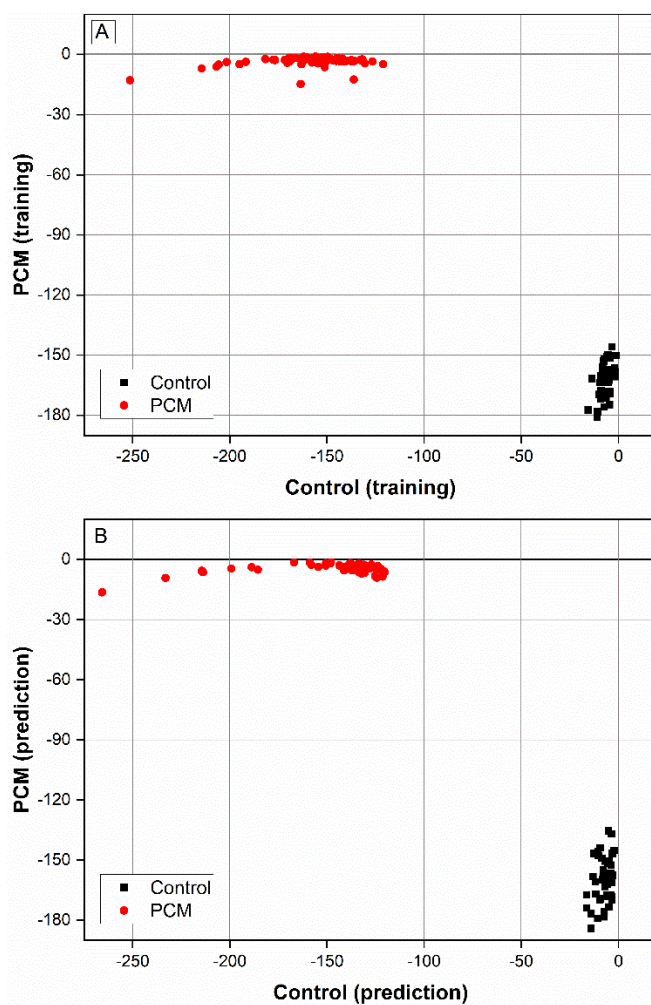


Figure 5. Linear Discriminant Analysis (LDA) to discriminate between the spectra of the 92 serum samples of the control group and the 132 serum samples of the paracoccidioidomycosis (PCM) group. The model was constructed using the 8 wavenumbers with the highest loadings in the Principal Component Analysis (PCA) (1405, 1406, 1407, 1488, 1490, 1491, 1497, and 1498 cm^{-1}) and obtained 100% accuracy both in training set **(A)** and in prediction set **(B)**.

4. Discussion

The sensitivity and specificity parameters of routine PCM diagnostic methods vary significantly, depending mainly on the clinical sample used. In addition, these parameters are little discussed in the literature. An evaluation of routine diagnostic methods in a university hospital over 34 years showed that the direct mycological examination has a sensitivity ranging from 63% (from sputum) to 82.6% (from skin and mucous membrane samples). Histopathology reached a sensitivity of 96.7%; however, for none of the methods the specificity was discussed. Serological methods had better performance, with 90% sensitivity and 100% specificity [23]. However, the lack of standardization is a serious problem in the serological diagnosis of PCM, leading to discordant results that can even affect the patient's treatment [24]. In addition, there is the possibility of cross-reaction with serum from patients with other mycoses, which may eventually reduce the specificity of the test [25].

Thus, the importance of developing new diagnostic methods for PCM is highlighted, even for being considered a neglected tropical disease [26]. FTIR spectroscopy is a promising methodology, due to its ease of use, cost-effectiveness, and speed of analysis for a variety of clinical samples, with emphasis on serum [27]. In the present study, we proposed two methods using FTIR spectroscopy and serum for the diagnosis of PCM: one based on univariate analysis, with 94% accuracy; and another based on multivariate analysis, with 100% accuracy.

This was the first study to propose the use of FTIR and univariate analysis for the diagnosis of PCM, considering specific vibrational modes in the serum that differentiate these patients from healthy individuals and from patients with other systemic mycoses. The association of FTIR spectra with univariate analysis, to determine vibrational modes capable of being used as diagnostic tools, has been little explored in the literature. Studies were found using this type of analysis for the diagnosis of breast cancer in saliva, obtaining accuracy that ranged from 77% to 83.5% [28]; for diagnosis and monitoring of diabetes mellitus in nail clippings, obtaining accuracy of 92% [29]; for monitoring diabetes mellitus during treatment with insulin, in saliva, obtaining accuracy of 98.8% [30]; and for the diagnosis of chronic kidney disease (CKD) in saliva, obtaining accuracy of 82% [31]. These studies demonstrate that univariate analyses of FTIR spectra are simple and fast methods that can achieve high levels of accuracy.

We confirmed the diagnostic potential of the wavenumber 1264 cm^{-1} from a ROC curve, which graphically demonstrated the rate of true positives (sensitivity) versus the rate of false positives (1-specificity) (Figure 3) [22]. For each absorbance value at this wavenumber, sensitivity and specificity are shown graphically on the ROC curve considering the objective of

the analysis (in the case of the present study, differentiating PCM samples from samples from the control group). The goal is to find a value that maximizes the true positive rate while minimizing the false positive rate. Therefore, the objective is to find the value that best differentiates the samples and, consequently, maximizes accuracy (represented in the ROC curve by the area under the curve – AUC). The point that maximizes accuracy is calculated by the Youden Index [22], which determines, therefore, the ideal cutoff point to, in the case of the present study, classify the samples into each of the groups (PCM and controls).

However, univariate analysis has limitations, as it is subject to experimental variations and does not consider the dependencies between wavenumbers, which makes the model less robust [18]. In addition, despite having shown high sensitivity, greater than 97%, the specificity was lower, 76%. High sensitivity is an optimal feature for screening tests, while high specificity is an optimal feature for confirmatory testing [22]. Considering that the diagnosis of PCM is usually initiated by the identification of clinical symptoms, and that these symptoms can be confused with other diseases [1,7], specificity is also important. Thus, we also proposed a diagnostic method based on multivariate analysis, which considers multiple variables for the outcome of interest [32]. We used LDA, which is a powerful methodology to do class separation [18].

For LDA, the number of variables cannot be greater than the number of samples. Thus, it is often used together with some method of dimensionality reduction and variable selection, such as PCA [33]. Here, we started the analysis with univariate statistics and, based on it, selected a relevant spectral region for performing PCA. Thus, PCA showed high variance (97% in PC1) and we achieved a complete separation of the groups. This allowed, instead of using the PC1 and PC2 scores, to select in the PC1 loadings the most relevant wavenumbers to be used in LDA. As an advantage, the variables are already selected and it is not always necessary to perform a PCA before applying LDA.

The diagnosis of PCM based on FTIR with multivariate analysis methods has already been proposed in two other studies, which obtained 91.67% accuracy [16], and 100% accuracy [17]. The first [16] showed three main limitations in relation to the present study: (1) small number of samples (only 20 samples from patients with PCM and 20 control subjects), (2) the model was only tested by cross-validation, without external validation, and (3) samples from patients with other systemic mycoses were not included. The second was developed by our research group, using OPLS-DA and considering the complete spectral region (4000-650 cm^{-1}) [17]. Even having already obtained 100% accuracy in this previous modeling, in the present work we proposed a simpler modeling, with the use of LDA coupled to a variable selection

method, which made it possible to replace the use of the total spectrum for only eight variables. This increases the robustness of the diagnostic model, maximizing the chance of correct prediction in new external samples and making the model less sensitive to interference of environmental noise.

Thus, we identified some serum ATR/FTIR spectral biomarkers for PCM screening. Serum is a complex biofluid that perfuses organs throughout the body, bringing information about intra and extracellular events [34]; therefore, it is suitable for diagnosis of various diseases. For PCM, the spectral biomarker in serum that showed the highest potential in univariate analysis was the 1264 cm^{-1} vibrational mode, with significantly lower absorbance in PCM patients (Figure 3B and Figure 4B). This region of the spectrum is mainly associated with asymmetrical vibrations of PO_4^- , which is attributed to phosphate [25]. PCM patients may have reduced serum phosphate levels [1], which could explain the potential of these vibrational modes for PCM diagnosis. The eight wavenumbers used in LDA, between $1500\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$, mainly involve carbon bonds present in lipids [35]. Different sphingolipids, such as cerebroside D, have already been selected as potential diagnostic biomarkers of PCM in serum through high-resolution mass spectrometry [36]. These sphingolipids participate in the antigenicity of *Paracoccidioides* spp., which could explain their potential as biomarkers [37]. However, fungal diseases are still poorly explored with FTIR spectroscopy, and the physiological explanation of these potential biomarkers still needs to be better explored.

5. Conclusions

Here, simple and low-cost diagnostic methods for PCM, based on FTIR, were proposed. Its main advantages over existing methods are the speed of analysis, the minimal generation of waste and the use of serum, a minimally invasive sample that is easily collected in most patients. The LDA modeling was highlighted, which achieved 100% accuracy, showing a better performance than the routine PCM diagnostic methods. In addition, it was possible to identify spectral biomarkers that differentiate serum from patients with PCM from other systemic mycoses, which can be confounded by clinical signs and serology. In this way, the potential of the methodology proposed here to be applied in the diagnosis of PCM is proved.

Author Contributions: Conceptualization, A.K. and V.A.C.; Methodology, A.K. and N.M.P.S.; Software, A.K. and V.A.C.; Validation, A.K.; Formal Analysis, A.K.; Investigation, A.K.; Resources, B.A.S.P., R.S.C., and R.P.M.; Data Curation, B.A.S.P. and R.S.C.; Writing – Original Draft Preparation, A.K.; Writing – Review & Editing, V.A.C.; Visualization,

N.M.P.S.; Supervision, V.A.C.; Project Administration, R.P.M. and M.L.S.; Funding Acquisition, M.L.S.

Funding information: CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Process number 442448/2019-8 – Chamada Doenças Negligenciadas).

Ethics Statements: The study was approved by the ethics committees of the universities participating in the study (CAAE 37684720.2.1001.5343).

Conflicts of Interest: The authors report there are no competing interests to declare.

References

1. Mendes, R. P.; Cavalcante, R. S.; Marques, S. A.; Marques, M. E. A.; Venturini, J.; Sylvestre, T. F.; Paniago, A. M. M.; Pereira, A. C.; da Silva, J. F.; Fabro, A. T.; Bosco, S. M. G.; Bagagli E.; Hahn, R. C.; Levorato, A. D. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. *Open Microbiol. J.* 2017, 11, 224-282. DOI: 10.2174/1874285801711010224.
2. Martinez, R. New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology. *J. Fungi (Basel)* 2017, 3, 1. DOI: 10.3390/jof3010001.
3. Turissini, D.A.; Gomez, O. M.; Teixeira, M. M.; McEwen, J. G.; Matute, D. R. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. *Fungal Genet Biol.* 2017, 106, 9-25. DOI: 10.1016/j.fgb.2017.05.007.
4. Vilela, R.; de Hoog, S.; Bensch, K.; Bagagli, E.; Mendoza, L. A taxonomic review of the genus *Paracoccidioides*, with focus on the uncultivable species. *PLoS Negl Trop Dis.* 2023, 17, e0011220. DOI: 10.1371/journal.pntd.0011220.
5. Rodrigues, A. M.; Hagen, F.; Puccia, R.; Hahn, R. C.; de Camargo, Z. P. *Paracoccidioides* and paracoccidioidomycosis in the 21st century. *Mycopathologia.* 2023, 188, 129-133. DOI: 10.1007/s11046-022-00704-y.
6. González, A. The Therapy of Pulmonary Fibrosis in Paracoccidioidomycosis: What Are the New Experimental Approaches? *J. Fungi (Basel)* 2020, 6, 217. DOI: 10.3390/jof6040217.
7. Teles, F. R.; Martins, M. L. Laboratorial diagnosis of paracoccidioidomycosis and new insights for the future of fungal diagnosis. *Talanta* 2011, 85, 2254-2264. DOI: 10.1016/j.talanta.2011.07.099.

8. Silva Ferreira, C.; de Castro Ribeiro, E. M.; Goes, A. de M.; Silva, B. de M. Current strategies for diagnosis of paracoccidioidomycosis and prospects of methods based on gold nanoparticles. *Future Microbiol.* 2016, 11, 973-985. DOI: 10.2217/fmb-2016-0062.
9. da Silva, J. F.; de Oliveira, H. C.; Marcos, C. M.; Assato, P. A.; Fusco-Almeida, A. M.; Mendes-Giannini, M. J. S. Advances and challenges in paracoccidioidomycosis serology caused by *Paracoccidioides* species complex: an update. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2016, 84, 87-94. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.06.004.
10. Gegembauer, G.; Araujo, L.M.; Pereira, E.F.; Rodrigues, A.M.; Paniago, A.M.; Hahn, R.C.; de Camargo, Z.P. Serology of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014, 8, e2986. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002986.
11. de Camargo, Z. P. Serology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 2008, 165, 289-302. DOI: 10.1007/s11046-007-9060-5.
12. Patel, R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clin Chem.* 2015, 61, 100-111. DOI: 10.1373/clinchem.2014.221770.
13. de Almeida Jr., J. N.; del Negro, G. M. B.; Grenfell, R. C.; Vidal, M. S. M.; Thomaz, D. Y.; de Figueiredo, D. S. Y.; Bagagli, E.; Juliano, L.; Benard, G. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the differentiation of the dimorphic fungal species *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. *J Clin Microbiol.* 2015, 53, 1383-1386. DOI: 10.1128/JCM.02847-14.
14. Balan, V.; Mihai, C. T.; Cojocaru, F. D.; Uritu, C. M.; Dodi, G.; Botezat, D.; Gardikiotis, I. Vibrational Spectroscopy Fingerprinting in Medicine: from Molecular to Clinical Practice. *Materials (Basel)* 2019, 12, 2884. DOI: 10.3390/ma12182884.
15. Baker, M. J.; Trevisan, J.; Bassan, P.; Bhargava, R.; Butler, H. J.; Dorling, K. M.; Fielden, P. R.; Fogarty, S. W.; Fullwood, N. J.; Heys, K. A.; Hughes, C.; Lasch, P.; Martin-Hirsch, P. L.; Obinaju, B.; Sockalingum, G. D.; Sulé-Suso, J.; Strong, R. J.; Walsh, M. J.; Wood, B. R.; Gardner, P.; Martin, F. L. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nat. Protoc.* 2014, 9, 1771-1991. DOI: 10.1038/nprot.2014.110.
16. de Brito, E. C. A.; Franca, T.; Canassa, T.; Weber, S. S.; Paniago, A. M. M.; Cena, C. Paracoccidioidomycosis screening diagnosis by FTIR spectroscopy and multivariate analysis. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2022, 39, 102921. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2022.102921.
17. Koehler, A.; Scroferneker, M. L.; Pereira, B. A. S.; de Souza, R. de S.; Mendes, R. P.; Corbellini, V. A. Using infrared spectroscopy of serum and chemometrics for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2022, 221, 115021. DOI: 10.1016/j.jpba.2022.115021.

18. Trevisan, J.; Angelov, P. P.; Carmichael, P. L.; Scott, A. D.; Martin, F. L. Extracting biological information with computational analysis of Fourier-transform infrared (FTIR) biospectroscopy datasets: current practices to future perspectives. *Analyst* 2012, 137, 3202-3215. DOI: 10.1039/c2an16300d.
19. Schisterman, E. F.; Perkins, N. J.; Liu, A.; Bondell, H. Optimal cut-point and its corresponding Youden Index to discriminate individuals using pooled blood samples. *Epidemiology* 2005, 16, 73-81. DOI: 10.1097/01.ede.0000147512.81966.ba.
20. Barth, A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007, 1767, 1073-1101. DOI: 10.1016/j.bbabi.2007.06.004.
21. Gray, E.; Butler, H. J.; Roard, R.; Brennan, P. M.; Chalmers, A. J.; Dawson, T.; Goodden, J.; Hamilton, W.; Hegarty, M. G.; James, A.; Jenkinson, M. D.; Kernick, D.; Lekka, E.; Livermore, L. J.; Mills, S. J.; O'Neill, K.; Palmer, D. S.; Vaqas, B.; Baker, M. J. Health economic evaluation of a serum-based blood test for brain tumour diagnosis: exploration of two clinical scenarios. *BMJ Open* 2018, 8, e017593. DOI: 10.1136/bmjopen-2017-017593.
22. Trebach, J.; Su, M. K. Biostatistics and Epidemiology for the Toxicologist: Rock the ROC Curve. *J. Med. Toxicol.* 2022, 18, 163-167. DOI: 10.1007/s13181-022-00879-2.
23. Moreto, T. C.; Marques, M. E. A.; de Oliveira, M. L. S. C.; Moris, D. V.; de Carvalho, L. R.; Mendes, R. P. Accuracy of routine diagnostic tests used in paracoccidioidomycosis patients at a university hospital. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2011, 105, 473-478. DOI: 10.1016/j.trstmh.2011.03.001.
24. Vidal, M. S.; del Negro, G. M.; Vicentini, A.P.; Svidzinski, T. I.; Mendes-Giannini, M. J.; Almeida, A. M.; Martinez, R.; de Camargo, Z. P.; Taborda, C. P.; Benard, G. Serological diagnosis of paracoccidioidomycosis: high rate of inter-laboratorial variability among medical mycology reference centers. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014, 8, e3174. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003174.
25. Hahn, R. C.; Hagen, F.; Mendes, R. P.; Burger, E.; Nery, A. F.; Siqueira, N. P.; Guevara, A.; Rodrigues, A. M.; de Camargo, Z. P. Paracoccidioidomycosis: Current Status and Future Trends. *Clin. Microbiol. Rev.* 2022, 35, e0023321. DOI: 10.1128/cmr.00233-21.
26. Griffiths, J.; Colombo, A. L.; Denning, D. W. The case for paracoccidioidomycosis to be accepted as a neglected tropical (fungal) disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2019, 13, e0007195. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007195.
27. Dorling, K. M.; Baker, M. J. Highlighting attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy for rapid serum analysis. *Trends Biotechnol.* 2013, 31, 327-328. DOI: 10.1016/j.tibtech.2013.03.010.

28. Ferreira, I. C. C.; Aguiar, E. M. G.; Silva, A. T. F.; Santos L. L. D.; Cardoso-Sousa, L.; Araújo, T. G.; Santos, D. W.; Goulart, L. R.; Sabino-Silva, R.; Maia, Y. C. P. Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy Analysis of Saliva for Breast Cancer Diagnosis. *J. Oncol.* 2022, 2020, 4343590. DOI: 10.1155/2020/4343590.
29. Coopman, R.; de Vyver, T. V.; Kishabongo, A. S.; Katchunga, P.; Van Aken, E. H.; Cikomola, J.; Monteyne, T.; Speeckaert, M. M.; Delanghe, J. R. Glycation in human fingernail clippings using ATR-FTIR spectrometry, a new marker for the diagnosis and monitoring of diabetes mellitus. *Clin. Biochem.* 2017, 50, 62-67. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2016.09.001.
30. Caixeta, D. C.; Aguiar, E. M. G.; Cardoso-Sousa, L.; Coelho, L. M. D.; Oliveira, S. W.; Espindola, F. S.; Raniero, L.; Crosara, K. T. B.; Baker, M. J.; Siqueira, W. L.; Sabino-Silva, R. Salivary molecular spectroscopy: A sustainable, rapid and non-invasive monitoring tool for diabetes mellitus during insulin treatment. *PLoS One* 2020, 15, e0223461. DOI: 10.1371/journal.pone.0223461.
31. Rodrigues, R. P. C. B.; Aguiar, E. M. G.; Cardoso-Sousa, L.; Caixeta, D. C.; Guedes, C. C. F. V.; Siqueira, W. L.; Maia, Y. C. P.; Cardoso, S. V.; Sabino-Silva, R. Differential Molecular Signature of Human Saliva Using ATR-FTIR Spectroscopy for Chronic Kidney Disease Diagnosis. *Braz. Dent. J.* 2019, 30, 437-445. DOI: 10.1590/0103-6440201902228.
32. Grech, V.; Calleja, N. WASP (Write a Scientific Paper): Multivariate analysis. *Early Hum. Dev.* 2018, 123, 42-45. DOI: 10.1016/j.earlhumdev.2018.04.012.
33. Setser, A. L.; Smith, W. Comparison of variable selection methods prior to linear discriminant analysis classification of synthetic phenethylamines and tryptamines, *Forensic Chem.*, 2018, 11, 77-86. DOI: 10.1016/j.forc.2018.10.002.
34. Sala, A.; Anderson, D. J.; Brennan, P. M.; Butler, H. J.; Cameron, J. M.; Jenkinson, M. D.; Rinaldi, C.; Theakstone, A. G.; Baker, M. J. Biofluid diagnostics by FTIR spectroscopy: A platform technology for cancer detection. *Cancer Lett.* 2020, 477, 122-130. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.02.020.
35. Movasaghi, Z.; Rehman, S.; ur Rehman, I. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Appl. Spectrosc. Rev.* 2008, 43, 134-179. DOI: 10.1080/05704920701829043.
36. Lima, E. de O.; Navarro, L. C.; Morishita, K. N.; Kamikawa, C. M.; Rodrigues, R. G. M.; Dabaja, M. Z.; de Oliveira, D. N.; Delafiori, J.; Dias-Audibert, F. L.; Ribeiro, M. da S.; Vicentini, A. P.; Rocha, A.; Catharino R. Metabolomics and Machine Learning Approaches Combined in Pursuit for More Accurate Paracoccidioidomycosis Diagnosis. *mSystems*, 2020, 5, e00258-20. DOI: 10.1128/mSystems.00258-20.

37. Bertini, S.; Colombo, A. L.; Takahashi, H. K.; Strauss, A. H. Expression of Antibodies Directed to *Paracoccidioides brasiliensis* Glycosphingolipids during the Course of Paracoccidioidomycosis Treatment. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2007, 14, 150-156. DOI: 10.1128/CVI.00285-06.

7.2 ARTIGOS COMPLEMENTARES

Durante o doutorado, foram realizadas pesquisas complementares sobre a paracoccidiodomicose, não diretamente relacionadas com o projeto principal. Porém, como essas análises foram realizadas durante o período do doutorado, considerou-se pertinente acrescentar os artigos nesta tese. Foram publicados dois artigos relacionados à epidemiologia da PCM.

ARTIGO 1: Head and neck manifestations of paracoccidioidomycosis: A retrospective study of histopathologically diagnosed cases in two medical centers in southern Brazil

Data de publicação: 03/05/2022

Revista: *Journal of Medical Mycology*

DOI: 10.1016/j.mycmed.2022.101292

Alessandra Koehler¹, Fábio Muradás Girardi², Leo Kraether Neto³, Paulo Cezar de Moraes¹, Vilmar Fontanive Junior⁴, Maria Lúcia Scroferneker^{1,5}

¹ Postgraduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre - RS, Brazil.

² Integrated Oncology Center, Hospital Ana Nery. Santa Cruz do Sul - RS, Brasil.

³ School of Dentistry and Oral Diagnostic Project, Universidade de Santa Cruz do Sul. Santa Cruz do Sul - RS, Brasil.

⁴ Respiratory Department of Instituto de Cardiologia – Fundação Universitária de Cardiologia (IC-FUC). Porto Alegre - RS, Brasil.

⁵ Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre - RS, Brazil.

Corresponding author: Maria Lúcia Scroferneker, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmento Leite, 500 – CEP 90050-170, Porto Alegre – RS, Brazil. Tel.: (+55) 51-33083934; Fax: (+55) 51-33083121; e-mail: scrofern@ufrgs.br

ABSTRACT

Background: Paracoccidioidomycosis (PCM) is a granulomatous systemic mycosis endemic in southern Brazil.

Objectives: Analyze the clinical and epidemiological characteristics of cases of PCM with head and neck manifestations in southern Brazil.

Material and Methods: Retrospective study of histopathologically diagnosed cases of PCM with head and neck manifestations referred to two medical centers in the municipality of Santa Cruz do Sul, state of Rio Grande do Sul, Brazil, during a 10-year period (2011–2020).

Results: Twenty-eight patients were selected. The number of cases usually ranged from one to four per year, although 11 cases were diagnosed in 2019. Most patients were between 40 and

59 years old. In total, 21 patients were men and seven were women (male:female ratio 3:1). Most (92%) were Caucasian and 46% were smokers. Patients were from 12 municipalities in the central-eastern region of the state. The most frequent site of the lesions was the larynx. Associated HIV and squamous cell carcinoma were both present in three cases.

Conclusions: This is the first study to analyze PCM cases from central-eastern Rio Grande do Sul. PCM is endemic in southern Brazil, and more epidemiological data are needed, considering that its incidence may be higher than currently estimated, as demonstrated by our results.

Keywords: paracoccidioidomycosis; *Paracoccidioides* spp.; epidemiology; systemic mycosis; head and neck

1. INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic granulomatous disease endemic to Latin America. The highest numbers of cases are reported in the following countries, in descending order: Brazil, Venezuela, Colombia, Ecuador, and Argentina [1]. In Brazil, the main endemic areas are the southern and southeastern regions, with an estimated incidence of one to four cases/100,000 inhabitants per year [2]. PCM is caused by thermally dimorphic fungi of the genus *Paracoccidioides* [1]. Initially, only the species *P. brasiliensis* was included in the genus, but molecular data have revealed at least four additional species: *P. lutzii*, *P. americana* (PS2), *P. restrepiensis* (PS3), and *P. venezuelensis* (PS4). In addition, *P. brasiliensis sensu stricto* has two genotypes: *P. brasiliensis* S1a and *P. brasiliensis* S1b [3–6].

PCM is acquired through the respiratory tract, by inhalation of propagules from the mycelial (saprophytic) phase, which is found mainly in soil [7,8]. In the human organism, the propagules transform into yeast and the infection sets in. PCM can affect any organ, especially the lungs, mucosa of the upper aerodigestive tract, and skin [9]. The disease is diagnosed by observing the fungus in biological samples, with direct mycological, culture, or histopathological examination. Serologic tests are also useful for diagnosis and monitoring the response to treatment. Itraconazole is the antifungal most indicated for treatment [1].

Although the state of Rio Grande do Sul in southern Brazil is a known endemic area of PCM, few case series have been published and it is not possible to estimate the true incidence [10–13]. However, some studies have found *Paracoccidioides* species in soil [14] and in wild animals [15], showing that the fungus is widely present in the state. The present study analyzed the clinical and epidemiological characteristics of cases of paracoccidioidomycosis with head and neck manifestations from the central-eastern region of the state.

2. MATERIAL AND METHODS

Retrospective analysis of all cases of PCM with head and neck manifestations referred to two medical centers in the municipality of Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, during a 10-year period (2011–2021). This municipality is in the central-eastern region of the state (29°43'59" S, 52°24'52" W), with a population of 131,365 in 2020. The climate is temperate subtropical, with a mean temperature of 19 °C (maximum 42 °C and minimum 5 °C) and mean annual precipitation of 1300 to 1800 mm.

The cases were identified in the databases of the Integrated Oncology Center of the Hospital Ana Nery and the Dentistry Clinic of the Universidade de Santa Cruz do Sul (Figure 1, A and B). All cases had an initial suspicion of head and neck cancer. However, after biopsy, they were histopathologically diagnosed as paracoccidioidomycosis, with observation of fungal structures through microscopy, with the use of Grocott-Gomori and periodic acid Schiff (PAS) staining (Figure 1, C and D).

The following data were analyzed: year of diagnosis, sex, race, age at diagnosis, place of origin, smoking habits, schooling, anatomical sites of the lesions, evolution time of the symptoms, and presence of cancer and other associated diseases and outcomes. Certain demographic data obtained from the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) were also used in the analyses [16].

Data were analyzed by descriptive statistics in the software Statistical Package for the Social Sciences 26 (SPSS). Informed consent forms were obtained from all participants, with authorization to use photographs and medical records in scientific publications, and the study was approved by the ethics committee of the Universidade de Santa Cruz do Sul (CAAE 37684720.2.1001.5343).

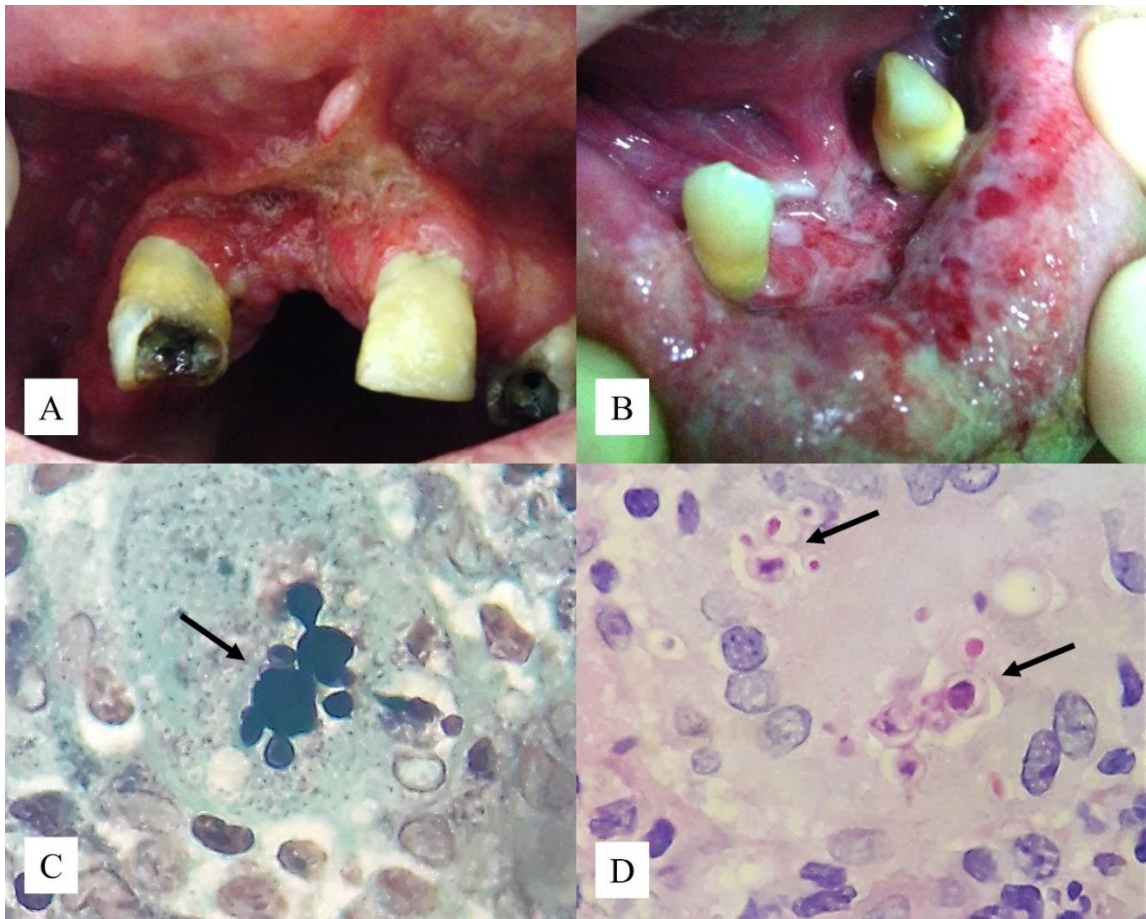


Figure 1. A and B - Mouth lesions typical of paracoccidioidomycosis; **C and D** – Histopathological examination showing multiple budding yeast cells (arrows), with Grocott-Gomori (C) and PAS (D) stainings (x400).

3. RESULTS

Twenty-eight patients were identified and selected (Table 1). The number of cases remained stable during most of the period of analysis, ranging from one to four cases per year. However, in 2019 the number increased considerably, with 11 diagnosed cases. The patients were from 12 municipalities in the central-eastern region of Rio Grande do Sul (Figure 2). In 2019, the 11 diagnosed cases were from five municipalities (Minas do Leão, Rio Pardo, Santa Cruz do Sul, Vale Verde, and Venâncio Aires), with a total estimated population of 252,931 [16]. Considering these data, the incidence of PCM in 2019 in the analyzed region was 4.34 cases/100,000 inhabitants.

Age at diagnosis ranged from 28 to 80 years. The predominant age range was between 40 and 49 years, in 35.6% of the cases (n = 9), followed by 60 to 69 years of age, in 21.4% of the cases (n = 6). In total, 21 (75%) were men and seven (25%) were women, with a male:female

ratio of 3:1. Most were Caucasian (92.8%; n = 26), 46.4% were smokers (n = 13), and 57.1% were illiterate or had not completed elementary school (n = 16) (Table 1).

Regarding clinical characteristics, the most common anatomical site was the larynx, in six cases, followed by the soft palate and the lips, with five cases each. The facial skin was involved in four cases. The evolution time of the symptoms was recorded for only ten cases, in eight of which the lesions evolved over one to four months. Longer times (15 and 24 months) were observed in two cases. The most common associated diseases were squamous cell carcinoma and HIV, in three cases each (10.7%).

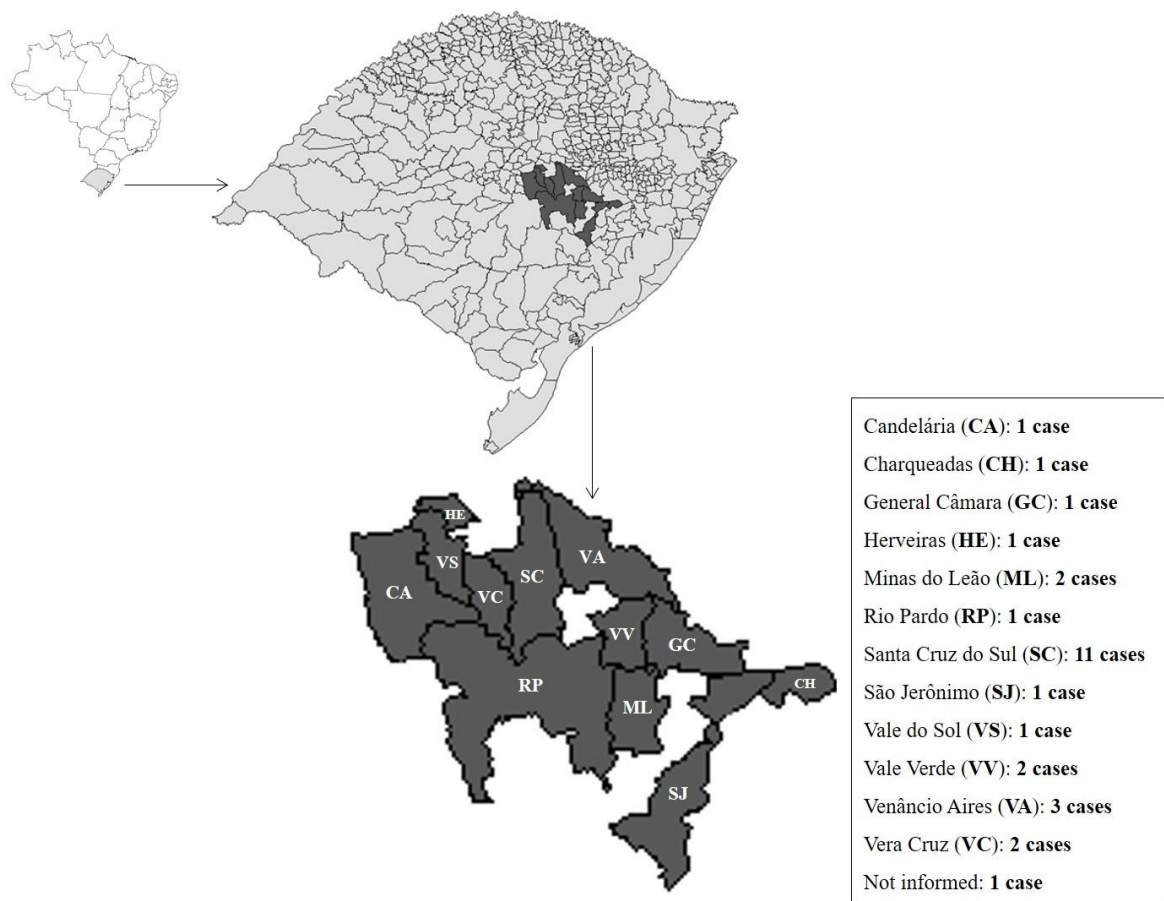


Figure 2. Geographical distribution of the analyzed cases, based on the city of origin of the patients.

Table 1. Epidemiological, sociodemographic and clinical characteristics of 28 cases of paracoccidioidomycosis from Southern Brazil.

Case	Year of diagnosis	Sex	Race/ Skin color	Age at diagnosis (years)	Place of origin (city)	Habits	Schooling	Anatomical sites of the lesions	Evolution time of the lesions (months)	Associated diseases
01	2011	Male	White	46	NI	NI	Incomplete Middle school	Soft palate	NI	NI
02	2011	Female	White	49	Santa Cruz do Sul	Smoking	NI	Prosthesis rim	NI	Hypertension
03	2012	Male	White	60	Santa Cruz do Sul	Smoking + alcoholism	Illiterate	Lips	NI	Hepatitis C
04	2013	Male	White	80	Santa Cruz do Sul	NI	Middle school	Lips	NI	NI
05	2013	Male	White	49	Santa Cruz do Sul	Smoking	Incomplete Middle school	Larynx	NI	NI
06	2014	Male	White	78	Herveiras	Smoking	Illiterate	Lips	NI	NI
07	2014	Male	White	39	General Câmara	NI	Incomplete Middle school	Glottic larynx	NI	NI
08	2014	Female	White	28	Charqueadas	Smoking + alcoholism	High school	Tongue	1	Untreated HIV
09	2015	Female	White	77	Vale do Sol	NI	Illiterate	Supraglottic larynx	NI	NI
10	2016	Male	White	37	Santa Cruz do Sul	Smoking + alcoholism	Middle school	Soft palate	4	NI
11	2016	Male	White	57	Vera Cruz	NI	NI	Lips	NI	NI
12	2017	Male	White	49	Vale Verde	NI	Incomplete Middle school	Glottic larynx	24	NI
13	2017	Male	Black	40	Vera Cruz	NI	High school	Facial skin	NI	NI
14	2017	Male	White	68	São Jerônimo	Smoking	Incomplete Middle school	Lips	1	Lip SCC
15	2017	Male	Brown	41	Minas do Leão	Smoking + ex-alcoholism	Incomplete Middle school	Larynx	15	NI
16	2018	Male	White	71	Candelária	Smoking	NI	NI	NI	NI
17	2019	Female	White	42	Venâncio Aires	Smoking	Incomplete Middle school	Mouth	3	NI
18	2019	Male	White	69	Venâncio Aires	Smoking + ex-alcoholism	Incomplete Middle school	Soft palate	3	Oropharynx SCC
19	2019	Male	White	74	Vale Verde	NI	Incomplete Middle school	Facial skin	NI	NI
20	2019	Female	White	53	Santa Cruz do Sul	NI	High school	Cervical lymph node	NI	NI
21	2019	Female	White	28	Santa Cruz do Sul	NI	High school	Facial skin	NI	NI
22	2019	Male	White	61	Santa Cruz do Sul	None	Incomplete Middle school	Cheek mucosa	NI	Dysplasia + focal microinvasive SCC
23	2019	Female	White	62	Santa Cruz do Sul	None	Incomplete Middle school	Supraglottic larynx	2	NI
24	2019	Male	White	46	Rio Pardo	NI	Incomplete Middle school	Facial skin	4	HIV + ganglionic tuberculosis
25	2019	Male	White	58	Minas do Leão	Smoking	NI	NI	NI	Hypertension
26	2019	Male	White	69	Santa Cruz do Sul	Smoking	NI	NI	NI	Hypertension
27	2019	Male	White	53	Venâncio Aires	NI	NI	Soft palate	NI	NI
28	2020	Male	White	42	Santa Cruz do Sul	NI	Incomplete Middle school	Soft palate	2	HIV + pulmonary tuberculosis

Abbreviations: NI – not informed; SCC – squamous cell carcinoma.

4. DISCUSSION

This was the first study to analyze PCM cases from the central-eastern region of Rio Grande do Sul. The incidence of 4.34 cases/100,000 inhabitants found in 2019 is important, considering that the cases analyzed here came from only two medical centers, and included only cases with head and neck manifestations. In a study carried out with cases from several cities in Rio Grande do Sul, but mainly from Santa Maria in the central region, the incidence found was 0.90 cases/100,000 inhabitants [17]. Few epidemiological data are available on paracoccidioidomycosis in the state of Rio Grande do Sul; however, the number of cases in the present study indicates that the incidence may be higher than currently estimated.

The large increase in cases diagnosed in 2019 is another datum that deserves attention. In our study, the age and clinical presentation of patients corresponded to the chronic form of PCM. This form usually affects adults over 30 years of age, and upper aerodigestive tract (UADT) lesions are very common. This clinical form may have a long latency period, with slow development of the disease. A person may be exposed to the fungus and only several years later develop symptoms [1,18]. Therefore, it is not possible to accurately determine when the patients in this study were infected with *Paracoccidioides* spp. This prevents any correlation of the increase in cases in 2019 with climatic factors, for example, which have been linked to PCM cases in other studies [19,20]. In addition, we cannot rule out the possibility that the increase in diagnosed cases in 2019 was due only to a greater demand for health care in that year. For these reasons this datum, although important, will not be discussed further.

The predominance of men aged between 40 and 59 years and of smokers accords with previously published epidemiological data [2]. However, we found a lower male:female ratio (3:1) than usually reported (11:1) [21], and this ratio can be as high as 22:1 [1] and 30:1 [22]. A recent systematic review of oral paracoccidioidomycosis analyzed 25 studies, totaling 1,011 patients. Of these, only 72 cases were in females, resulting in a male:female ratio of approximately 14:1 [23]. The prevalence of PCM in men is attributed mainly to the lack of estrogen, which in women is able to inhibit the transition of *Paracoccidioides* spp. from the mycelial form to the pathogenic yeast form [21,24]. A recent study that evaluated the presence of estrogen receptors in PCM oral lesions found a positive correlation between estrogen receptor- α and the fungal cell count in lesions in women, also demonstrating the relationship of this hormone to the immune response [25].

One factor that may be responsible for cases of chronic PCM in women over 45 years of age is menopause, a period when less estrogen is produced [21]. In our study, five cases occurred in women aged between 42 and 77 years at the time of diagnosis, and could be

attributed to reduced estrogen. However, in two cases, the patients were 28 years and 38 years of age. The 38-year-old patient had smoking and drinking habits, in addition to untreated HIV, all risk factors for PCM [1]. The 28-year-old patient had no risk factor for PCM, which emphasizes the importance of differential diagnosis in these cases.

The higher proportion of cases in Caucasian individuals accords with a recent study that showed that Caucasians are more affected by PCM [26]. Other studies also found a higher proportion of Caucasians [13,27]. However, Oliveira *et al.* were the first to find a racial predisposition for PCM [2], in a population composed of 70.6% Caucasian individuals and 29.4% non-Caucasians [26]. In the present study, according to data from the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) [28], approximately 86% of the population of Santa Cruz do Sul is Caucasian, while only 14% is non-Caucasian. This proportion is similar in other municipalities where PCM cases were recorded. This may explain, in part, the 98.2% prevalence of the cases in Caucasian individuals here. A larger sample is needed to determine whether this prevalence is statistically significant when compared to the racial composition of the population.

Regarding clinical characteristics, the presence of lesions in the upper aerodigestive tract mucosa (mouth, tongue, nose, larynx), lymph nodes, and skin is very common in PCM [17,29], as found here. Oral biopsy is important for early diagnosis, as lesions in the upper aerodigestive tract mucosa are often a primary manifestation of the disease [30]. PCM is endemic in southern Brazil and differential diagnosis with granulomatous and neoplastic diseases must always be done, as its lesions can mimic characteristics of these diseases [31]. In our study, all cases had an initial suspicion of carcinoma, which was ruled out through biopsy. The association of neoplasia and PCM is described in the literature, and frequently lesions of both diseases are found close to or at the same site [32]. The association of PCM with HIV should also be considered, as these patients have a higher risk of relapses and a higher mortality rate [33].

Considering the significant impact of PCM, it is worrying that, especially in southern Brazil, an endemic region for the disease, there are so few published case series and case reports. PCM is a disease directly associated with poverty, mainly affecting people who have had prolonged contact with the soil and who often have less access to health systems [1]. The educational level of the patients analyzed in our study confirms this association. Late diagnosis often generates irreversible sequelae, such as pulmonary fibrosis, which severely impacts the patient's quality of life. Despite this, the World Health Organization (WHO) still does not recognize PCM as a neglected tropical disease [34]. Fortunately, Ordinance No. 264, published in Brazil on February 17, 2020, included paracoccidioidomycosis in the National List of

Compulsory Notification of diseases, injuries, and public-health events [35]. It is hoped that this will increase knowledge of the epidemiology of PCM and consequently encourage more research, especially on diagnosis and treatment, areas that need further development [34].

This was an initial study on cases of paracoccidioidomycosis in the central-eastern region of the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Further studies are needed, with research in more medical-care centers, to include a larger number of cases and determine if the data are consistent with our study. The predominance of male patients, diagnosed between the fourth and fifth decade of life, accords with expectations for cases of PCM. However, some aspects of the data are unusual, such as the occurrence of a considerable number of cases in women, including a 28-year-old patient without risk factors. PCM is endemic in Brazil and more research on its epidemiology is needed, considering that the incidence of this disease may be higher than currently estimated.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors want to thank the team of the Dentistry Clinic of Universidade de Santa Cruz do Sul, who kindly received us for analysis of the medical records.

FUNDING

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

CONFLICTS OF INTEREST

None to declare.

REFERENCES

1. Mendes RP, Cavalcante RS, Marques SA, Marques MEA, Venturini J, Sylvestre TF, Paniago AMM, Pereira AC, da Silva J de F, Fabro AT, Bosco S de MG, Bagagli E, Hahn RC, Levorato AD. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. *Open Microbiol J*. 2017; 11:224-282. doi: 10.2174/1874285801711010224
2. Martinez R. New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. *J Fungi (Basel)*. 2017; 3:1. doi: 10.3390/jof3010001
3. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, Mendoza L, Bagagli E, San-Blas G, Felipe MSS. Phylogenetic analysis reveals a high level of

- speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol.* 2009; 52:273-83. doi: 10.1016/j.ympev.2009.04.005
4. Teixeira Mde M, Theodoro RC, Oliveira FF, Machado GC, Hahn RC, Bagagli E, San-Blas G, Felipe MSS. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. *Med Mycol.* 2014; 52:19-28. doi: 10.3109/13693786.2013.794311
 5. Teixeira MM, Cattana ME, Matute DR, Muñoz JF, Arechavala A, Isbell K, Schipper R, Santiso G, Tracogna F, Sosa MLÁ, Cech N, Alvarado P, Barreto L, Chacón Y, Ortellado J, Lima CM, Chang MR, Niño-Vega G, Yasuda MAS, Felipe MSS, Negroni R, Cuomo CA, Barker B, Giusiano G. Genomic diversity of the human pathogen *Paracoccidioides* across the South American continent. *Fungal Genet Biol.* 2020; 140:103395. doi: 10.1016/j.fgb.2020.103395
 6. Muñoz JF, Farrer RA, Desjardins CA, Gallo JE, Sykes S, Sakthikumar S, Misas E, Whiston EA, Bagagli E, Soares CM, Teixeira MM, Taylor JW, Clay OK, McEwen JG, Cuomo CA. Genome Diversity, Recombination, and Virulence across the Major Lineages of *Paracoccidioides*. *mSphere.* 2016; 1:e00213-16. doi: 10.1128/mSphere.00213-16
 7. Seyedmousavi S, Guillot J, Toloee A, Verweij PE, de Hoog GS. Neglected fungal zoonoses: hidden threats to man and animals. *Clin Microbiol Infect.* 2015; 21:416-425. doi: 10.1016/j.cmi.2015.02.031
 8. Giusiano G. The Trojan Horse Model in *Paracoccidioides*: A Fantastic Pathway to Survive Infecting Human Cells. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021; 10:605679. doi: 10.3389/fcimb.2020.605679
 9. Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL, Queiroz-Telles F, Kono ASG, Paniago AMM, Nathan A, do Valle ACF, Bagagli E, Benard G, Ferreira MS, Teixeira M de M, Silva-Vergara ML, Pereira RM, Cavalcante R de S, Hahn R, Durlacher RR, Khoury Z, de Camargo ZP, Moretti ML, Martinez R. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017; 50:715-740. doi: 10.1590/0037-8682-0230-2017
 10. de Souza SP, Jorge VM, Xavier MO. Paracoccidioidomycosis in southern Rio Grande do Sul: a retrospective study of histopathologically diagnosed cases. *Braz J Microbiol.* 2014; 45:243-247. doi: 10.1590/S1517-83822014000100035
 11. Verli FD, Marinho SA, Souza SC, Figueiredo MA, Yurgel LS. Perfil clínico-epidemiológico dos pacientes portadores de paracoccidioidomicose no Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005; 38:234-237. doi: 10.1590/S0037-86822005000300005

12. dos Santos JW, Severo LC, Porto Nda S, Moreira Jda S, da Silva LC, Carmargo JJ. Chronic pulmonary paracoccidioidomycosis in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathologia*. 1999; 145:63-67. doi: 10.1023/A:1007075524924
13. Girardi FM, Scroferneker ML, Gava V, Pruinelli R. Head and neck manifestations of paracoccidioidomycosis: an epidemiological study of 36 cases in Brazil. *Mycopathologia*. 2012; 173:139-144. doi: 10.1007/s11046-011-9488-5
14. Mendes JF, Von Groll A, Poester VR, Brasil CL, Brandolt TM, Klafke GB, Nogueira CEW, Meireles MCA, Xavier MO. *Paracoccidioides* spp. in Soil from the Pampa Biome in Southern Brazil. *Curr Microbiol*. 2019; 76:258-262. doi: 10.1007/s00284-018-1621-y
15. Albano AP, Klafke GB, Brandolt TM, Da Hora VP, Minello LF, Jorge S, Santos EO, Behling GM, Camargo ZP, Xavier MO, Meireles MCA. Wild animals as sentinels of *Paracoccidioides brasiliensis* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathologia*. 2014; 177:207-215. doi: 10.1007/s11046-014-9731-y
16. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE [Internet]. Panorama. [cited 2022 Mar 17]. Available from: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/panorama>
17. Londero AT, Ramos CD. Paracoccidioidomycose. Estudo clinico e micológico de 260 casos observados no interior do Estado do Rio Grande do Sul. *Jornal de Pneumologia*. 1990; 16:129-32.
18. Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL, Telles FQ, Kono A, Paniago AMM, Nathan A, do Valle ACF, Bagagli E, Benard G, Ferreira MS, Teixeira M de M, Vergara MLS, Pereira RM, Cavalcante R de S, Hahn R, Durlacher RR, Khoury Z, de Camargo ZP, Moretti ML, Martinez R. II Consenso Brasileiro em Paracoccidioidomycose - 2017. *Epidemiol Serv Saude*. 2018; 27:e0500001. doi: 10.5123/S1679-49742018000500001
19. Simões LB, Marques SA, Bagagli E. Distribution of paracoccidioidomycosis: determination of ecologic correlates through spatial analyses. *Med Mycol*. 2004; 42:517-523. doi: 10.1080/13693780310001656795
20. Barrozo LV, Benard G, Silva ME, Bagagli E, Marques SA, Mendes RP. First description of a cluster of acute/subacute paracoccidioidomycosis cases and its association with a climatic anomaly. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4:e643. doi: 10.1371/journal.pntd.0000643
21. Shankar J, Restrepo A, Clemons KV, Stevens DA. Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. *Clin Microbiol Rev*. 2011; 24:296-313. doi: 10.1128/CMR.00062-10

22. Bicalho RN, Santo MF, de Aguiar MC, Santos VR. Oral paracoccidioidomycosis: a retrospective study of 62 Brazilian patients. *Oral Dis.* 2001; 7:56-60. doi: 10.1034/j.1601-0825.2001.70111.x
23. Costa MC, de Carvalho MM, Sperandio FF, Ribeiro Junior NV, Hanemann JAC, Pigossi SC, de Carli ML. Oral Paracoccidioidomycosis affecting women: A systematic review. *Mycoses.* 2021; 64:108-122. doi: 10.1111/myc.13194
24. Salazar ME, Restrepo A, Stevens DA. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immun.* 1988; 56:711-713. doi: 10.1128/iai.56.3.711-713.1988
25. Caixeta CA, de Carli ML, Ribeiro Júnior NV, Sperandio FF, Nonogaki S, Nogueira DA, Pereira AAC, Hanemann JAC. Estrogen Receptor- α Correlates with Higher Fungal Cell Number in Oral Paracoccidioidomycosis in Women. *Mycopathologia.* 2018; 183:785-791. doi: 10.1007/s11046-018-0272-7
26. Zeminian de Oliveira LB, Della Coletta AM, Gardizani TP, Barrozo LV, Miot HA, De Faveri J, Dias-Melicio LA. Paracoccidioimycosis and white individuals: Susceptibility and biogeographic aspects in an important endemic area in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2021; 15:e0009086. doi: 10.1371/journal.pntd.0009086
27. da Silva GK, Ribeiro MFA, Grossmann S de MC, Capistrano HM, Mendes PA, Souto GR. Paracoccidioidomycose: uma revisão clínico-epidemiológica de casos com lesões orais em 24 anos. *Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilof.* 2020; 61:122-127. doi: 10.24873/j.rpemd.2020.11.717
28. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE [Internet]. Santa Cruz do Sul. [cited 2021 Jun 10]. Available from: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rs/santa-cruz-do-sul/panorama>
29. Bellissimo-Rodrigues F, Bollela VR, Da Fonseca BA, Martinez R. Endemic paracoccidioidomycosis: relationship between clinical presentation and patients' demographic features. *Med Mycol.* 2013; 51:313-318. doi: 10.3109/13693786.2012.714529
30. Guimarães MRFSG, Cintra LTA, Durlacher RR, Benetti F, Guimarães G. Oral Biopsy for Early Diagnosis of Paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 2019; 184:193-194. doi: 10.1007/s11046-018-0311-4
31. Girardi FM, Scrofernecker ML. Oral paracoccidioidomycosis mimicking lip carcinoma. *Braz J Infect Dis.* 2016; 20:103-104. doi: 10.1016/j.bjid.2015.08.015

32. Shikanai-Yasuda MA, Conceição YM, Kono A, Rivitti E, Campos AF, Campos SV. Neoplasia and paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. 2008; 165:303-12. doi: 10.1007/s11046-007-9047-2
33. de Almeida JN Jr, Peçanha-Pietrobom PM, Colombo AL. Paracoccidioidomycosis in Immunocompromised Patients: A Literature Review. *J Fungi (Basel)*. 2018; 5:2. doi: 10.3390/jof5010002
34. Griffiths J, Lopes Colombo A, Denning DW. The case for paracoccidioidomycosis to be accepted as a neglected tropical (fungal) disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019; 13:e0007195. doi: 10.1371/journal.pntd.0007195
35. Ministério da Saúde [Internet]. Portaria nº 264, de 17 de fevereiro de 2020. [cited 2021 Jun 10] Available from: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2020/prt0264_19_02_2020.html

ARTIGO 2: Clinical-epidemiological characteristics of paracoccidioidomycosis and presence of *Paracoccidioides* spp. in the natural environment in Rio Grande do Sul, southern Brazil: an 81-year literature survey

Data de publicação: 04/01/2024

Revista: *Reviews and Research In Medical Microbiology*

DOI: 10.1097/MRM.0000000000000387

Alessandra Koehler^{a*}, Maria Lúcia Scroferneker^{a,b*}

^a Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Postgraduate Program of Medicine: Medical Sciences, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

^b Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

*Corresponding authors:

Alessandra Koehler. Avenida Borges de Medeiros 1501, CEP 90110-150, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. E-mail: aleskoehler@gmail.com; Tel.: +555135749932.

Maria Lúcia Scroferneker. Rua Sarmiento Leite, 500, CEP 90050-170, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. E-mail: scrofern@ufrgs.br; Tel.: +555133083934.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM), caused by fungi of the genus *Paracoccidioides*, is the main endemic mycosis in Brazil, with serious social and public-health impacts. Although the state of Rio Grande do Sul in southern Brazil is an area of high endemicity, data on PCM in this state are very sparse. Here, an exhaustive literature search was conducted for PCM cases reported in Rio Grande do Sul, in addition to the environmental occurrence of *Paracoccidioides* spp. in the state. From 1942 to 2023, 52 studies were found, encompassing a total of 1576 PCM cases. The male:female ratio was 15:1, and the most affected age group was 41 to 60 years. Lesions were reported at 11 different anatomical sites, with a predominance of the lungs and upper aerodigestive tract mucosa. Data such as treatment and mortality were rarely reported. Cases were recorded in 30% of the municipalities in the state, predominantly in the northern region. Regarding the environmental presence of *Paracoccidioides* spp., anti-*P. brasiliensis* and anti-*P. lutzii* antibodies have been identified in several animal species in addition to isolation of the fungi from soil samples. Although a literature search is useful for a basic knowledge of PCM

occurrence, the need for epidemiological surveillance of the disease in Rio Grande do Sul is urgent, considering its high endemicity and occurrence in all regions of the state.

Keywords: paracoccidioidomycosis; *Paracoccidioides*; epidemiology; public health

1. INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a chronic systemic mycosis endemic to Latin America. About 80% of cases occur in Brazil, with the remainder in other South American countries, mainly Colombia, Venezuela, Argentina, and Ecuador [1]. In Brazil, the largest numbers of cases have been reported in the Southeast, Center-West, and South regions. PCM was described in 1908 by the physician Adolpho Lutz, in the city of São Paulo, Brazil [2]. In the state of Rio Grande do Sul (RS) in southern Brazil, reports of the first cases of the disease were published only in 1942 [3,4].

PCM is caused by thermally dimorphic fungi of the genus *Paracoccidioides*. This genus was initially considered monotypic, with only the species *P. brasiliensis*. Currently, at least four phylogenetic species of *P. brasiliensis* are recognized, in addition to *P. lutzii*, which shows genetic and antigenic differences from the *P. brasiliensis* complex [5].

Infection by *Paracoccidioides* spp. starts with inhalation of fungal propagules present in the environment, mainly in soil. Prolonged contact with the soil, as in the case of farmers, is considered a risk factor for PCM [6]. In the lungs, the fungus converts to its yeast form and from there it can spread to any organ or body system. The most affected organs are the lungs, upper aerodigestive tract mucosa, lymph nodes, and skin [2]. The wide variety of clinical manifestations poses a challenge for early diagnosis, which is mainly done by observing *Paracoccidioides* spp. in clinical samples [7]. With confirmation of the diagnosis, treatment with sulfamethoxazole (SMX)-trimethoprim (TMP), azole derivatives, or amphotericin B is indicated [5].

In Brazil, PCM is responsible for 50% of the deaths caused by systemic mycoses [8], with major social and public-health impacts. Even so, it is still not recognized as a neglected tropical disease by the World Health Organization (WHO) [9], and there is no official epidemiological surveillance in Brazil. As the state of Rio Grande do Sul is an endemic area of PCM and data on the disease in the state are sparse, this study presents a survey of the literature and a compilation of published cases of PCM, increasing knowledge of the clinical and epidemiological characteristics of the disease in the state.

2. METHODS

A literature search of PCM cases published in the state of Rio Grande do Sul was conducted, in addition to noting the environmental occurrence of *Paracoccidioides* spp. in the state. The search involved different databases (PubMed, SciELO, and LILACS). Because several studies date from prior to the 2000s, searches were also conducted in the physical repository of the Library of the Faculty of Medicine of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul and of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FAMED/HCPA Library). In addition to paracoccidioidomycosis, searches were also performed using the old PCM nomenclatures, mainly paracoccidioidic granuloma and Lutz's mycosis/blastomycosis. We conducted an exhaustive search of the literature with the aim of including all cases of PCM published in Rio Grande do Sul. However, because of the antiquity of some studies and their consequent unavailability, we do not rule out the possibility that some cases have not been included.

The data collected in the studies were sex, age, race/skin color, professional occupation, habits of smoking and alcohol consumption, schooling, anatomical sites of the lesions, evolution time of the symptoms, associated diseases, diagnosis method, treatment, clinical outcome, and origin (current residence) of patients. Data were analyzed using descriptive statistics in the Statistical Package for the Social Sciences 26 (SPSS) software. Because of the large amount of missing information, the percentages were calculated considering only the total number of cases that reported each type of data. The data for origin were compiled in a map created in the software QGIS v3.32.0.

3. RESULTS

For the period from 1942 to 2023, 52 studies were found, encompassing a total of 1576 cases of PCM published in the state of Rio Grande do Sul [3,4,10-59]. Most studies are case reports, with some retrospective observational studies including a larger number of cases.

Cases in males predominated, with a male:female ratio of approximately 15:1 (Table 1). Regarding age, in 430 cases the age was reported for individuals, ranging from 9 to 80 years, with a mean of 47 ± 11.4 years. In 938 cases, ages were described by group, ranging from 2 to 102 years, with the main age group between 41 and 60 years of age. In the remaining cases ($n = 208$), age was not provided. Therefore, the period most affected was the fourth and fifth decade of life.

Smoking/alcohol consumption habits were reported in few studies, totaling only 151 patients. Of these, most ($n = 90$, 59.60%) reported smoking, while 35 (23.18%) reported a

smoking habit and alcohol consumption. Schooling was described only for 57 patients, with the majority having completed elementary school (n = 31, 54.38%), and 9 were illiterate (15.79%).

Table 1. Sociodemographic characteristics of 1576 paracoccidioidomycosis cases published in 52 studies in Rio Grande do Sul, Brazil, from 1942 to 2023.

Characteristics	Total N=1576	%*
Sex		
Male	1244	93.8
Female	82	6.2
Not informed	250	-
Race/skin color		
White	736	95.9
Brown/black	31	4.1
Not informed	809	-
Occupation		
Farmer	666	74.9
Other occupations with contact with soil: carpenter, construction, gardener, miner	44	4.9
Other occupations not related to soil	180	20.2
Not informed	686	-

*Percentages were calculated disregarding not informed data.

Table 2 summarizes the clinical characteristics of the 1576 PCM patients. PCM lesions have been reported at 11 different anatomical sites: abdominal viscera (bowels, liver, spleen), adrenals, anal/perianal, bones, cutaneous/mucosal areas, genital region, lungs, lymph nodes, nervous system, oral cavity/pharynx/larynx, and skin. At least two organs or organs systems were involved in approximately 48% of cases. However, this percentage must be higher, as several studies focused only on manifestations in the upper aerodigestive tract mucosa, without mentioning the involvement of other organs; often, at least the lungs are also involved. Table 2 lists only the anatomical sites reported in 20 or more cases; the other sites are included in “other organs”. The main organs involved were the lungs, mentioned in 822 cases, and the oral cavity/pharynx/larynx, mentioned in 604 cases (66.7% and 49.0%, respectively).

The diagnoses were performed using one or more of seven techniques: culture, direct mycological examination (DME), histopathology, serological diagnosis, inoculation in animals, intradermoreaction, and polymerase chain reaction (PCR). In 1504 cases (95.4%), it was not possible to determine the time of evolution of the symptoms. Only in 72 cases was the time

defined individually, ranging from 1 month to 12 years, with a mean of 531 ± 642 days of symptom evolution. Associated diseases were described in only 60 cases, the most frequent being different types of cancer, in 33 cases (55.0%); followed by HIV and tuberculosis, both occurring in 8 cases each (13.3%).

Table 2. Clinical characteristics of 1576 paracoccidioidomycosis cases published in 52 studies in Rio Grande do Sul, Brazil, from 1942 to 2023.

Characteristics	Total N=1576	%*
Anatomical sites of the lesions		
Cutaneous/mucosal	97	7.9
Cutaneous/mucosal + lungs	140	11.4
Cutaneous/mucosal + lymph nodes + lungs	23	1.9
Lungs	246	20.0
Lymph nodes + lungs	26	2.0
Oral cavity/pharynx/larynx	267	21.7
Oral cavity/pharynx/larynx + lungs	319	25.9
Other organs	114	9.2
Not informed	344	-
Diagnosis method		
Direct mycological examination	417	39.9
Direct mycological examination + histopathology	98	9.4
Histopathology	474	45.3
Other methods	57	5.4
Not informed	530	-
Treatment		
Only sulphamidics	87	44.6
Sulphamidics + antifungals (azoles, amphotericin B)	15	7.7
Antifungals (itraconazole, amphotericin B, ketoconazole, flucytosine)	93	47.7
Not informed	1381	-
Outcome		
Cure	21	42.8
Partial cure/relapse	17	34.7
Death	11	22.5
Not informed	1527	-

*Percentages were calculated disregarding not informed data.

Regarding the origin of the patients, different types of information were provided (Table 3). According to the most recent demographic census (in 2022), Rio Grande do Sul has 497 municipalities [60]. Of these, almost 30% (n = 146) had at least one case of PCM recorded (Figure 1). However, in several studies, the origin of the patient was not described, and it was only possible to define the municipality where the diagnosis occurred. As the state has relatively small municipalities, some locations centralize medical care, such as Porto Alegre, Santa Maria, and Passo Fundo. In these three municipalities together, it was not clear in 289 cases (18.3% of the total) whether the patients resided in these locations. Considering that these larger municipalities receive many cases from other locations, at least some of these 289 patients may have traveled only for medical care, and therefore, more than 146 municipalities in RS have doubtless had cases of PCM.

Table 3. Characteristics regarding the origin of 1576 patients with paracoccidioidomycosis, whose cases were published in 52 studies in Rio Grande do Sul, Brazil, from 1942 to 2023.

Characteristics	Total N=1576	%*
Cases with municipalities of origin	901	71.2
Municipalities in the metropolitan region	247	-
Northern region municipalities	580	-
Municipalities in the southern region	74	-
Cases with region of origin only#	335	26.5
Metropolitan region	32	-
North region	288	-
South region	15	-
Cases that had onset of symptoms in other states	30	2.3
Brasília	1	-
Paraná	4	-
Rio de Janeiro	4	-
Santa Catarina	21	-
Not informed	310	-

*Percentages were calculated disregarding not informed data.

#Considering three regions: the Metropolitan region of Porto Alegre (composed of 34 municipalities around the capital), the North region and the South region (in relation to the 30°S parallel).

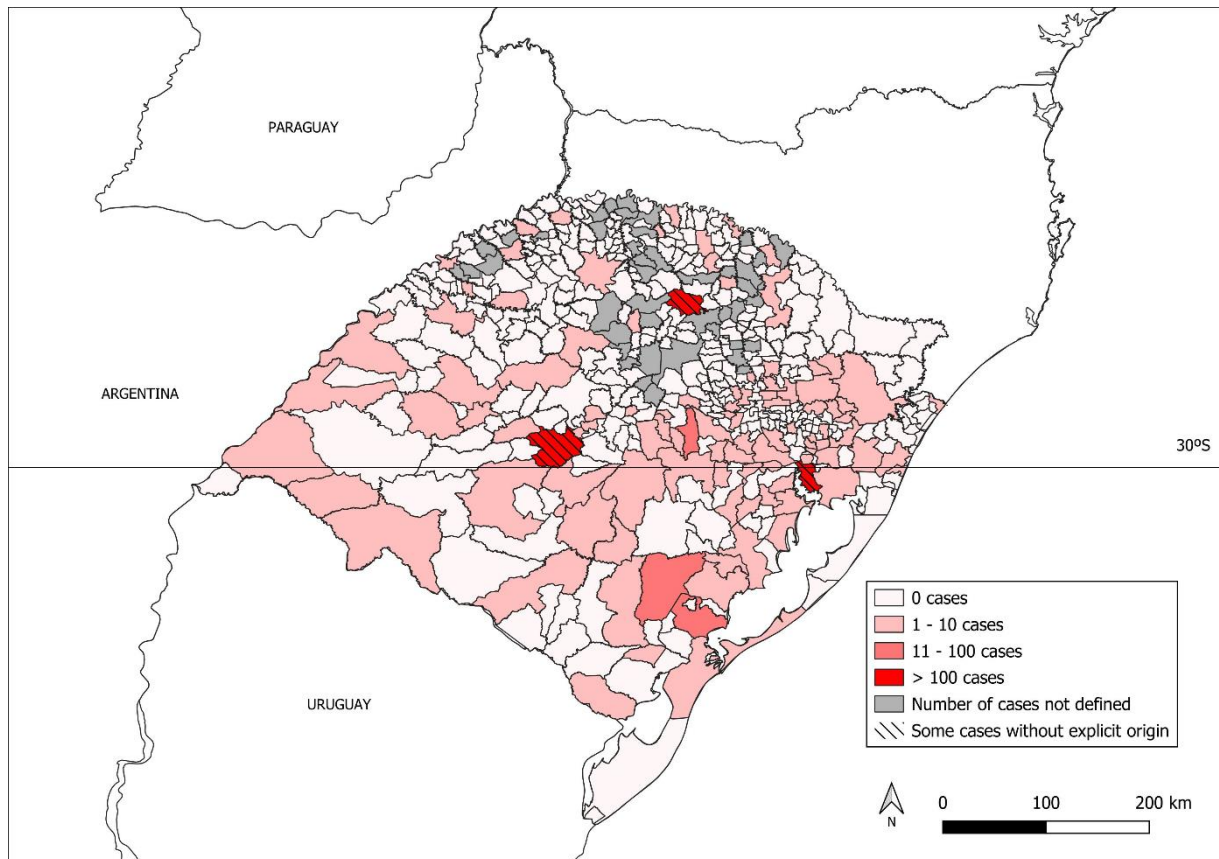


Figure 1. Geographic distribution, by municipality, of 901 cases of paracoccidioidomycosis published in 52 studies in Rio Grande do Sul, Brazil, from 1942 to 2023.

Even though the municipalities with PCM cases are well distributed throughout the state (Figure 1), more cases have been reported in municipalities in the northern region. Summing the cases in Table 3 by region, there are 279 cases in the Metropolitan region (22.6%), 868 in the North region (70.2%), and 89 in the South region (7.2%) (these percentages include 1236 cases, excluding cases from other states of Brazil and cases with no origin provided).

Regarding the presence of *Paracoccidioides* spp. in the natural environment, six studies demonstrated the occurrence of a member of this genus in Rio Grande do Sul (Table 4). The presence of anti-gp43 antibodies of *P. brasiliensis* was evidenced in several species of wild and domestic animals, in both rural and urban areas [61-63]. In addition, members of this genus were identified by genetic sequencing in soil samples [64,65]. One study provided evidence of *P. lutzii* in Rio Grande do Sul, through detection of anti-*P. lutzii* antibodies in animals from rural areas (horses and wild animals) and from urban areas (domestic dogs) [66].

Table 4. Compilation of studies that evaluated the presence of *Paracoccidioides* spp. in animals and the environment in the state of Rio Grande do Sul, Brazil.

Sample	Methodology	Results	Ref
128 wild animals (102 from Southeast region, 25 from Metropolitan region, 1 from Southwest region)	ELISA with gp43 antigen (<i>P. brasiliensis</i>)	Positivity in 26 animals (20.3%); 20 from the Southeast region and 6 from the Metropolitan region	61
200 horses from five farms in Bagé	ELISA with gp43 antigen (<i>P. brasiliensis</i>)	Positivity in 24 horses (12%)	62
196 dogs from urban areas of Pelotas and Capão do Leão	ELISA with gp43 antigen (<i>P. brasiliensis</i>)	Positivity in 58 dogs (29.6%)	63
200 horses from five farms in Bagé; 196 dogs from urban areas of Pelotas and Capão do Leão; 85 wild animals (71 from the Southeast region, 13 from the Metropolitan region and 1 from the Southwest region)	ELISA with gp43 antigen (<i>P. brasiliensis</i>) and with cell-free antigen (CFA) of <i>P. lutzii</i>	Positivity for <i>P. lutzii</i> in 105 animals; of these, 54 were also positive for <i>P. brasiliensis</i> ; 51 animals were positive only for <i>P. lutzii</i> : 11 horses (10.5%), 30 dogs (28.8%) and 10 wild animals (9.5%)	66
600 soil collection points (totaling 30 sample pools) in areas of Bagé where animals were positive in the studies ^{61-63,66}	PCR and sequencing	PCR positivity in 8 soil samples (26.7%); 3 samples were sequenced and identified as <i>P. brasiliensis</i>	64
16 soil samples from the urban area of Rio Grande	PCR and sequencing	PCR positivity in 7 samples (44%); 4 samples were sequenced and identified as <i>P. brasiliensis</i>	65

4. DISCUSSION

The state of Rio Grande do Sul is known as an area of moderate to high PCM endemicity. This is one of the states, together with São Paulo, Paraná, Goiás, and Rondônia, with the highest number of cases in Brazil [1,6]. Therefore, the 1576 PCM cases published over an 81-year period are certainly only a small percentage of the actual number. Large amounts of sociodemographic and epidemiological data are missing, ranging from 15% of the total cases in relation to gender, to more than 90% in other relevant characteristics, such as the treatment used and the clinical outcome. For this reason, important data for the state, such as PCM mortality, could not be compiled reliably from the published cases.

Even so, analysis of the 1576 cases allowed a description of some of the clinical and epidemiological characteristics of PCM in RS. The predominance of men aged between 41 and 60 years, farmers, or other professional occupations related to the soil, agrees with previously published epidemiological data [1]. Among the cases that reported smoking or alcohol consumption habits, a large percentage were smokers, a recognized risk factor for PCM [67]. Regarding the racial composition of the 1576 cases, the high percentage of Caucasian

individuals is expected, since in the most recent demographic census (2022), 72.8% of the respondents in southern Brazil declared themselves to be Caucasian [68].

Regarding the clinical characteristics, the sites of the lesions were quite diverse, in line with the wide spectrum of clinical manifestations of PCM. Half of the cases involved at least two organs, which is expected given the widespread configuration of PCM; autopsy findings of multi-organ involvement with no apparent clinical manifestations have been reported [5]. The involvement of the lungs in the largest percentage of cases is notable, as the lungs are the entry point for the fungus, in addition to being related to the main sequelae of PCM, fibrosis and emphysema [2]. The clinical characteristics and the mean time of evolution of the symptoms allow most of the 1576 cases of PCM to be classified as chronic. According to the world literature, 80% to 95% of PCM cases are chronic [1].

Regarding the geographical distribution of PCM cases in the state, the considerably higher number of cases in northern RS compared to the southern region is noteworthy. This unequal distribution of PCM in the state was previously evidenced by Bopp in 1955 [12], who suggested that the northern region had geoeconomic conditions that facilitated transmission of the disease. In 1967, Bopp and Bernardi expanded this hypothesis, in a description of the geopathology of PCM in RS [17]. In this study, the authors attributed the higher prevalence of PCM in the northern region (6.6 cases per 100,000 inhabitants) to the presence of fertile basaltic soils, abundant rainfall, large areas of forest, and intensive agriculture. In the southern region, with poor soils, few forests, and low rainfall, the prevalence was 1.7 cases per 100,000 inhabitants [17].

However, in 1972, Londero et al. [69] questioned Bopp's studies, as they took into account only the place of origin of the patients, and not their residential trajectory throughout their lives. The site of the diagnosis is not always the same as the site of the infection. In the chronic form of PCM, the time lag between infection and the onset of symptoms is usually months to years [1,2]. Thus, ideally, to determine the site of infection and consequently where the fungus is found in nature, it is necessary to trace a history of the places where the patient has previously resided or visited, in addition to his occupational history [69]. As this is often not possible, it is an inherent limitation in studying the epidemiology of PCM. Even with this limitation, it was possible to demonstrate the existence of PCM cases in at least 30% of the municipalities in RS, distributed across all its regions, evidencing the high endemicity of the disease in the state.

In line with the high endemicity, a wide environmental presence of *Paracoccidioides* spp. in the state is expected. Some studies have previously demonstrated this wide presence

(Table 4), even showing that *P. lutzii* occurs in Rio Grande do Sul. Initially, it was believed that this species occurred almost exclusively in the Middle-West region of Brazil [70], where several cases were reported [71]. However, some cases have begun to be reported in the Amazon region [72], in addition to detection of the species in the soil in the Southeast region [73]. Recently, cases of *P. lutzii* infections in this region have been recorded in patients who had never been to regions considered endemic for the species [74]. Thus, it is now known that *P. lutzii* is not restricted to specific regions of Brazil, and that its distribution is much broader than initially believed.

In Rio Grande do Sul, human cases of *P. lutzii* infections have not yet been published, but the existence of animals with antibodies against this species indicates its presence in the state [66]. This suggests that at least some of the published cases of PCM may have been caused by this species and not by *P. brasiliensis*. Unfortunately, none of the previously published reports performed molecular identification of the *Paracoccidioides* species. This information is important because, although clinical differences between the different species of *Paracoccidioides* have not yet been demonstrated [75], it is known that *P. lutzii* has a different antigenic composition than *P. brasiliensis* [76]. Therefore, the use of specific antigens in immunodiagnosis is necessary [77] to avoid false-negative results.

Notably, most of the samples summarized here were collected in municipalities in the southern region of RS, with only a few in the metropolitan region. This contradicts the hypothesis of Bopp and Bernardi [17], as it demonstrates that *Paracoccidioides* spp. also occur in the southern region, which, according to these authors, would not provide the ideal habitat for the fungus. The exact ecological niche of *Paracoccidioides* spp. is still unknown, and the habitat is also still a matter of debate [78]. The most likely habitat is the soil, although few reports exist of isolation of the fungus from the environment, possibly because of its low concentration in the samples [5].

Considering that the fungus occurs widely in the environment of the southern region of the state, the occurrence of PCM must be more common than inferable from the published human cases in the region, as well as throughout the state. Thus, although a compilation of published data is useful for a basic knowledge of the occurrence of PCM in Rio Grande do Sul, a clinical-epidemiological profile of the disease based on published cases does not necessarily reflect reality, as the data are highly fragmented with much important information missing. Most publications derive from large health-care centers with university affiliations, with the main focus on cases with unusual manifestations, or considering only a few of the many possible clinical manifestations of PCM.

Even with the difficulties in obtaining clinical and epidemiological information on PCM from published studies alone, the disease is not yet included in the national list of notifiable diseases and conditions [79]. Despite this, epidemiological surveillance of PCM is already carried out independently in some states of Brazil: Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Rondônia, and Paraná; the last two implemented surveillance in 1999 and 2000, respectively [79]. This surveillance results in more concrete information, making it possible to define the incidence and mortality rate of the disease, for example [80].

5. CONCLUSIONS

The present compilation of clinical-epidemiological data for 1576 cases of PCM in Rio Grande do Sul, published over a period of 81 years, demonstrates the occurrence of the disease in at least 30% of the municipalities in the state. We discuss the environmental presence of *Paracoccidioides* spp. based on studies that evidenced exposure of animals to the fungus or identified it in soil. In view of the high endemicity of PCM in Rio Grande do Sul, it must be included in the list of notifiable diseases in the state. This is the only way to determine the epidemiological background of PCM in RS, allowing implementation of public policies for surveillance and control of this important endemic mycosis.

REFERENCES

1. Martinez R. New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. *J Fungi (Basel)*. 2017;3(1):1.
2. Mendes RP, Cavalcante RS, Marques SA, Marques MEA, Venturini J, Sylvestre TF, et al. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. *Open Microbiol J*. 2017;11:224-282.
3. Clausell DT. Estudo micológico e experimental de três casos de Granuloma paracoccidióidico. *Arq Rio Gd Sul Braz State*. 1942;3:81-97.
4. de Campos EC. Sobre dois casos de Granuloma paracoccidióidico no Rio Grande do Sul. *Arq Rio Gd Sul Braz State*. 1942;3:71-77.
5. Hahn RC, Hagen F, Mendes RP, Burger E, Nery AF, Siqueira NP, et al. Paracoccidioidomycosis: Current Status and Future Trends. *Clin Microbiol Rev*. 2022;35(4):e0023321.

6. Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL, Queiroz-Telles F, Kono ASG, Paniago AMM, et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017;50(5):715-740.
7. Giacomazzi J, Baethgen L, Carneiro LC, Millington MA, Denning DW, Colombo AL, et al. The burden of serious human fungal infections in Brazil. *Mycoses.* 2016;59(3):145-150.
8. Prado M, Silva MB, Laurenti R, Travassos LR, Tabora CP. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(3):513-521.
9. Griffiths J, Lopes Colombo A, Denning DW. The case for paracoccidioidomycosis to be accepted as a neglected tropical (fungal) disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13(5):e0007195.
10. da Silva NN, de Campos EC. A blastomicose de Lutz no Rio Grande do Sul. *Arq Rio Gd Sul Braz State.* 1945;6:81-95.
11. da Silva NN, da Rosa MM. Forma pulmonar primitiva de blastomicose. *An Fac Med Porto Alegre.* 1951;2:95-110.
12. Bopp C. Algumas considerações sobre a micose de Lutz no Rio Grande do Sul. *An Fac Med Porto Alegre.* 1955;15:97-106.
13. Bopp C, de Lima GM. Tríplice infecção micótica: cromoblastomicose associada à blastomicose de Lutz e à esporotricose. *Med Cirurg (Porto Alegre).* 1957;18:35-45.
14. de Campos EC. A propósito de um caso de micose de Lutz de localização genital e de seu tratamento pela sulfametoxipiridazina. *Rev Ass Med RG do Sul.* 1959;3:143-148.
15. de Campos EC, del Pino G de S. Blastomicose anal primitiva. A propósito de dois casos observados no Rio Grande do Sul. *An Fac Med Porto Alegre.* 1962;22:91-95.
16. Londero AT, Fabricio R. Genital localization of South American blastomycosis. A new case. *Mycopathol Mycol Appl.* 1966;30:253-256.
17. Bopp C, Bernardi CDV. Geopatologia da blastomicose sul americana no Rio Grande do Sul. *Rev AMRIGS.* 1967;11(1):31-49.
18. Londero AT, Fischman O. Perianal and/or rectal lesions in South American blastomycosis. *Mycopathologia.* 1967;32:231-236.
19. Londero AT, Ramos CD. Paracoccidioidomycosis. A clinical and mycologic study of forty-one cases observed in Santa Maria, RS, Brazil. *Am J Med.* 1972;52(6):771-775.
20. Londero AT, Ramos CD, Lopes JOS. Progressive pulmonary paracoccidioidomycosis. A study of 34 cases observed in Rio Grande do Sul (Brazil). *Mycopathologia.* 1978;63(1):53-56

21. Severo LC, Porto N da S, Rizzon CFC. Paracoccidioidomicose pulmonar progressiva: 18 casos estudados em Porto Alegre, RS. *Jornal de Pneumologia*. 1979;5(1):5-7.
22. Severo LC, Londero AT, Geyer GR, Porto N da S. Acute pulmonary paracoccidioidomycosis in a immunosuppressed patient. *Mycopathologia*. 1979;68(3):171-174.
23. Severo LC, Geyer GR, Londero AT, Porto NS, Rizzon CFC. The primary pulmonary lymph node complex in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. 1979;67(2):115-118.
24. Londero AT, Severo LC, Ramos CD. Small forms and hyphae of *Paracoccidioides brasiliensis* in human tissue. *Mycopathologia*. 1980;72:17-19.
25. Rizzon CFC, Severo LC, Porto N da S. Paracoccidioidomicose - Estudo de 82 casos observados em Porto Alegre - RS. *Rev AMRIGS*. 1980;24(1):15-17.
26. Severo LC, Palombini BC, Utz E, Braun SN. Paracoccidioidomicose pulmonar resultante de reativação de lesão quiescente, em paciente imunossuprimido. *Jornal de Pneumologia*. 1980;6(1):21-22.
27. Ramos CD, Londero AT, Gal MCL. Pulmonary paracoccidioidomycosis in a nine year old girl. *Mycopathologia*. 1981;74:15-18.
28. Melo IS, Londero AT. Spontaneously resolving pulmonary lesions in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. 1983;82:57-59.
29. Severo LC, Porto NS, Camargo JJ, Geyer GR. Multiple paracoccidioidomas simulating Wegener's granulomatosis. *Mycopathologia*. 1985;91:117-119.
30. Londero AT, Santos W, da Silva LA, Ramos CD. Paracoccidioidomicose associada por droga imunossupressora em paciente com lúpus eritematoso sistêmico. *Jornal de Pneumologia*. 1987;13(4):224-226.
31. Bakos L, Kronfeld M, Hampe S, Castro I, Zampese M. Disseminated paracoccidioidomycosis with skin lesions in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *J Am Acad Dermatol*. 1989;20(5 pt 1):854-855.
32. Londero AT, Ramos CD. Paracoccidioidomicose. Estudo clínico e micológico de 260 casos observados no interior do Estado do Rio Grande do Sul. *Jornal de Pneumologia*. 1990;16(3):129-132.
33. Severo LC, Agostini AA, Londero AT. Acometimento ósseo na paracoccidioidomicose crônica disseminada. Relato dos primeiros casos no Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1996;29(3):241-244.
34. dos Santos JWA, Michel GT, Londero AT. Paracoccidioidoma: Case record and review. *Mycopathologia*. 1997;137:83-85.

35. Colares SM, Marcantônio S, Zambonato S, Severo LC. Paracoccidioidomicose aguda/subaguda disseminada. Primeiro caso no Rio Grande do Sul. Rev Soc Bras Med Trop. 1998;31:563-567.
36. dos Santos JWA, Costa JM, Cechella M, Michel GT, de Figueiredo CWC, Londero AT. An unusual presentation of paracoccidioidomycosis in an AIDS patient: A case report. Mycopathologia. 1998;142:139-142.
37. dos Santos JWA, Severo LC, Porto N da S, Moreira J da S, da Silva LCC, Camargo JJP. Chronic pulmonary paracoccidioidomycosis in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Mycopathologia. 1999;145:63-67.
38. Severo LC, Kauer CL, Oliveira F de M, Rigatti RA, Hartmann AA, Londero AT. Paracoccidioidomycosis of the male genital tract. Report of eleven cases and a review of Brazilian literature. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2000;42(1):37-40.
39. da Silva PZ, Oliveira F de M, Severo LC. Paracoccidioidomicose e gastrectomia. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36(6):747-749.
40. dos Santos JWA, Debiassi B, Miletho JN, Bertolazi AN, Fagundes AL, Michel GT. Asymptomatic presentation of chronic pulmonary paracoccidioidomycosis: case report and review. Mycopathologia. 2004;157:53-57.
41. dos Santos RP, Maia AL, Goldani LZ. Paracoccidioidomycosis in a woman with idiopathic hirsutism. Mycopathologia. 2004;158:57-59.
42. Zavascki AP, Bienardt JC, Severo LC. Paracoccidioidomycosis in organ transplant recipient: case report. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2004;46(5):279-281.
43. dos Santos JWA, da Silveira ML, Santos FP, Mathias AC, Bertolazi AN, Melo CRA, et al. Simultaneous chronic pulmonary paracoccidioidomycosis and disseminated cryptococcosis in a non-HIV patient. Mycopathologia. 2005;159:373-376.
44. Verli FD, Marinho SA, de Souza SC, de Figueiredo MAZ, Yurgel LS. Perfil clínico-epidemiológico dos pacientes portadores de paracoccidioidomicose no Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Rev Soc Bras Med Trop. 2005;38(3):234-237.
45. Rodrigues G da S, Severo CB, Oliveira F de M, Moreira J da S, Prolla JC, Severo LC. Associação entre paracoccidioidomicose e câncer. J Bras Pneumol. 2010;36(3):356-362.
46. Bello AGD, Severo CB, Oliveira F de M, Severo LC. Disseminated paracoccidioidomycosis (simulating metastatic lung cancer) and *Strongyloides stercoralis* hyperinfestation in a steroid-treated patient. J Clin Microbiol. 2011;49(5):2054-2055.

47. Frey MN, Bonamigo RR, Ioppi AEE, Prado GP. Estudo sobre as características clínicas, epidemiológicas, histopatológicas e micológicas de pacientes com micoses profundas em um Serviço de Dermatologia de Porto Alegre, RS. *Rev AMRIGS*. 2011;55(2):123-129.
48. Girardi FM, Scroferneker ML, Gava V, Pruinelli R. Head and neck manifestations of paracoccidioidomycosis: An epidemiological study of 36 cases in Brazil. *Mycopathologia*. 2012;173:139-144.
49. Severo CB, Bello AGD, Oliveira F de M, Guazzelli LS, Tregnago R, Haas M, et al. Pleural effusion an unusual feature of paracoccidioidomycosis: report of two new cases with a systematic review of the literature. *Mycopathologia*. 2013;175:323-330.
50. de Souza SP, Jorge VM, Xavier MO. Paracoccidioidomycosis in southern Rio Grande do Sul: A retrospective study of histopathologically diagnosed cases. *Braz J Microbiol*. 2014;45(1):243-247.
51. Homrich GK, Andrade CF, Marchiori RC, Lidtke G dos S, Martins FP, dos Santos JWA. Prevalence of benign diseases mimicking lung cancer: Experience from a university hospital of Southern Brazil. *Tuberc Respir Dis*. 2015;78:72-77.
52. Webber LP, Martins MD, de Oliveira MG, Munhoz EA, Carrard VC. Disseminated paracoccidioidomycosis diagnosis based on oral lesions. *Contemp Clin Dent*. 2014;5(2):213-216.
53. Coelho MG, Severo CB, Oliveira F de M, Hochhegger B, Severo LC. Paracoccidioidomycosis mimicking sarcoidosis: A review of 8 cases. *Mycopathologia*. 2016;181:137-143.
54. Massi LS, Bello AGD, d'Azevedo PA, Severo LC. Diagnóstico molecular de paracoccidioidomicose associada à tuberculose em amostras de escarro. *Clin Biomed Res*. 2016;36(3):142-147.
55. de Arruda JAA, Schuch LF, Abreu LG, Silva LV de O, Mosconi C, Monteiro JLGC, et al. A multicentre study of oral paracoccidioidomycosis: Analysis of 320 cases and literature review. *Oral Dis*. 2018;24(8):1492-1502.
56. Mario DN, Schwingel D, Jaques PJ da S, Bielowons GK, Giroto LP dos S, Malvestio LMM. Paracoccidioidomycosis in the northern region of Rio Grande do Sul. *Rev Epidemiol Controle Infecç*. 2020;10(4):414-419.
57. Pacheco FB, Venier NAB, Bueno AL, de Almeida AL, Milman L, Koehler A, et al. Isolated cutaneous lesion in paracoccidioidomycosis: a suggestive case of acquisition through cutaneous inoculation. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2021;63:e22.

58. Franz APG, da Silva AFM, Albuquerque AB, Rovani ALB, Bonacina P, Barbosa G da L, et al. Paracoccidioidomicose: perfil clínico e epidemiológico de pacientes internados em Passo Fundo - RS. *Rev Med (São Paulo)*. 2022;101(2):e-194149.
59. Koehler A, Girardi FM, Neto LK, de Moraes PC, Junior VF, Scroferneker ML. Head and neck manifestations of paracoccidioidomycosis: A retrospective study of histopathologically diagnosed cases in two medical centers in Southern Brazil. *J Mycol Med*. 2022;32:101292.
60. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Rio Grande do Sul - Panorama [Internet]. Brasil: IBGE; 2023 [cited 2023 Aug 7]. Available from: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rs/panorama>
61. Albano AP, Klafke GB, Brandolt TM, Da Hora VP, Minello LF, Jorge S, et al. Wild animals as sentinels of *Paracoccidioides brasiliensis* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathologia*. 2014;177(3-4):207-215.
62. Albano AP, Klafke GB, Brandolt TM, Da Hora VP, Nogueira CE, Xavier MO, et al. Seroepidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in horses from Rio Grande do Sul, Brazil. *Braz J Microbiol*. 2015;46(2):513-517.
63. Teles AJ, Klafke GB, Cabana ÂL, Albano AP, Xavier MO, Meireles MC. Serological Investigation into *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Dogs from Southern Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathologia*. 2016;181(3-4):323-328.
64. Mendes JF, Von Groll A, Poester VR, Brasil CL, Brandolt TM, Klafke GB, et al. *Paracoccidioides* spp. in Soil from the Pampa Biome in Southern Brazil. *Curr Microbiol*. 2019;76(2):258-262.
65. Mendes JF, Poester VR, Von Groll A, Meireles MCA, Xavier MO. Molecular detection of *Paracoccidioides* in soil from an urban area of southern Brazil. *Rev Soc Bras Med*. 2020;53:e20190172.
66. Mendes JF, Klafke GB, Albano APN, Cabana ÂL, Teles AJ, de Camargo ZP, Xavier MO, Meireles MCA. Paracoccidioidomycosis infection in domestic and wild mammals by *Paracoccidioides lutzii*. *Mycoses*. 2017;60(6):402-406.
67. dos Santos WA, da Silva BM, Passos ED, Zandonade E, Falqueto A. Associação entre tabagismo e paracoccidioidomicose: um estudo de caso-controle no Estado do Espírito Santo, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2003;19(1):245-253.
68. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Conheça o Brasil - População: Cor ou raça. Brasil: IBGE; 2023 [cited 2023 Aug 7]. Available from: <https://educa.ibge.gov.br/jovens/conheca-o-brasil/populacao/18319-cor-ou-raca.html>

69. Londero AT, Ramos CD, Lopes JO, Benevenga JP. “Reservárea” da paracoccidioidomicose no Rio Grande do Sul. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1972;14(6):377-380.
70. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol*. 2009;52(2):273-283.
71. Hahn RC, Rodrigues AM, Della Terra PP, Nery AF, Hoffmann-Santos HD, Góis HM, et al. Clinical and epidemiological features of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(6):e0007437.
72. Marques-da-Silva SH, Rodrigues AM, de Hoog GS, Silveira-Gomes F, Camargo ZP. Occurrence of *Paracoccidioides lutzii* in the Amazon region: description of two cases. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;87(4):710-714.
73. Arantes TD, Theodoro RC, Da Graça Macoris SA, Bagagli E. Detection of *Paracoccidioides* spp. in environmental aerosol samples. *Med Mycol*. 2013;51(1):83-92.
74. Kruschewsky WLL, Patricio SA, Bahiense IC, Maifrede SB, Pôssa AP, de Camargo ZP, et al. Paracoccidioidomycosis cases by *Paracoccidioides lutzii* in southeastern Brazil. *Braz J Microbiol*. 2023.
75. Mattos K, Cocio TA, Chaves EGA, Borges CL, Venturini J, de Carvalho LR, et al. An update on the occurrence of *Paracoccidioides* species in the Midwest region, Brazil: Molecular epidemiology, clinical aspects and serological profile of patients from Mato Grosso do Sul State. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021;15(4):e0009317.
76. Queiroz Júnior L de P, de Camargo ZP, Tadano T, Rodrigues AM, Takarara DT, Gegembauer G, et al. Serological and antigenic profiles of clinical isolates of *Paracoccidioides* spp. from Central Western Brazil. *Mycoses*. 2014;57(8):466-872.
77. Rodrigues AM, Kubitschek-Barreira PH, Pinheiro BG, Teixeira-Ferreira A, Hahn RC, de Camargo ZP. Immunoproteomic Analysis Reveals Novel Candidate Antigens for the Diagnosis of Paracoccidioidomycosis Due to *Paracoccidioides lutzii*. *J Fungi (Basel)*. 2020;6(4):357.
78. Conti Días IA. On the unknown ecological niche of *Paracoccidioides brasiliensis*: our hypothesis of 1989: present status and perspectives. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2007;49(2):131-134.
79. Millington MA, Nishioka S de A, Martins ST, dos Santos ZMG, de Lima Júnior FEF, Alves, RV. Paracoccidioidomicose: abordagem histórica e perspectivas de implantação da vigilância e controle. *Epidemiol Serv Saude*. 2018;27(núm.esp):e0500002.

80. de Sugiura IMS, Ono MA. Compulsory notification of paracoccidioidomycosis: A 14-year retrospective study of the disease in the state of Paraná, Brazil. *Mycoses*. 2022;65(3):354-361.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo foi o primeiro a propor a utilização de espectroscopia FTIR para titulação de anticorpos, além de ter expandido e mais bem caracterizado o uso da técnica para diagnóstico da PCM.

Na utilização para diagnóstico, foram propostas duas metodologias diferentes: uma com a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e uma com a análise discriminante linear (LDA). Em ambas, foi obtido 100% de sensibilidade, especificidade e acurácia, sendo possível diferenciar os soros de pacientes com PCM dos soros de indivíduos saudáveis e de pacientes com outras micoses sistêmicas. A diferenciação da PCM de outras micoses (aspergilose, criptococose e histoplasnose) e a obtenção de 100% nos três parâmetros avaliados destaca a presente pesquisa em relação ao outro estudo que já propôs a espectroscopia FTIR para diagnóstico da PCM.

Já a utilização de espectroscopia FTIR para titulação de anticorpos, especificamente no soro de pacientes com PCM, foi uma aplicação pioneira da técnica. Utilizando a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), foi possível realizar a predição dos títulos de anticorpos com um erro mínimo, obtendo coeficiente de determinação maior que 0,9999. Essa aplicação ganha destaque pois pode substituir as técnicas usuais (produção de antígenos e testes sorológicos tradicionais), com as principais vantagens sendo a rapidez da análise e o custo reduzido, sem geração de resíduos e necessidade de reagentes.

Assim, nesta pesquisa, foram propostas duas aplicações da espectroscopia FTIR que se mostraram promissoras para melhorar o manejo clínico de pacientes com PCM.

9. PERSPECTIVAS

São elencadas as seguintes perspectivas para estudos futuros nesta mesma linha de pesquisa:

- Desenvolver um método diagnóstico da PCM a partir de espectros obtidos em espectrômetro de FTIR compacto, mais interessante para uma aplicação clínica;
- Desenvolver um método baseado em espectroscopia FTIR que permita diferenciar e diagnosticar em um único modelo a paracoccidiodomicose, a aspergilose, a criptococose e a histoplasmose;
- Desenvolver modelagem para titulação de anticorpos com uma maior quantidade de amostras, e com amostras com títulos que não foram incluídos no presente estudo (como 1:512);
- Desenvolver modelagem para titulação de anticorpos considerando amostras de pacientes de PCM infectados por *P. lutzii*;
- Desenvolver modelagem para titulação de anticorpos considerando espectros adquiridos pela via úmida.

ANEXO 1 – STROBE Checklist

	Item No	Recommendation	Page No
Title and abstract	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract	1, 5, 6
		(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found	5, 6
Introduction			
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported	22, 23
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses	108
Methods			
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper	
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection	
Participants	6	(a) <i>Cohort study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up <i>Case-control study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of case ascertainment and control selection. Give the rationale for the choice of cases and controls <i>Cross-sectional study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants	
		(b) <i>Cohort study</i> —For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed <i>Case-control study</i> —For matched studies, give matching criteria and the number of controls per case	
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable	141-143
Data sources/ measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group	158-161 179-180
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias	
Study size	10	Explain how the study size was arrived at	
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why	
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding	
		(b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions	
		(c) Explain how missing data were addressed	
		(d) <i>Cohort study</i> —If applicable, explain how loss to follow-up was addressed <i>Case-control study</i> —If applicable, explain how matching of cases and controls was addressed <i>Cross-sectional study</i> —If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy	
		(e) Describe any sensitivity analyses	

Continued on next page

Results		Page No
Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed (b) Give reasons for non-participation at each stage (c) Consider use of a flow diagram
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders (b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest (c) <i>Cohort study</i> —Summarise follow-up time (eg, average and total amount)
Outcome data	15*	<i>Cohort study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures over time <i>Case-control study</i> —Report numbers in each exposure category, or summary measures of exposure <i>Cross-sectional study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included (b) Report category boundaries when continuous variables were categorized (c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses
Discussion		
Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives
Limitations	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results
Other information		
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based

143-151
161-169
181-186

143-151
161-169
187-189

*Give information separately for cases and controls in case-control studies and, if applicable, for exposed and unexposed groups in cohort and cross-sectional studies.

Note: An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at www.strobe-statement.org.