



Características de las Conidias de Paracoccidioides brasiliensis

Ángela Restrepo¹.

Beatriz H. Aristizábal².

Ángel González³.

María Del Pilar Jiménez⁴.

Beatriz L. Gómez⁵.

Juan McEwen⁶.

Luz E. Cano⁷.

¹Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Medellín, Colombia.
angelares@geo.net.co

²Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Medellín, Colombia.

³Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Medellín, Colombia.

⁴Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Medellín, Colombia.

⁵Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Medellín, Colombia. St John's Institute of Dermatology. Guy's Hospital, Londres, Inglaterra.

⁶Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Medellín, Colombia. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

⁷Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Medellín, Colombia. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 31 de Diciembre del 2000 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

RESUMEN

La investigación sobre Paracoccidioides brasiliensis ha estado centrada en la levadura, posiblemente por la carencia de elementos distintivos en el micelio. En 1942 se anotó por primera vez la presencia de esporos en las hifas del hongo. Posteriormente, investigadores brasileiros, venezolanos y argentinos demostraron la producción de "aleurias" en cultivos hechos

en sustratos naturales. Desde 1972 hemos estado investigando las conidias logrando obtenerlas en abundancia y tratarlas como unidades independientes. Se ha definido su forma y tamaño, constatando la presencia de todos los elementos de una célula eucariótica competente. Se demostró que exhibían el dimorfismo térmico y que, en ratones, eran capaces de convertirse en levaduras produciendo lesiones pulmonares progresivas y diseminación posterior a otros órganos. En el ratón hay un claro predominio por los machos. Estudios sobre la interrelación macrófago-conidia han revelado que estas pequeñas, pero versátiles, estructuras reproductoras permiten una mejor comprensión de la relación hospedero-*P. brasiliensis*.

PALABRAS CLAVE: *Paracoccidioides brasiliensis*, micelio, características de las conidias, propágulos infecciosos, dimorfismo, modelo experimental, paracoccidioidomicosis.

CHARACTERISTICS OF PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS CONIDIA

SUMMARY

Research on *Paracoccidioides brasiliensis* has centered in the yeast cell probably because the lack of distinctive features in the mycelium. In 1942 and for the first time, lateral spores were noticed in the fungus' hyphae. Later on, Brazilian, Venezuelan and Argentinean researchers described "aleurias" in cultures done in natural substrates. Since 1972 we became interested in the conidia; we have obtained them in large numbers and have treated them as individual units. Their shape and size have been defined and the presence of all the elements of a competent eukaryotic cell have been demonstrated. Conidia exhibit thermal dimorphism and in mice, are able to convert to yeasts producing progressive pulmonary lesions with further dissemination to other organs. The preference for the male gender has been clearly demonstrated in mice. Studies on the macrophage-conidia interaction are revealing that these versatile structures allow a better understanding of the host- *P. brasiliensis* interactions.

KEY WORDS: *Paracoccidioides brasiliensis*, mycelium, characteristics of conidia, infectious propagules, dimorphism, experimental models, paracoccidioidomycosis.

INTRODUCCIÓN

Generalidades sobre la Paracoccidioidomicosis

La paracoccidioidomicosis (PCM) es una enfermedad endémica severa que ocasiona morbilidad y mortalidad importante en personas residentes en la zona endémica, restringida a América Latina. Es producida por el hongo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, el que se comporta como una levadura a 36-37°C y como un moho por debajo de 26° C. La PCM es más frecuente en adultos y en agricultores, predominando en hombres con una relación de 15 hombres por una mujer (1-6).

Cerca del 80% de los casos informados corresponden al Brasil, país al que siguen a gran distancia Venezuela, Colombia y Ecuador (2,3,5). En el Brasil la incidencia anual oscila entre 1-3 casos por 100.000 habitantes (3,7). Para Colombia esta cifra es menor y varía entre 0,1 – 2,4 casos por millón de habitantes (8). En cuanto a la mortalidad, se ha reportado que en Brasil y para el período comprendido entre 1980 y 1995, el coeficiente de mortalidad alcanzó la cifra de 1.486 muertes por millón de habitantes (7). En Colombia no se conoce la tasa de mortalidad pero se tienen datos sobre la frecuencia de la infección subclínica medida por la reactividad a la prueba intradérmica con paracoccidioidina, la que en personas sanas es de 9% (9). Cifras mayores han sido obtenidas en otros países como Brasil y Venezuela (2,3). Es preocupante observar cómo en el Brasil ha ocurrido un aumento importante en el número de casos en niños y en aborígenes, grupos éstos en los cuales la enfermedad era

considerada inusual; este incremento ha sido atribuido a exposición temprana o masiva al hongo como consecuencia de actividades relacionadas con la deforestación (5,9).

El hábitat preciso de *P. brasiliensis* en la naturaleza es aún desconocido, pero se acepta que la infección ocurre por inhalación de las propágulas producidas por la fase miceliar del hongo, las cuales ocasionan una afección pulmonar primaria (2,10). El contacto del hongo con su hospedero accidental puede dar lugar a infección subclínica asintomática o a enfermedad clínicamente manifiesta; esta última puede revelarse bajo formas diversas dependiendo de la edad (formas juvenil y del adulto) y de la condición inmune del hospedero (aguda-subaguda o crónica) (2,3,11). Usualmente, el paciente con PCM llega a la consulta médica tardíamente, cuando ya la enfermedad ha progresado en el parénquima pulmonar, como lo revela la presencia de fibrosis al momento del diagnóstico en cerca del 20% de los pacientes (12). Por consiguiente, no es posible conocer las etapas iniciales resultantes de la interacción hospedero - *P. brasiliensis*, etapas que deben ser exploradas en modelos experimentales.

Poco se conoce sobre los mecanismos de virulencia que le permiten al hongo adaptarse a las condiciones presentes en el tejido del hospedero, para iniciar la colonización y proceder a la invasión (3,4,6). No obstante, puede asumirse que el dimorfismo es un factor de virulencia indispensable, pues en su ausencia no se daría la conversión de las conidias en levaduras en el pulmón, interrumpiéndose así la infección. Tal conversión dimórfica es la regla en modelos experimentales y se observa en cada paciente, por ende, su significado en la patogénesis de la PCM es claro (2,13).

Características de los propágulos de *P. brasiliensis*.

La forma levadura identifica al hongo ya que su aspecto es característico; se trata de una célula madre reproducida por gemación múltiple, dando lugar a varias blastoconidias hijas, las cuales adoptan el aspecto de un timón de barco. La gemación múltiple permite la identificación del hongo tanto en los tejidos del paciente como en los cultivos incubados a temperaturas de 36-37° C (2,3). La abundancia de este tipo de reproducción y la relativa rapidez de crecimiento de la levadura (alrededor de una semana), explican su frecuente uso en estudios experimentales (3,11). Las levaduras, así como también el micelio, son multinucleadas (14).

La forma miceliar obtenida a temperaturas entre 4 y 26 ° C, presenta características diferentes a las de la levadura, siendo sus colonias de crecimiento lento (aproximadamente 3 semanas) y están constituidas por micelios aéreos delgados, ramificados y provistos de septos; solamente se observan clamidosporos laterales e intercalares y a veces, se anota también la presencia de unas pocas estructuras reproductoras (conidias) (2,3). Estas últimas pueden observarse en ciertos aislamientos y bajo condiciones especiales como se describe en detalle a continuación (2).

Datos históricos sobre las conidias de *P. brasiliensis*.

Las primeras anotaciones sobre la existencia de estos propágulos fueron hechas en 1942 por Conant y Howell, investigadores norteamericanos que emprendieron un estudio comparativo de los agentes de las blastomicosis americanas, así llamadas por aquella época. Ellos anotaron la presencia de esporas laterales en el agente de la enfermedad suramericana (15). Posteriormente (1951), Neves y Bogliolo en el Brasil describieron la producción de “aleurias” (esporos que nacen terminal o lateralmente de una célula conidiógena), al cultivar el hongo en un medio de cultivo sólido con harina de maíz; fueron ellos también quienes encontraron por primera vez que los medios ricos en glucosa, tipo Sabouraud, eran inadecuados para su producción (16).

Algunos años después (1955) Borelli observó la producción de abundantes “aleurias” en microcultivos preparados en el mismo medio señalado arriba, y también en harina de fríjol (o frijol) (17). Posteriormente (1961), este investigador encontró que, previa esterilización, muestras de tierra y de excrementos de animales también permitían

la esporulación de la fase micelial de *P. brasiliensis* (18). La observación microscópica de estas estructuras fue lograda, igualmente, por Negroni en 1966 (19). Años después (1971), también Pollak logró obtener el desarrollo de conidias usando medios pobres (20). Sin embargo, fue Borelli quien describió más detalladamente las conidias, cuestionando su papel en la reproducción de *P. brasiliensis* (18).

Los estudios anteriores fueron de tipo descriptivo y no llegaron a determinar las características de las conidias mismas ni a explorar sus capacidades como unidades reproductoras. Esta carencia de información sobre tales propágulos y, al mismo tiempo, el deseo de conocer la función que las conidias del hongo podrían cumplir en su ciclo de vida, llevó a emprender una serie de estudios sobre el tema, como se describe más detalladamente a continuación.

GENERALIDADES SOBRE LAS CONIDIAS DE *P. BRASILIENSIS*

Estas estructuras fueron observadas en aislamientos colombianos por Restrepo en 1970 (21), al realizar un estudio encaminado a determinar el crecimiento de la fase micelial de *P. brasiliensis* en tierras; en aquel momento se anotó su semejanza con las artroconidias intercalares y laterales, producidas por otros mohos patógenos como *Coccidioides immitis* (21,22). Posteriormente, se describieron con más detalle las características de tales propágulos de *P. brasiliensis* (23). No fue posible, sin embargo, producirlas en buen número por lo que se suspendió su estudio. A pesar de ello, se mantuvo el interés por las conidias y años después (1985) se emprenderían estudios metódicos encaminados a conocerlas mejor.

Se trabajó entonces con varios aislamientos de *P. brasiliensis* provenientes de pacientes con PCM, en un sistema de microcultivos preparados en medios pobres (agar agua, dextrosa sales), en los cuales se intentó seguir, paso a paso, el desarrollo y esporulación de los micelios. Se observó así cómo en algunos aislamientos del hongo - y luego de 8 semanas de incubación a 20-22° C - aparecían microconidias pedunculadas y artroconidias tálicas intercalares, algunas de las cuales daban lugar a un abultamiento lateral que resultaba en otra conidia (Fig. 1). Todas las conidias eran pequeñas y medían menos de 5 µm; estas observaciones permitieron comprobar las varias formas, el tamaño y la relación con el micelio parental de las conidias (24).

A pesar del avance anterior, para caracterizar las conidias era indispensable individualizarlas, separándolas del micelio que las originaba. Después de múltiples intentos se logró separarlas del micelio a partir de cultivos hechos en caja de Petri utilizando los medios pobres en nutrientes ya mencionados e incubando por 2-3 meses a temperaturas menores a 20 ° C (25) (Fig. 2). Bajo estas condiciones, era posible obtener por caja de Petri hasta un millón de conidias, 80% de las cuales se mostraban viables después de separadas (25).



Figura 1

Conidias implantadas en un micelio fértil. Observe conidias intercalares, pedunculares y sésiles (60X).

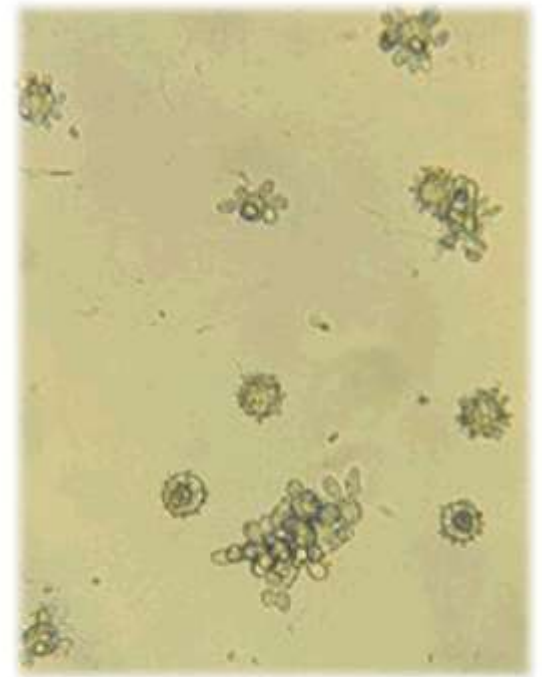


Figura 2

Conidia separada del micelio parental y arthroconidias unidas a un fragmento de micelio (Giemsa, 60X).

En este momento, era posible trabajar con las conidias como unidades independientes. Puesto que era necesario conocer si poseían o no el dimorfismo térmico, se exploró la posible influencia de la temperatura sobre las conidias. Para ello se retornó a los microcultivos, sembrándolos con conidias e incubándolos separadamente tanto a 20-22° C como a 36° C, haciendo observaciones periódicas. A 20-22° C las conidias empezaban a emitir tubos germinales antes de las 24 horas y a las 96 horas, presentaban ya micelios septados y ramificados. Al incubar a 36° C las conidias adquirían inicialmente un aspecto redondeado para dar lugar, 132 horas después, a las levaduras con gemación múltiple (aproximadamente 40 μ m diámetro) características de *P. brasiliensis* (Fig. 3) (26).



Figura 3

Conidias convertidas en levaduras a 36° C; note también algunos propágulos con su forma original de conidias (microcultivo 40X)

A pesar de su pequeño tamaño (menos de 5 μm), las conidias presentaban el dimorfismo térmico convirtiéndose, al elevar la temperatura a 36° C, en células levaduras 9-10 veces mayores que ellas. Pero también eran igualmente capaces de emitir micelios al ser incubadas a temperaturas más bajas (20-22° C) (26). En otro contexto, los resultados anteriores revelaron que la conidia de *P. brasiliensis* es una estructura inestable, de transición y como tal, incapaz de mantenerse indefinidamente bajo esta forma; la influencia de la temperatura determina si se hace micelio o levadura.

Como era conocido, ya que tanto el micelio como las levaduras de *P. brasiliensis* eran multinucleadas (14), se quiso averiguar si las conidias también lo eran. Se incubaron suspensiones de conidias a 36° C por varias horas y se realizaron coloraciones especiales con mitramicina para la observación de núcleos, haciendo la lectura al microscopio de fluorescencia (27). Fue posible observar que las conidias eran uninucleadas al momento de comenzar el experimento. Sin embargo, 72-96 horas después de su transición a levaduras, 80% de ellas presentaban ya 4-5 núcleos (27).



Figura 4

Conidia que muestra los elementos de célula eucariótica. Microscopia electrónica de transmisión (X60.000).

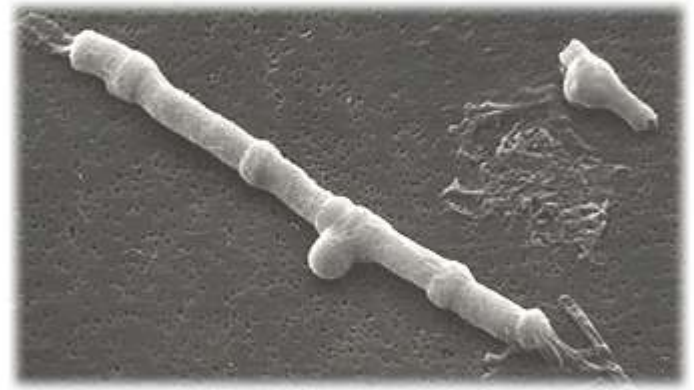


Figura 5

Aspecto de los micelios septados, arthroconidias intercalares y conidia aislada. Microscopia electrónica de barrido (X 2000)

Una contribución de la mayor importancia al conocimiento de la ultraestructura de las conidias fue la realizada años más tarde (1991) por Samsonoff y Edwards (28,29). Al utilizar microscopia electrónica, tanto de transmisión como de barrido, fue posible demostrar la presencia de todos los componentes esenciales de una célula eucariótica fisiológicamente competente; a saber, un núcleo acompañado de nucleólo, mitocondrias, ribosomas y peroxisomas, además de inclusiones de reserva, especialmente aquellas compuestas por lípidos (Fig. 4). Adicionalmente, se observó la presencia de abundante material fibrilar en la superficie celular (28,29). Estos estudios permitieron configurar más precisamente el aspecto de las arthroconidias intercalares, de las conidias secundarias y de las pedunculadas e igualmente, determinar la presencia de septos en los micelios del hongo (Fig. 5) y observar cómo muchos de aquellos aparecían vacíos (28,29). Cuando se considera la escasa vitalidad de estos micelios, el tiempo prolongado requerido para la producción de las conidias y el hecho de que la producción de éstas se logre sólo bajo condiciones de pobreza nutricional, es lógico señalar -como lo hiciera Edwards-, que las conidias de *P. brasiliensis* representan un evento terminal en la evolución de la fase micelial del hongo (29).

CAPACIDAD INFECCIOSA DE LAS CONIDIAS DE *P. BRASILIENSIS*

El paso crucial en el estudio de estos propágulos consistiría en demostrar que eran capaces de adaptarse, hacer la transición a levaduras y reproducirse en los tejidos. Se consideró entonces el uso de los conidias en un modelo desarrollado previamente en ratones BALB/c, inoculados con las levaduras de *P. brasiliensis* (30). El mayor inconveniente era disponer de un número suficiente de conidias para inocular los ratones, pues para lograr la infección por vía aérea se requerían 20 millones de levaduras por ratón. Se intentó, no obstante, con 1 millón de conidias por cada animal, encontrando lo siguiente (31):

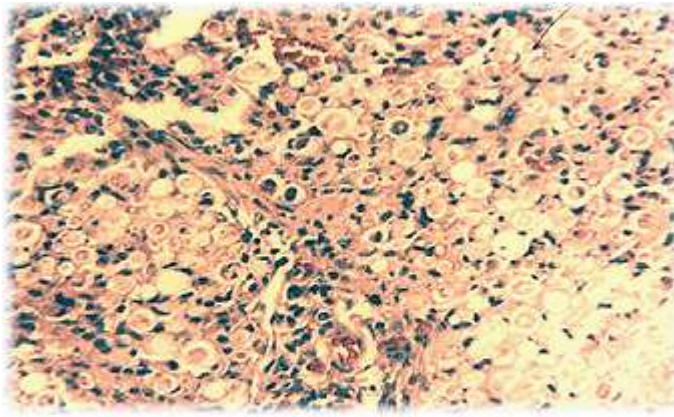


Figura 6
Tejido pulmonar de ratón BALB/C infectado con conidias. Observe la presencia de levaduras, el infiltrado celular y la consolidación del parénquima 8 semanas después de la infección (40X).

Poco después de la inoculación, las conidias eran visualizadas en los alvéolos pulmonares, donde daban lugar a una reacción inflamatoria creciente. Entre las 6 y las 12 horas, los propágulos habían cambiado de aspecto y aparecían redondeados; a las 18 horas post-infección, la conversión conidia-levadura multigemente ya había tenido lugar a nivel pulmonar. Además, 85% de los animales así inoculados desarrollaban una forma progresiva

de afección pulmonar, acompañada de diseminación a bazo (35%) y en menor proporción, a otros órganos (31). El cuadro histopatológico era similar al observado en el

modelo con levaduras, anotándose la presencia de infiltrados bronconeumónicos, los cuales llegaban a la consolidación, con presencia de células gigantes y de granulomas, así como de levaduras de *P. brasiliensis* en multiplicación activa (Fig. 6) (31). Con este experimento, quedó definitivamente demostrado que las conidias no solo respondían al estímulo de la temperatura; también eran capaces de inducir paracoccidioidomicosis por vía aérea. Su tamaño no era óbice para manifestar una gran capacidad de adaptación al tejido y causarle daños al animal.

Una observación más prolongada de la infección experimental desencadenada por las conidias, señaló la presencia de cambios estructurales en el parénquima pulmonar de los ratones (32). Para explorar tales cambios detalladamente se llevó a cabo un experimento tendiente a estudiar el desarrollo de la fibrosis. Después de 8-12 semanas post-infección, cuando la formación de granulomas era aparente, las fibras de colágeno aumentaban de tamaño en 66% y 83% de los animales, respectivamente. También se anotaba marcada desorganización de las fibras de colágeno II, todo lo cual llevaba a la consolidación pulmonar y a la fibrosis (33), tal como sucedía en los pacientes (12). Igualmente, se demostró la influencia de algunos factores de la respuesta inmune del animal de experimentación sobre los cambios fibróticos (34).

Con el fin de determinar el verdadero papel del trauma como puerta de entrada del hongo de acuerdo con lo propuesto en el pasado, se inocularon conidias directamente en la mucosa gingival de ratones BALB/c después de un ligero trauma (35). Las conidias se convertían en levadura como en el modelo anterior siendo posible recuperar el hongo de estos tejidos a las 24-72 horas post-infección. Posteriormente a las 5-10 semanas, los cultivos se volvían negativos, indicando que la infección había sido controlada. Observaciones posteriores revelaron cultivos positivos en la mucosa gingival en 12% de los animales. No obstante, la diseminación a los órganos internos (pulmón, bazo, hígado), frecuentemente comprometidos en la paracoccidioidomicosis humana, fue observada en menos del 3% de los ratones. Por consiguiente, este patrón no se ajustaba al de la enfermedad observada en los pacientes, desvirtuando así la ruta traumática como puerta de entrada de *P. brasiliensis* (35).

LAS CONIDIAS DE *P. BRASILIENSIS* Y SU PAPEL EN LA PATOGÉNESIS DE LA PCM

A partir de los años 90 y hasta el presente, las conidias de *P. brasiliensis* han permitido configurar varias líneas de investigación, algunas de ellas desarrolladas en colaboración con investigadores de otros países. En forma breve se destacan las siguientes:

Efecto inhibidor in vitro e in vivo de la hormona femenina 17 beta estradiol sobre la conversión de la conidia en levadura (en cooperación con DA Stevens y K. V. Clemons, California Institute for Medical Research, Santa Clara Valley Medical Center and Stanford University, California, USA).

Estos estudios mostraron que no solamente era posible inhibir el paso conidia-levadura en microcultivos (36), si no también en el modelo en ratones. Los machos se comportaban en forma diametralmente diferente a las hembras (37); en efecto, los primeros desarrollaban una PCM severa, diseminada mientras que las segundas detenían la infección. Adicionalmente, la respuesta inflamatoria era distinta (38), pues los machos desarrollaban extensos infiltrados con formación de granulomas laxos y levaduras del hongo en multiplicación activa. En las hembras, nada de lo anterior sucedía porque las conidias eran destruidas y la respuesta inflamatoria era mínima. Si bien la influencia de la hormona era clara, es muy probable que en el modelo animal, las hembras posean también una respuesta inmune más efectiva por acción del estradiol (38).

Estudios sobre la interacción macrófago-conidia (con la colaboración inicial de E. Brummer y DA Stevens, California Institute for Medical Research, Santa Clara Valley Medical Center and Stanford University, California, USA. A. Hamilton, Dermatology Laboratory, Thomas Guy House, Guy's Hospital, London, United Kingdom contribuyó también en algunos de estos estudios).

Esta línea de investigación ha permitido comprender aspectos esenciales en la relación entre la conidia infecciosa, la levadura resultante del cambio de temperatura y el macrófago encargado de cumplir su función defensora en el hospedero. Los estudios iniciales demostraron la permisividad del macrófago al facilitar la conversión de la conidia en levadura y posteriormente, señalaron el efecto crucial del hierro en dicha interacción. Igualmente, se anotó el efecto activador de ciertas citoquinas (interferón gama IFN-Gamma) sobre la fagocitosis y la muerte intracelular de las conidias (39-41). Estudios posteriores demostraron la importancia del óxido nítrico, señalaron el papel de la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS) y de factores nucleares determinantes en la activación celular y permitieron comprender la complejidad de la intrincada interacción conidia-macrófago (42,43). Más recientemente, los esfuerzos se han dirigido al estudio de las etapas iniciales de la infección con las conidias, caracterizando las citoquinas proinflamatorias correspondientes a estas fases tempranas y su posible papel en los mecanismos de defensa del hospedero (44).

El modelo experimental en ratones BALB/c infectados por la vía inhalatoria con conidias de *P. brasiliensis* ha revelado que las primeras horas post-infección son cruciales y pueden, inclusive, definir el curso a tomar por el proceso infeccioso (2). Estudios en curso (Cano, LE. comunicación personal, CIB) han señalado que los resultados iniciales de tal encuentro señalan el rumbo de la infección sin importar la corta vida de las conidias en los tejidos del hospedero. Son las pocas horas requeridas para su conversión en levaduras y la respuesta del hospedero, los eventos que marcan definitivamente el curso de la interacción.

Presencia de melanina en las conidias de *P. brasiliensis* (en colaboración con AJ Hamilton, Dermatology Laboratory, Thomas Guy House, Guys Hospital, London, UK, y J. Nosanchuk and A. Casadevall, Department of Physiology and Biophysics, Microbiology and Immunology, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, USA).

Por métodos físico-químicos e inmunológicos se demostró que las conidias poseen, y/o sintetizan, compuestos melánicos inmediatamente después de colectadas y también en las etapas iniciales del modelo experimental (45). Con base en el reconocimiento de la melanina como factor de virulencia, se ha señalado que este pigmento bien pudiera jugar un papel importante en la patogénesis de la PCM (45).

Refinamientos en la separación de las conidias (en colaboración con LF García, Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín)

Recientemente se llevó a cabo un estudio dirigido a liberar la suspensión final de conidias de los restos de micelio que suelen acompañarlas; para ello se utilizaron gradientes discontinuos de Percoll en PBS y sucrosa, técnica de separación a través de la cual se pueden separar células o partículas subcelulares cuya densidad se desconoce. Los mejores resultados se obtuvieron al hacer dos pases consecutivos por Percoll al 95% en sucrosa 0,25M (densidad 1.167), siendo posible obtener conidias con 82% de pureza (coeficiente de variación de 11,7). Igualmente, la eficiencia de recuperación de conidias aumentó de 2,5 millones de conidias a 5,1 millones por caja de Petri. El procedimiento no afectó la viabilidad de las conidias y permitió obtener inóculos limpios de fragmentos miceliares destinados a la realización de experimentos que determinen con mayor precisión la relación entre el hospedero y el principal propágulo infeccioso de *P. brasiliensis* (46).

Los experimentos arriba mencionados han revelado interesantes facetas sobre los pequeños propágulos de *P. brasiliensis*; así mismo, estos estudios han mostrado que su empleo abre caminos, los cuales permiten una mejor comprensión de la relación hospedero-hongo en la PCM. La investigación suele progresar lentamente, paso a paso, pero siempre cumple su propósito al permitir un mejor conocimiento del funcionamiento y de la interrelación entre seres vivos.

REFERENCIAS

1. Bethlem EP, Capone D, Maranhao B, Carvalho CR, Wanke B. Paracoccidioidomycosis. Curr Opin Pulm Med 5:319-325, 1999.
2. Restrepo-Moreno A. Paracoccidioidomycosis. In Clinical Mycology. Dismukes WE, Pappas PG, and Sobel, J, eds, Oxford University Press, New York, 2003:328-345.
3. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC et al. Paracoccidioidomycosis. In Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, et al., eds. Tratado de Micología Médica Lacaz. 9th Ed. Sao Paulo: Sarvier Publishers, 2002: 639-729.
4. San-Blas G, Niño-Vega G, Iturriaga T. Paracoccidioides brasiliensis and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis,

- epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol* 2002; 40:225-242.
5. Blotta MH, Mamoni RL, Oliveira SJ, et al. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61: 390-394.
 6. Restrepo, A., Benard, G. Paracoccidioidomycosis. Chapter 202. In Feigin, Cherry, Demmler, Kaplan. *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*, 5th edition, Vol 1 WB Saunders. October 2004, pp 2592-2601
 7. Coutinho ZF, Silva D, Lazera M, et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saude Publica* 18:1441-1454. 2002.
 8. Torrado E, Castañeda E, de la Hoz F, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: definición de las áreas endémicas de Colombia. *Biomédica* 20: 327-334, 2000
 9. Coimbra CEA, Wanke B, Santos RV, et al. Paracoccidioidin and histoplasmin sensitivity in the Tupí-Mondé Amerindian populations from Brazilian Amazonia. *Ann Trop Med Parasitol* 88:197-207,1994.
 10. Restrepo A., McEwen JG, Castañeda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol* 39: 232-241, 2001
 11. Camargo ZP, Franco MF. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17: 41-48.
 12. Tobón A.M., Agudelo CA, Osorio ML, Alvarez DL, Arango M, Cano LE, Restrepo A. Residual pulmonary abnormalities in adult patients with chronic paracoccidioidomycosis: Prolonged observations after itraconazole therapy. *Clinical Infectious Diseases*, 37: 898-904, 2003
 13. Mendes-Giannini MJS, Taylor ML, Bouchara JB, Burger E, Calich VLG, Escalante ED, Hanna SA, et al. Pathogenesis II: Fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. *Med Mycol* 38 (Suppl 1):113-123, 2000.
 14. Queiroz-Telles F. *Paracoccidioides brasiliensis*: Ultrastructural findings. In Franco M, Lacaz CS, Restrepo A, et al. (eds.): *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, CRC Press, 1994, pp. 27-48.
 15. Conant NF, Howell A. The similarity of the fungi causing South American Blastomycosis (paracoccidioidomycosis) and North American blastomycosis (Gilchrist disease). *J Investigat Dermatol* 5: 353-370, 1942
 16. Neves JS, Bogliolo L. Researches on the etiological agents of the American blastomycosis. I Morphology and systematics of the Lutz disease agent. *Mycopathol Mycol Appl* 5: 133-1423, 1951
 17. Borelli D. Las aleurias de *Paracoccidioides brasiliensis*. *Resúmenes VI Cong. Venezolano Cienc. Med.* 2241-2253, 1955
 18. Borelli D. Hipótesis sobre la ecología de *Paracoccidioides*. *Dermatol. Venezolana* 3: 130-132, 1961
 19. Negroni P. Micosis Profundas. Las Blastomycosis y Coccidioidomycosis. Capítulo IX Patología y Micología de la micosis de Lutz. Publicación especial N° 2, Comisión de Investigación Científica, Provincia de Buenos Aires, Argentina, 1966, pp. 181-196
 20. Pollak L. Aleuriospores of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathol Mycol Appl* 45: 217-219, 1971
 21. Restrepo A, Moncada LM, Quintero M. Effects of hydrogen ion concentration of temperature on the growth of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil extracts. *Sabouraudia*, 7: 207-215, 1970
 22. Cole GT, Sun SH. Arthroconidium-spherule-endospore transformation in *Coccidioides immitis*. In PJ Szanislo (ed) *Fungal Dimorphism*, Plenum Press, New York, 1985, pp 282-333

23. Restrepo A. A reappraisal of the microscopical appearance of the mycelial phase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia*, 8:141-144, 1970.
24. Bustamante-Simon B, McEwen J, Tabares AM, Arango M, Restrepo A. 1985. Characteristics of the conidia produced by the mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia: J. Med. Vet. Mycol.* 23: 407-411, 1985.
25. Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Patiño MM. A technique to collect and dislodge conidia produced by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. *J. Med. Vet. Mycol.* 24: 245-248, 1986.
26. Restrepo BI, McEwen J, Salazar ME, Restrepo A. Morphological development of the conidia produced by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. *J. Med. Vet. Mycol.* 24: 337-339, 1986.
27. McEwen JG, Restrepo BI, Salazar ME, Restrepo A. 1987. Nuclear staining of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *J. Med. Vet. Mycol.* 25: 343-345
28. Samsonoff WA, Edwards, MR, Salazar ME, McKee ML, Restrepo A, Cano LE, MR Edwards. Scanning electron microscopy of the conidia produced by the mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia* 114: 9-15, 1991.
29. Edwards MR, Salazar ME, Samsonoff WA, Cano LE, Ostrander GA, Restrepo A. Electron microscopic study of conidia produced by the mycelium of *P. brasiliensis*. *Mycopathol* 114; 169-177, 1991.
30. Bedoya, V., McEwen, J.G., Tabares, A.M., Uribe, F., Restrepo, A. Pathogenesis of paracoccidioidomycosis. Histopathologic study of the experimental infection. *Mycopathol.* 94: 133-144, 1986
31. McEwen JG, Bedoya V, Patiño MM, Salazar ME, Restrepo A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J. Med. Vet. Mycol.* 25: 165-175, 1987).
32. Restrepo S, Tobón AM, Trujillo J, Restrepo A. 1992. Development of pulmonary fibrosis in mice during infection with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *J. Med. Vet. Mycol.* 30: 71-84
33. Cock AM, Cano LE, Vélez D, Aristizábal BH, Trujillo J, Restrepo A. Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidioidomycosis: Histopathological aspects in BALB/C mice infected with viable and non-viable propagules. *Rev Inst Med trop S Paulo* 42: 59-66, 2000.
34. Franco L., Navjar L, Gómez, BL, Restrepo S, Graybill JR, Restrepo A. Experimental pulmonary fibrosis induced by *Paracoccidioides brasiliensis* conidia: Measurement of local host responses. *Am J trop Med Hyg.* 58: 424-430, 1998.
35. Roldán JC, Tabares AM, Gómez BL, Aristizábal BE, Cock AM, Restrepo A. The oral route in the pathogenesis of paracoccidioidomycosis: An experimental study in BALB/c mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Mycopathologia* 151: 57-62, 2000
36. Salazar ME, Restrepo A, Stevens DA. Inhibition by estrogens of conidium to yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Inf. Imm.* 56: 711-713, 1988
37. Aristizábal BH, Clemmons KV, Stevens DA, Restrepo A. 1998 Morphological transitions of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: In vivo inhibition in females. *Infect. Imm.* 66: 5587-5591.
38. Aristizábal BH, Clemons KV, Cock, AM, Restrepo A. Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses. *Med Mycol*, 40: 169-178, 2001
39. Cano LE, Brummer E, Stevens DA, Restrepo, A. Fate of conidia from *Paracoccidioides brasiliensis* after ingestion by normal and cytokine treated macrophages. *Infect. Imm.* 60:

2096-2100, 1992.

40. Cano, L.E., Arango, R., Brummer, E., Stevens, D.A, Restrepo, A. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by pulmonary macrophages and the effect of cytokines. J. Med. Vet. Mycol. 30: 161-168, 1992.
41. Cano, L.E., Gomez, B., Brummer, E., Restrepo, A. and D.A. Stevens. Inhibitory effect of deferoxamine or macrophage activation on transformation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia ingested by macrophages: reversal by holotransferrin. Infect Imm 62: 1494-1496, 1994
42. González A, de Gregory W, Vélez D., Restrepo A., Cano LE. Nitric Oxide participation in the fungicidal mechanisms of gamma interferon murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia, Inf. Imm. 68: 2546-2552, 2000
43. González A, Aristizábal BH, Caro E, Restrepo A, Cano LE. Production of Nitric Oxide and expresión of iNOS and NFkB in peritoneal macrophages activated with interferon gamma. Ann Rev Biomed Sci. (Brazil) 4;133-139, 2003
44. González A., Sahaza J, Ortiz BL, Restrepo A, Cano LE. Production of proinflammatory cytokines during the early stages of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Med Mycol 41: 391-400, 2003
45. Gómez, BL, Nosanchuk JD, Díez S, Youngchim S, Aisen P., Cano LE, Restrepo A, Casadevall A, Hamilton AJ. Detection of Melanin-Like Pigments in the Dimorphic Fungal Pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* In Vitro and during Infection. Infect Immun 69, 5760–5767, 2001.
46. Jiménez M del P, A Restrepo, LF García, LE Cano. Separation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia through percoll gradients. Med. Mycol. Electronic edition, April 8, 2004 (5 pages).