

Paracoccidioides brasiliensis, agente causal de una micosis sistémica de alta prevalencia en América Latina*

Gioconda San-Blas

Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Centro de Microbiología y Biología Celular, Apartado 21827, Caracas 1020A, Venezuela.

RESUMEN

La paracoccidioidomicosis es una micosis sistémica humana causada por el hongo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. Su distribución geográfica se restringe a América Latina, especialmente Brasil, Colombia, Venezuela y Argentina, en donde constituye una de las micosis sistémicas más prevalentes de la región (1). Fue descrito por primera vez en 1908 por Lutz en Brasil (2) y sólo en 1937 en Venezuela por O'Daly (3). En este trabajo haremos una revisión general de la paracoccidioidomicosis y de su agente causal *P. brasiliensis*, tomando como base publicaciones desde 1989 hasta la fecha, apenas con menciones breves a trabajos anteriores. Se revisarán los siguientes temas: ecología y epidemiología, aspectos clínicos y patológicos, nuevos métodos de diagnóstico, terapia, aspectos inmunológicos (serodiagnóstico, inmunidad humoral, inmunidad celular, antígenos HLA), modulación de la virulencia, ultra-estructura, efectos biológicos de antibióticos, aspectos bioquímicos del dimorfismo.

Palabras Claves: *Paracoccidioides brasiliensis*, micosis sistémicas, patogenicidad, bioquímica de hongos, serología.

SUMMARY

Paracoccidioidomycosis is a human systemic mycosis caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Geographically it is restricted to Latin America, specially Brazil, Colombia, Venezuela and Argentina, where it is one of the most prevalent systemic mycosis (1). It was first described in 1908 by Lutz in Brazil (2) and only in 1937 in Venezuela by O'Daly (3).

*Artículo en homenaje al Dr. José Antonio O'Daly, quien fuera Individuo de Número (Sillón XXXIII) de la Academia de Medicina hasta su fallecimiento el 20-4-1992 y el primer investigador que reportó casos de paracoccidioidomicosis en Venezuela en 1937.

Presentado en la Academia Nacional de Medicina el 22 de abril de 1993.

In this paper we will revise the literature on the fungus and the disease, from 1989 onwards, with brief references to previous works. The following subjects are revised: ecology and epidemiology, clinical and pathologic aspects, new methods of diagnosis, therapy, immunologic aspects (serodiagnosis, humoral and cellular immunity, HLA antigens), modulation of virulence, ultrastructure, biologic effects of antibiotics, biochemical aspects of dimorphism.

EL HONGO Y SU HUESPED

Ecología y epidemiología

El *P. brasiliensis* se propaga como levadura (L) a temperatura corporal o in vitro a 37 °C y como micelio (M) a temperaturas inferiores a 25 °C (Figura 1). El nicho ecológico de la fase saprofita es desconocido, sugiriéndose que los micelios, clamidosporas o conidias podrían ser las formas infecciosas (4). Hay pocos datos sobre el aislamiento de *P. brasiliensis* del suelo (5,6) que dicen poco de la localización del hongo en la naturaleza.

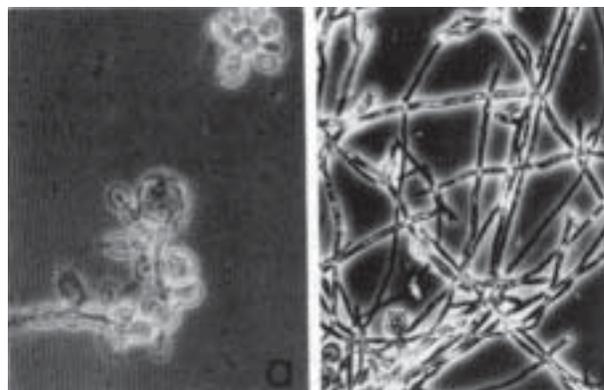


Figura 1. *P. brasiliensis*, fases L (a) y M (b).
Aumento: 1 500 x.

Los esfuerzos por establecer la verdadera prevalencia de la paracoccidioidomicosis (infección y enfermedad) son de importancia para comprender la magnitud de este problema de salud pública. Los estudios epidemiológicos se han realizado principalmente con pruebas dérmicas en las áreas endémicas usando paracoccidioidinas preparadas en el laboratorio a partir de ensayos diversos que atentan contra la homogeneidad de las preparaciones. De allí que las comparaciones entre estos resultados deben ser tomadas con cautela, añadiendo el hecho de que las posibilidades de reacciones cruzadas con antígenos de otros hongos son muy altas en los sistemas utilizados (7). En todo caso, los resultados indican que si bien la infección (medida como reacción positiva a la paracoccidioidina) es igualmente prevalente en ambos sexos, la enfermedad activa se localiza con preferencia en hombres, lo cual ha sugerido un papel de las hormonas sexuales en el desarrollo de la enfermedad (8). Los datos epidemiológicos más recientes indican que de 138 pruebas en el Estado de Ceará en Brasil, 61,5% reaccionaron en forma positiva a la histoplasmina y 25,5% a la paracoccidioidina (9). De esta última, 40 de las 44 pruebas positivas, fueron también positivas a histoplasmina. A pesar de las consideraciones que hemos hecho en cuanto a reacciones cruzadas, los autores se inclinan a pensar en doble infección en todos estos casos. Datos recientes de Panamá (10) sugieren reacciones positivas en el 22% de la población panameña y una prevalencia de 12,73% de niños.

Aspectos clínicos y patológicos de la paracoccidioidomicosis

El *P. brasiliensis* invade al huésped preferentemente por la ruta nasal, dando lugar a las diferentes formas clínicas de la paracoccidioidomicosis que hoy en día se clasifican en: agudas o subagudas (tipo juvenil) y forma crónica (tipo adulto), dependiendo en la evolución y localización de las lesiones, con desarrollos uni o multifocales (Cuadro 1) (11,12). Recientemente, algunas localizaciones raras de *P. brasiliensis* han sido reportadas, entre ellas, el primer caso de compromiso del sistema nervioso periférico a través de los nervios X (síndrome de Tapia) y XII (13) y un caso raro de paracoccidioidomicosis intraespinal y cerebral (14).

Desde la aparición del SIDA en 1980, algunos casos de paracoccidioidomicosis en estos pacientes han sido reportados (15-17), razón por la cual se

Cuadro 1

Nueva clasificación de la paracoccidioidomicosis (12)

-
1. Paracoccidioidomicosis-Infección
 2. Paracoccidioidomicosis-Enfermedad
 - 2.1. Forma aguda o sub-aguda (tipo juvenil)
 - 2.1.1. Moderada
 - 2.1.2. Severa
 - 2.2. Forma crónica (tipo adulto)
 - 2.2.1. Unifocal
 - Suave
 - Moderada
 - Severa
 - 2.2.2. Multifocal
 - Suave
 - Moderada
 - Severa
 3. Formas residuales (secuelas)
-

recomienda que en los países endémicos, la paracoccidioidomicosis sea incluida en la lista de infecciones oportunistas observadas en el SIDA, a los efectos de su detección temprana.

Nuevos métodos complementarios de diagnóstico

La paracoccidioidomicosis compromete con frecuencia a los pulmones. Por esta razón, el esputo es usado para detectar el hongo y establecer el diagnóstico. No obstante, la escasez de células fúngicas en el esputo podrían conducir a un diagnóstico incorrecto. Resultados recientes (18) indican que muestras seriadas preparadas en bloque y láminas teñidas con metenamina de plata presentaban índices de positividad del 83%, a lo cual se añade la posibilidad de preservación indefinida del material.

En razón de que las glándulas adrenales parecen estar involucradas en 85-90% de los pacientes con paracoccidioidomicosis, Tendrich y col. (19) usaron tomografía computarizada (TC), ultrasonografía (US) y respuestas adrenocorticales a ACTH sintética para estudiar la participación de las glándulas adrenales en 15 pacientes con paracoccidioidomicosis. Los resultados de TC indicaron modificaciones de la superficie adrenal en 5 pacientes, sin calcificaciones, y en general, asimetría de las lesiones, en contraste con la simetría encontrada en casos de histoplasmosis o criptococosis. A través de TC, el 43% de anormalidades en las glándulas adrenales fue revelado. El uso de US solo permitió la detección de 71% de los casos, y la combinación

de ambas técnicas elevó la sensibilidad a 85%. No hubo una correlación evidente entre las respuestas a ACTH y los cambios morfológicos en las adrenales, de acuerdo con los datos revelados por TC o US.

En cuanto a la importancia y necesidad de diagnósticos acertados en la paracoccidioidomycosis, podemos destacar los datos revelados por Almeida y col. (20), quienes correlacionaron diagnósticos anatómo-clínicos y estudios post-mortem en 200 autopsias en el Hospital de Brasilia, encontrando que las enfermedades más frecuentes no diagnosticadas (falsos positivos) eran: tuberculosis (69,5%), paracoccidioidomycosis (57,1%), sepsis (53,1%) y Chagas (44,4%), con una concordancia de apenas 48,5% entre los datos clínico-patológicos y las autopsias. Además, los autores concluyeron que en el 9,5% de los diagnósticos errados, podría haber habido un pronóstico diferente en favor de la vida del paciente. Aunque los resultados de este estudio no pueden generalizarse a todos los hospitales, sí ponen una nota de cautela al problema de los diagnósticos errados y al consiguiente tratamiento, a riesgo de la vida del paciente.

Terapia

El tratamiento tradicional de la paracoccidioidomycosis con sulfamida ha sido sobrepasado en su éxito terapéutico por cotrimoxazol (cotrimazina, una combinación de trimetoprim y sulfametoxazol) debido al efecto sinérgico de ambas drogas contra el *P. brasiliensis*. El tratamiento de paracoccidioidomycosis en 22 pacientes de sexo masculino (21) consistió en una tableta de cotrimazina (820 mg sulfadiazina + 180 mg trimetoprim por tableta) en forma oral cada 12 horas por 6 meses, seguido de una terapia de mantenimiento de 500 mg de sulfadoxina dos veces por semana. La única falla en el tratamiento ocurrió con un paciente que tenía niveles séricos de sulfadiazina inferiores a 40 mg/ml, razón por la cual los autores recomiendan mantener la sulfadiazina sérica por encima de este nivel.

La década de los 80 fue testigo del lanzamiento de nuevas drogas antifúngicas (22), las más importantes de las cuales son los azoles que perturban las funciones de membrana como consecuencia de un bloqueo en la síntesis de ergosterol (Figura 2) (23). La experiencia clínica con ketoconazol ha mostrado que más del 90% de los pacientes con paracoccidioidomycosis han respondido favorablemente. El itraconazol es más activo y menos tóxico

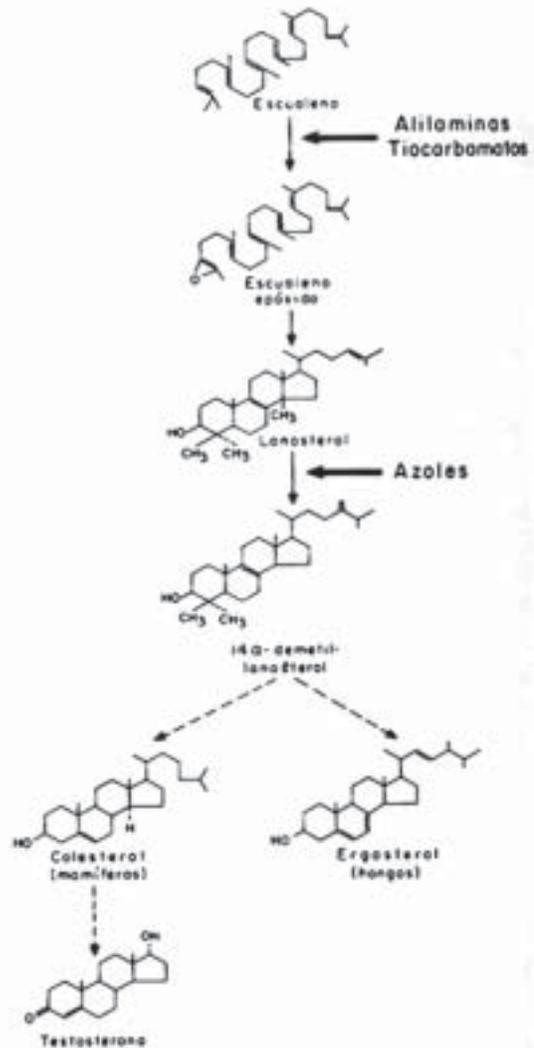


Figura 2. Sitio de acción de antibióticos antifúngicos que interfieren con la síntesis de esteroides. Las líneas punteadas indican la existencia de pasos intermedios en la ruta metabólica.

que el ketoconazol (24), pudiendo ser administrado en dosis menores (19 g contra 47 g, dosis total), con un tiempo más corto de duración de terapia (6 meses contra 8 meses). El itraconazol también fue probado en el tratamiento de la paracoccidioidomycosis experimental en ratas Wistar (25), siendo más activo que el fluconazol aunque menos eficaz que Sch 39 304, un azol experimental.

Aspectos inmunológicos

Serodiagnóstico

Varias pruebas serológicas se han usado para la detección de anticuerpos, tales como la doble inmunodifusión, fijación de complemento, eritroinmunoensayo y ELISA. La única prueba serológica de alta especificidad que puede ser usada sola es la inmunodifusión (26) debido al aislamiento de un antígeno específico llamado glicoproteína gp43 (27) obtenido de sobrenadantes concentrados y dializados. La fracción proteica de gp43 tiene un peso molecular de 30 kDa y es la responsable por la actividad altamente específica de este antígeno. La producción de anticuerpos monoclonales contra *P. brasiliensis* llevó al aislamiento de una glicoproteína específica de peso molecular 70-75 kDa (28). Ambas glicoproteínas pueden ser consideradas como marcadores para la detección de la paracoccidiodomicosis.

Inmunidad humoral

Los pacientes con paracoccidiodomicosis no están deficientes en la producción de anticuerpos sino que al contrario, tienen una inmunidad humoral hiperactiva, mostrando altos niveles de IgG, IgE e IgA (29). La relevancia de la respuesta humoral en el pronóstico de la paracoccidiodomicosis fue medida a partir de la respuesta serológica de 66 pacientes por inmunodifusión doble, usando antígeno metabólico (30). Un grupo de pacientes con la forma crónica de la enfermedad respondieron al tratamiento con sulfonamida con una mejoría clínica y un descenso en los títulos de anticuerpo. En otro grupo de pacientes se observó la persistencia de títulos altos a pesar de la mejoría clínica, lo cual indica que la detección de anticuerpos a *P. brasiliensis* no refleja necesariamente la enfermedad activa.

Inmunidad celular

Los estudios in vitro indican que a pesar de que los neutrófilos polimorfonucleares y los macrófagos están involucrados en las lesiones, ellos no parecen ser fungicidas para *P. brasiliensis* in vitro (31), a menos que sean activados con γ -interferón (32), activación ésta que es bloqueada por inhibidores de la síntesis de proteína del tipo de cicloheximida (33). Los neutrófilos polimorfonucleares de pacientes tienen una deficiencia digestiva contra *P. brasiliensis* (34) que no es mediada por factores séricos.

Mota y col. (35) reportaron anomalías en las subpoblaciones de linfocitos mononucleares en pacientes de Brasil. También se ha observado que la producción de interferón y factor de necrosis de

tumores inducido por la interleuquina 2 in vitro era significativamente menor en pacientes que en sujetos normales (36), lo que ha permitido suponer que el defecto en la población de linfocitos es de naturaleza más bien cuantitativa.

Antígenos HLA en paracoccidiodomicosis

En pacientes colombianos se demuestra una asociación de HLA-A9 y HLA-B13 con paracoccidiodomicosis (37), mientras que en Venezuela hay una correlación preferencial con HLA-B13 (38) y en Brasil con HLA-B40 (39), sugiriendo la participación del sistema HLA en la susceptibilidad genética a paracoccidiodomicosis y la importancia de la variabilidad étnica en esta asociación.

BIOLOGIA DEL HONGO

Modulación de la virulencia

En el proceso de infección e invasión, el *P. brasiliensis* no sólo está regulado por las características del huésped sino también por factores intrínsecos que modulan la respuesta de éste. En varias oportunidades se han reportado diferencias en la virulencia de las cepas de *P. brasiliensis* (40,41), siendo una de las razones la presencia de α -glucán en la pared celular de la fase levaduriforme de las cepas más virulentas y su disminución en las cepas menos virulentas (Cuadro 2) (42,43) de acuerdo con el tiempo de pasaje por animales o subcultivo in vitro. Esta variabilidad es de consecuencias importantes en serodiagnóstico ya que las paracoccidiodinas son preparadas por los laboratorios a partir de cepas diversas, lo que incide grandemente en la heterogeneidad en las respuestas provenientes de las pruebas hechas con estos preparados. De allí que surja la necesidad de establecer criterios estandarizados que conduzcan a la posibilidad de comparar resultados.

Cuadro 2

Relación entre la presencia de α -glucán en la pared celular de *P. brasiliensis* y la virulencia de la cepa (41)

Cepa	% α -glucán en pared	Virulencia
Pb9	3,2	+
Pb9H	19,9	++
Pb9SF	23,0	++
Pb140	3,4	-
Pb141	24,0	++
Pb168	57,8	+++

tamiento del organismo durante la transición. La posibilidad de que E_2 interfiera el proceso de transformación como resultado de una alteración en la síntesis de proteínas fue estudiada por Clemons y col. (61) quienes observaron que existían 12 bandas asociadas a la fase M (rango 30-140 kDa) y 18 bandas asociadas a la fase L (rango 22-127 kDa), junto a 5 bandas nuevas (23-50 kDa) que aparecían durante el proceso de transformación M a L. El tratamiento con E_2 alteró estos perfiles proteicos, sugiriendo que las respuestas funcionales de *P. brasiliensis* a E_2 están relacionadas con una regulación de la expresión de proteínas, probablemente a través de un complejo EBP-ligando. Estos resultados proveen una explicación biológica al hecho de que la paracoccidiodomicosis es más prevalente entre la población masculina, en tanto que el estradiol circulante en las personas de sexo femenino podría bloquear la transformación M a L, paso éste inicial en el desarrollo de la enfermedad.

Otro aspecto que concierne a la regulación del dimorfismo es la participación de la pared celular y la modulación de su biosíntesis durante la transformación. Estudios iniciales de Kanetsuna y col. (56) indican que los polisacáridos de la pared celular, en particular α - y β -glucán, juegan un papel destacado en la morfología y el dimorfismo, en tanto que el primero se encuentra sólo en la fase L mientras que el segundo se encuentra principalmente en la

fase M, con trazas en la fase L. Kanetsuna y col. (56) formularon una hipótesis, modificada posteriormente por San-Blas y San-Blas (42), en la cual el papel de los glucanos y la regulación de la proteína disulfuro reductasa son decisivos en el establecimiento de cualquiera de las dos morfologías. De acuerdo con San-Blas y San-Blas (Figura 4) (42), cuando las células L son inducidas a formar el micelio, se detiene la síntesis de RNA y de proteínas por unas 8 horas; la síntesis de α -glucán disminuye sin principio de síntesis de β -glucán. Esta se inicia sólo cuando recomienza la síntesis de proteínas en la formación del micelio. Cuando se produce la transformación M a L, la síntesis de β -glucán se reduce drásticamente como consecuencia de la inactividad de β -glucán sintetasa. Estudios actualmente en desarrollo sugieren que hay proteinasas citosólicas que regulan la actividad de β -glucán sintetasa (62). Estos resultados han sido incorporados en una hipótesis (62) que explica el mecanismo de control de la actividad de β -glucán sintetasa en *P. brasiliensis*: cuando la fase L está creciendo a 37 °C, la actividad de β -glucán sintetasa debe estar reprimida a un mínimo y la enzima debe estar en un estado zimogénico; al transformar a la fase M, las proteinasas son activadas fuertemente, provocando la conversión de la glucán sintetasa inactiva en enzima activa y permitiendo la síntesis permanente de β -glucán. Al revertirse el proceso

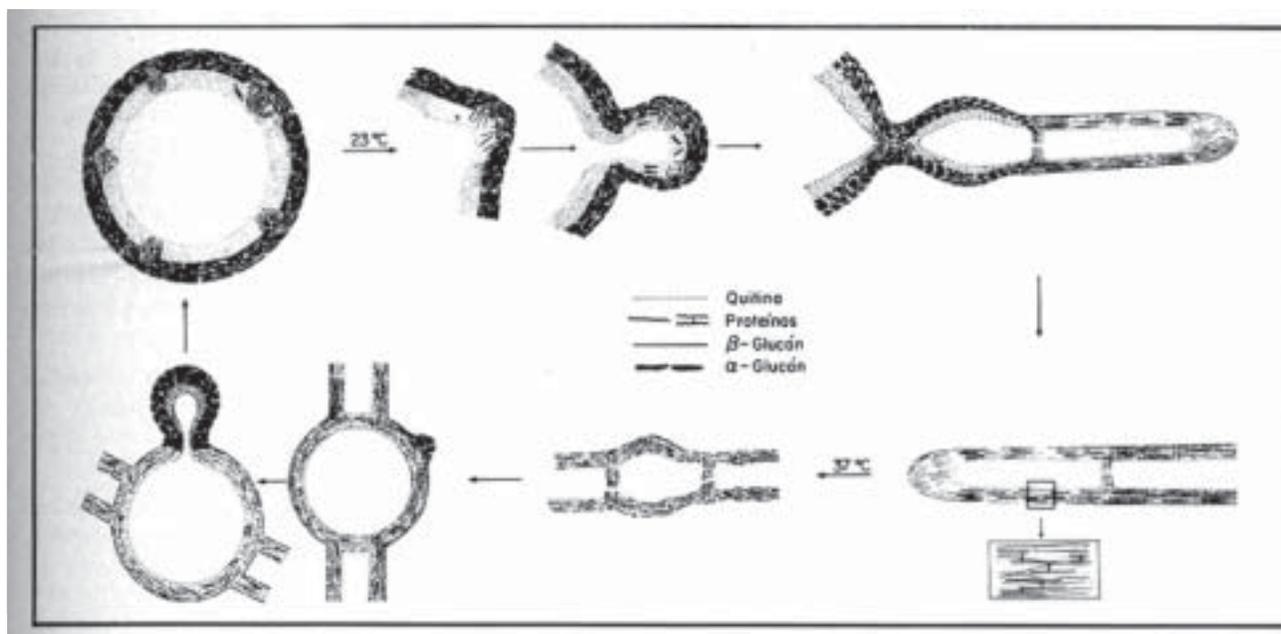


Figura 4. Hipótesis del dimorfismo del *P. brasiliensis* (42).

para transformar micelios en levaduras, se sintetiza enzima en estado zimogénico que no puede pasar a la fase activa debido a la pobre actividad de la proteinasa. De esta forma, hay una baja producción de β -glucán, estimulándose la síntesis de α -glucán que conduce al mantenimiento de la forma redondeada en la levadura.

CONCLUSION

Los estudios recopilados en este trabajo indican que las líneas de investigación en *P. brasiliensis* se están centrando en mejorar el conocimiento de la patogenia, métodos más seguros de diagnóstico y estudios de biología básicos que servirán no sólo para entender los mecanismos moleculares del dimorfismo térmico de este hongo sino también los de organismos relacionados.

REFERENCIAS

- Restrepo A. Actualización sobre la paracoccidioidomycosis y su agente etiológico, 1986-1989. *Interciencia* 1990;15:193-199.
- Lutz A. Uma micose pseudo-coccídica localizada na boca e observada no Brasil: contribucao ao conhecimento das hipoblastomicoses americanas. *Brasil Med* 1908;22:121-124.
- O'Daly JA. Las blastomicosis en Venezuela. *Bol Hosp* 1937;3:3-32.
- Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia* 1985;23:323-334.
- Albornoz MB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia* 1971;9:248-253.
- Negrón P. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente en el suelo argentino. *Prensa Médica* 1966;53:2831-2832.
- San-Blas G, San-Blas F. The antigenic structure of *Paracoccidioides brasiliensis*. En: Kurstak E. (Ed) *Immunology of Fungal Diseases*, Nueva York. Marcel Dekker 1989:171-192.
- Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens D A. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun* 1984;46:346-353.
- Diógenes MJ, Goncalves HM, Mapurunga AC, Alencar KF, Andrade FB, Nogueira-Queiroz JA. Reacoes a histoplasmina e paracoccidioidina na Serra de Pereiro (Estado de Ceara, Brasil). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1990;32:116-120.
- Martín MC, López C. Prevalencia de la infección por *Paracoccidioides brasiliensis* en niños panameños: informe preliminar. *Rev Med Panamá* 1989;14:135-138.
- Franco MF. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 1987;25:5-18.
- Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Silva-Mota NG. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Brasil Med Trop* 1987;20:129-132.
- De-Freitas MR, Nascimento OJ, Chimelli L. Tapia's syndrome caused by *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Neurol Sci* 1991;103:179-181.
- Morato-Fernandes RN, Baraldo PSS, Masini M, Costa PHC. Paracoccidioidomycose intraespinal e cerebral. *Arq Neuro-Psiq* 1991;49:192-197.
- Bakos L, Kronfeld M, Hampe S, Castro I, Zampese M. Disseminated paracoccidioidomycosis with skin lesions in a patient with acquired immunodeficiency syndrome (letter). *J Am Acad Dermatol* 1989;20:854-855.
- Goldani LZ, Coelho IC, Machado AA, Martínez R. Paracoccidioidomycosis and AIDS (letter). *Scand J Infect Dis* 1991;23:939.
- Pedro RJ, Aoki FH, Bocato RSBS, Branchini MLM, Goncalvez FL, Papaordanov PMO, Ramos MC. Paracoccidioidomycose e infeccao pelo virus da immunodeficiencia humana. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1989;31:119-125.
- De-Mattos MC, Mendes RP, Marcondes-Machado J, Meira DA, Morceli J, Pereira PC, Barraviera B. Sputum cytology in the diagnosis of pulmonary paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 1991;114:187-191.
- Tendrich M, De Luca V, Tourinho EK, Wanke B, Cuba J, Buescu A, Vaisman M, Pereira AA, El-Andere W, Wajchenberg B. Computed tomography and ultrasonography of the adrenal glands in paracoccidioidomycosis. Comparison with cortisol and aldosterone responses to ACTH stimulation. *Am J Trop Med Hyg* 1991;44:83-92.
- Almeida MC, Couto LAAM, Da Silva LHF, Carvalhal SS. Correlation between anatomo-clinical diagnosis and retrospective assessment of clinical diagnosis in post-mortems. *Rev Saude Pública* 1989;23:285-291.
- Barraviera B, Pereira PCM, Mendes RP, Machado JM, Lima CRG, Meira DA. Evaluation of acetylator phenotype, renal function and serum sulfadiazine levels in patients with paracoccidioidomycosis treated with

- cotrimazine (a combination of sulfadiazine and trimethoprim). *Mycopathologia* 1989;108:107-112.
22. San-Blas G. Antibióticos antifúngicos: hacia la búsqueda de antibióticos selectivos. *Rev Iberoam Micol* 1991;8:24-34.
 23. Vanden Bossche H. Mode of action of pyridine, purimidine and azole antifungals. En: Berg D, Plempel M. (Eds). *Sterol Biosynthesis Inhibitors*, Ellis Horwood Ltd 1988:79-119.
 24. Cauwenbergh G, Donker P. The clinical use of itraconazole in superficial and deep mycoses. En: Fromtling RA. (Ed) *Recent Trends in the Discovery, Development and Evaluation of Antifungal Agents* 1987:113-124.
 25. Negroni R, Elías-Costa MRI, Finkelievich JL, Iovannitti C, Agorio IL, Tiraboschi IN. Three triazoles in the treatment of experimental paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol* 1991;8:8-12.
 26. Camargo ZP, Unterkircher C, Campos S, Travassos LR. Production of Paracoccidioides brasiliensis exoantigens for immunodiffusion tests. *J Clin Microbiol* 1988;26:2147-2151.
 27. Puccia R, Schenkman S, Gorin PAJ, Travassos LR. Exocellular components of Paracoccidioides brasiliensis: identification of a specific antigen. *Infect Immun* 1986;53:199-206.
 28. Figueroa JI, Hamilton AJ, Bartholomew MA, Harada T, Fenelon L, Hay R. Preparation of species-specific murine monoclonal antibodies against the yeast phase of Paracoccidioides brasiliensis. *J Clin Microbiol* 1990;28:1766-1769.
 29. Arango M, Yarzabal L. T-cell dysfunction and hyper-immunoglobulinemia E in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 1982;79:115-124.
 30. Ferreira-da-Cruz MF, Francesconi-do-Vale AC, Espinera M C, Wanke B, Galvao-Castro B. Study of antibodies in paracoccidioidomycosis: follow-up of patients during and after treatment. *J Med Vet Mycol* 1990;28:151-157.
 31. Brummer E, Hanson LH, Restrepo A, Stevens DA. In vivo and in vitro activation of pulmonary macrophages by IFN- gamma for enhanced killing of Paracoccidioides brasiliensis or Blastomyces dermatitidis. *J Immunol* 1988;140:2786-2789.
 32. Brummer E, Hanson LH, Stevens DA. Gamma-interferon activation of macrophages for killing of Paracoccidioides brasiliensis and evidence for nonoxidative mechanism. *Int J Immunopharmacol* 1988;10:945-952.
 33. Brummer E, Hanson LH, Stevens DA. Kinetics and requirements for activation of macrophages for fungicidal activity: effect of protein synthesis inhibitors and immunosuppressants on activation and fungicidal mechanism. *Cel Immunol* 1991;132:236-245.
 34. Goihman-Yahr M, Rotherberg A, Breñaña A, Istúriz G, Rosquete R, Avila-Millán E, Vilorio N, Saavedra-de-Borges N, Carrasquero M, Pérez-de-Fernández B, San Martín B, Román A, Gómez MH, Pereira J, Molina T. Digestion of killed Paracoccidioides brasiliensis by neutrophils. *Mycopathologia* 1989;106:53-58.
 35. Mota NG, Peracoli MT, Mendes RP, Gattass CR, Marques S A, Soares AM, Izatto IC, Rezkallah-Iwasso MT. Mononuclear cell subsets in patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 1988;26:105-111.
 36. Bava AJ, Mistchenko AS, Palacios MF, Estévez ME, Tiraboschi NI, Sen L, Negroni R, Diez RA. Lymphocyte subpopulations and cytokine production in paracoccidioidomycosis patients. *Microbiol Immunol* 1991;35:165-174.
 37. Restrepo F, Restrepo M, Restrepo A. Blood groups and HLA antigens in paracoccidioidomycosis. *Sabouraudia* 1983;21:35-39.
 38. González NM, Albornoz M, Ríos R, Prado L. Paracoccidioidomycosis y su relación con el sistema HLA. II Encontro sobre Paracoccidioidomycose, Brasil, Rosumos adicionais. 1983.
 39. Lacerda GB, Arce-Gómez B, Telles-Filho FQ. Increased frequency of HLA-B40 in patients with paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 1987;26:253-256.
 40. Kashino SS, Calich VLG, Burger E, Singer-Vermees LM. In vivo and in vitro characteristics of six Paracoccidioides brasiliensis strains. *Mycopathologia* 1985;92:173-178.
 41. San-Blas G, San-Blas F. Paracoccidioides brasiliensis: cell wall structure and virulence. A review. *Mycopathologia* 1977;62:77-86.
 42. San-Blas F, San-Blas G. Paracoccidioides brasiliensis, En: Szanislo P (Ed) *Fungal dimorphism*. Nueva York, Plenum Press 1985:93-120.
 43. Brummer E, Restrepo A, Hanson LH, Stevens DA. Virulence of Paracoccidioides brasiliensis: the influence of in vitro passage and storage. *Mycopathologia* 1990;109:13-17.
 44. Carbonell LM, Rodríguez J. Mycelial phase of Paracoccidioides brasiliensis and Blastomyces dermatitidis: an electron microscope study. *J Bacteriol* 1968;96:533-543.
 45. Takeo K, Sano A, Nishimura K, Miyaji M, Franco M, Kanetsuna F. Cytoplasmic and plasma membrane ultrastructure of Paracoccidioides brasiliensis yeast phase cells as revealed by freeze-etching. *Mycolog Res*

- 1990;94:1118-1122.
46. San-Blas F. Ultraestructure of spore formation in *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* 1986;24:203- 210.
 47. Samsonoff WA, Salazar ME, McKee ML, Restrepo A, Cano L E, Edwards MR. Scanning electron microscopy of the conidia produced by the mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia* 1991; 114:9-15.
 48. Carbonell LM, Rodríguez J. Transformation of mycelial and yeast forms of *Paracoccidioides brasiliensis* in cultures and in experimental inoculations. *J Bacteriol* 1965;90:504- 510.
 49. San-Blas G, Calcagno AM, San-Blas F. A preliminary study of in vitro antibiotic activity of saperconazole and other azoles on *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* 1993;31: in press.
 50. San-Blas G, San-Blas F, Gil F, Mariño L, Aritz-Castro R. Inhibition of growth of the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by ajoene. *Antimicrob Ag Chemother* 1989;33:1641-1644.
 51. San-Blas G, San-Blas F, Mariño L. Ajoene, a component of garlic (*Allium sativum*), affects growth and dimorphism in *Paracoccidioides brasiliensis*. En: Yamaguchi, H. (Ed) *Recent Progress in Antifungal Chemotherapy*. Nueva York, Marcel Dekker 1991:513-515.
 52. San-Blas G, Mariño L, San-Blas F, Aritz-Castro R. Effect of ajoene on dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* 1993;31: en prensa.
 53. Dávila T, San-Blas G, San-Blas F. Effect of papulacandin B on glucan synthesis in *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* 1984;24:193-202.
 54. Hanson LH, Stevens DA. Evaluation of cilofungin, a lipopeptide antifungal agent, in vitro against fungi isolated from clinical specimens. *Antimicrob. Ag Chemother* 1989;33:1391-1392.
 55. Paris S, Durán S. Cyclic adenosine 3', 5' monophosphate (cAMP) and dimorphism in the pathogenic fungus *Para-coccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia* 1985;92:115- 119.
 56. Kanetsuna F, Carbonell LM, Azuma I, Yamamura Y. Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* 1972;110:208-218.
 57. San-Blas G. Fungi pathogenic for humans: molecular aspects of dimorphism. En: Arora K, Ajello L. (Eds) *Handbook on Applied Mycology, Vol II: Human, Animals and Insects*, Nueva York, Marcel Dekker 1991:459-475.
 58. Stevens DA. The interface of mycology and endocrinology *J Med Vet Mycol* 1989;29:133-140.
 59. Loose DS, Stover EP, Restrepo A, Stevens DA, Feldman D. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Proc Nat Acad Sci* 1983;80:7659-7663.
 60. Stover EP, Schar G, Clemons KV, Stevens DA, Feldman D. Estradiol-binding proteins from mycelial and yeast-form cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immun* 1986;51:199-203.
 61. Clemons KV, Feldman D, Stevens DA. Influence of oestradiol on protein expression and methionine utilization during morphogenesis of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Gen Microbiol* 1989;135:1607-1617.
 62. San-Blas G, San-Blas F, Rodríguez LE, Castro CJ. Un modelo de dimorfismo en hongos patógenos: *Paracoccidioides brasiliensis*. *Acta Cient Venezol* 1987;38:202-211.

La Gaceta Médica de Caracas hace 100 años (1893, 1:76)

“El 11 de los corrientes tuvo lugar en el Hospital Vargas la inauguración del nuevo *Anfiteatro quirúrgico*, construido bajo la dirección y por iniciativa del Doctor Ruiz, Jefe de Servicio de Ginecología y Director científico del establecimiento. Invitado el Director de este periódico a dar una lección clínica con tal motivo, escogió al efecto el tema siguiente: *Del tratamiento quirúrgico*

de la epilepsia traumática, y terminó practicando una operación de *craneotomía*.

El Doctor Ruiz fué objeto de calurosas felicitaciones por parte del numeroso concurso de médicos, cirujanos y alumnos que asistieron al acto. El nuevo anfiteatro satisface en su mayor parte, las exigencias de la cirugía antiséptica contemporánea.”