

CAPACIDAD DE ADAPTACION DEL HONGO PATOGENO *Paracoccidioides brasiliensis* al ORGANISMO HUMANO*

por

Angela Restrepo Moreno, Ph.D.**

Resumen

Restrepo Moreno, A.: Capacidad de adaptación del hongo patógeno *Paracoccidioides brasiliensis* al organismo humano. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 19 (75): 673-678, 1995. ISSN 0370-3908.

Como todos los organismos vivos, los hongos deben reproducirse para sobrevivir. Para ello, aprenden a desarrollarse bajo condiciones adversas, lo que usualmente se cumple gracias a una serie de mecanismos de adaptación establecidos por selección natural, usualmente aplicables dentro de su hábitat normal. Sin embargo, tales mecanismos les son también útiles cuando un accidente los ubica en ambientes extraños. Tal es el caso del hongo dimórfico *P. brasiliensis*, el que a pesar de medir apenas 15 micras de diámetro en promedio, posee sistemas de adaptación iguales o aún mejores, a los exhibidos por muchos organismos eucarióticos superiores. Algunas de sus características más notorias son el soportar condiciones extremas de pobreza nutricional, bajo las cuales produce los elementos reproductivos que le permitirán sobrevivir en su hábitat. Puede, además, cambiar de forma de crecimiento bajo el impulso de una temperatura superior a la normal, acomodándose así a su accidental hospedero humano, pasando de la forma micelial a la levadura. Una vez en esta forma aprende a tolerar el efecto deletéreo de un ambiente extraño, en el que puede encontrar baja oxigenación cuando para su normal desarrollo, le es indispensable disponer de oxígeno. A pesar de necesitar hierro para su crecimiento, el *P. brasiliensis* se las ingenia para fabricar quelantes que atrapan las trazas de este metal que pudieran existir en el sustrato. Llega hasta el punto de permitir que las células macrofágicas del hospedero, que deberían destruirlo, lo fagociten porque en su interior encuentra el hierro que le permite transformarse en levadura, para continuar así su lucha por sobrevivir. Se comprueba en esta forma, el poder de los mecanismos biológicos que, a nivel molecular, se expresan por igual en los organismos micro y macroscópicos.

Palabras clave: *Paracoccidioides brasiliensis*. Capacidad adaptativa.

Abstract

As all living organisms, fungi must reproduce to survive. To accomplish this, they learn to withstand the hardships of inhospitable environments by developing a series of adaptation mechanisms, established by natural selection and which are usually useful within their natural habitats. However, these can also be employed when by accident, a different type of environment must be contemplated. This is the case of the thermally dimorphic fungus, *P. brasiliensis*, which in spite of its small size, approximately 15 microns, has adaptation systems that parallel or even surpass, those of the higher eukaryotes. Some of the most notorious

* Estudio científico pronunciado en el recinto de la Academia el 22 de febrero de 1995 con ocasión de su posesión como académica correspondiente.

** Sección de Micología. Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) A.A. 7378 Medellín, Antioquia.

characteristics are its capacity to withstand nutritional deprivation which forces the fungus to sporulate in order to survive. Furthermore, it is capable of changing forms (mycelial to yeast) under the influence of temperatures above normal and by so doing, accommodating to the conditions found in the tissues of its accidental human host. Once in the yeast form, it learns to tolerate the detrimental effect of a foreign environment, in which it may encounter oxygen concentrations lower than expected for an aerobic microorganism. In spite of the fact that it needs iron for vital processes, *P. brasiliensis* has the capability of sequestering iron traces from the media by means of its own chelants; the fungus is then able to meet other challenges for its survival. Rather than remaining in the extra cellular milieu, it prefers to be engulfed by the host's macrophages, which should destroy it, only to have access to the iron needed for its transformation to the tissue form and further adaptation to the new host. These mechanisms illustrate the power of biological mechanisms which at the molecular level, are expressed equally by microscopic and macroscopic organisms.

Key Words: *Paracoccidioides brasiliensis*. Capacidad adaptation mechanisms.

Generalidades sobre la paracoccidioidomicosis y su agente etiológico

Paracoccidioides brasiliensis es el agente causal de una de las afecciones micóticas sistémicas (diseminadas) más severas del hombre, la paracoccidioidomicosis (PCM) (Lacaz, 1994a,b). Se trata de una enfermedad infecciosa pero no contagiosa, que ocasiona lesiones, clínicamente aparentes, en los pulmones, las membranas mucosas, la piel, los ganglios linfáticos, las adrenales y otros órganos. Existen también infecciones subclínicas que cursan en ausencia de manifestaciones orgánicas notorias, las que, en habitantes de la zona endémica, son más frecuentes que la enfermedad misma. Sin embargo, el individuo infectado conserva por años el recuerdo inmunológico de su encuentro con el microorganismo, hecho que facilita la determinación de la frecuencia de infección en una población dada. Desafortunadamente, el hongo puede permanecer latente en los tejidos de la persona infectada y, años más tarde, dar lugar a enfermedad por reactivación endógena de un foco infeccioso parcialmente dominado por sus defensas inmunes (Newman *et al.*, 1994; Restrepo, 1993; San Blas, 1993).

La PCM reviste ciertas características de importancia, entre las que se destacan su distribución geográfica limitada a la América Latina. En efecto, la micosis es informada sólo entre México (23° N) y la Argentina (34° S), con gran predominio de casos en el Brasil, seguido de Venezuela, Colombia y Ecuador (Ríos-Fabra *et al.*, 1994). Llama la atención el que dentro del área señalada, algunos países como Chile y las islas caribeñas, resulten indemnes (Restrepo, 1994). A pesar de unos confines tan limitados, se desconoce aún el hábitat natural del *P. brasiliensis* (Restrepo, 1994). La PCM es también peculiar en lo referente al sexo de los pacientes, ya que la enfermedad es mucho más frecuente en hombres que en mujeres, en una proporción de 13:1 para toda el área endémica y de 100:1 para Colombia, Venezuela y Ecuador (Brummer *et al.*, 1993; Wanke & Londero, 1994). Curiosamente, ambos sexos se infectan por igual y en el caso de los niños, no hay diferencias por sexo, lo cual señala la importancia de las hormonas en la relación hospedero-parásito (Salazar *et al.*, 1988). Otras circunstancias notorias son la mayor frecuencia de la enfermedad en los adultos y agricultores, así como la

severidad de la afección en inmigrantes al área endémica (Wanke & Londero, 1994).

Rudimentos históricos

En 1908 en la ciudad de São Paulo, Brasil, el profesor Adolfo Lutz describió los dos primeros casos de la enfermedad y logró aislar el agente etiológico. Su colaborador, Adolfo Splendore, prosiguió los estudios y designó el hongo con el binomio *Zymonema brasiliensis*, una de las varias designaciones que recibiría el microorganismo el que, además, en 1913, es confundido con el agente de otra micosis, la coccidioidomicosis. Es sólo en 1930 que el profesor Floriano de Almeida condujo estudios sistemáticos sobre el hongo, que le permitieron conocerlo mejor y clasificarlo con el nombre actual *Paracoccidioides brasiliensis*. Las contribuciones fundamentales de los tres anteriores profesionales fueron reconocidas en el pasado, al ser designada la micosis como la enfermedad de Lutz-Splendore-de Almeida. A partir de 1940, el liderazgo de la investigación sobre la entidad y su agente etiológico fue asumido por el profesor Carlos de Silva Lacaz, quien aún mantiene su posición de connotado maestro (Lacaz, 1994a,b).

El agente etiológico

Paracoccidioides brasiliensis es un microorganismo eucariótico, heterotrófico, clasificado en el Reino de los Hongos, Phylum Deuteromycota, Clase Hyphomycetes, Orden Moniliales, Familia Moniliaceae. Es aeróbico pero puede tolerar concentraciones reducidas de oxígeno. Hasta el momento, se desconoce su fase perfecta (sexuada). Este hongo exhibe una característica importante, el fenómeno del dimorfismo por el cual cambia de aspecto bajo la influencia de la temperatura. Por debajo de 25°C y muy posiblemente también en la naturaleza, se manifiesta como un moho. A 35°-37°C, así como en los tejidos, el hongo se desarrolla como una levadura (Newman *et al.*, 1994, Lacaz, 1994b, Queiroz-Telles, 1994, San Blas & San Blas, 1994).

Los elementos reproductores del hongo varían según su forma de crecimiento; es así como la levadura que es multinucleada, se reproduce por gemación y da lugar a blastoconidias ovales o redondeadas, algunas de las cuales son multigemantes (Lacaz, 1994b). Esta últi-

ma forma reproductiva es la característica distintiva más importante del *P. brasiliensis*. En la forma miceliar, se observan las estructuras tubulares de todos los mohos, las hifas y su conjunto, los micelios; en las hifas se forman las conidias, elementos reproductores uninucleados, que al menos en modelos experimentales, constituyen las formas infectantes (Bustamante *et al.*, 1985, McEwen *et al.*, 1987, Queiroz-Telles, 1994).

Una comparación entre las formas miceliar y levaduriforme (Tabla 1), revela cómo la primera es menos exigente que la levadura desde el punto de vista nutricional, así como más tolerante a variaciones de pH, de temperatura y, en algún grado, también de humedad.

Tabla 1. Comparación entre las formas Miceliar y Levadura del *P. brasiliensis*

Condiciones	Formas	
	Miceliar	Levadura
Requerimientos nutricionales	escasos	complejos
Tolerancia a:		
pH	amplia (3-11)	limitada (5-9)
temperatura (°C)	marcada (4-28)	escasa (32-37)
humedad baja	mediana	ninguna
Esporulación	pobre	abundante

Por el contrario, la levadura se reproduce en forma más abundante que el micelio, al menos en medios de cultivo ricos en carbohidratos (Bustamante *et al.*, 1985, Restrepo, 1994). El paso (transformación o conversión) entre una y otra forma implica cambios en muchos aspectos, la composición de la pared celular entre ellos. En la levadura, la pared tiene como componente básico alfa-1,3 glucán mientras que en el micelio, tal componente es beta-1,3 glucán. Hay quitina y hexosas en ambas formas. Por lo tanto, la transformación depende no sólo de la constitución de la pared sino también de la cantidad relativa de los glucanos y de su arreglo espacial (San Blas & San Blas, 1994). Vale la pena anotar que sólo la levadura se asocia con la enfermedad, por lo que las diferencias en la composición de la pared pueden catalogarse como factores de virulencia del hongo (San Blas, 1993; San Blas & San Blas, 1994).

Algunos ejemplos de la capacidad de adaptación del *P. brasiliensis*

1. Sustratos pobres y forma miceliar

Como fue mencionado, en la forma miceliar los elementos reproductores son escasos, por lo que la pro-

pagación de la especie en el medio ambiente podría verse perjudicada. En el laboratorio, bajo condiciones que simulan las naturales, no se producen conidias en medios con alto contenido de carbohidratos. Si el hongo se siembra en medios pobres y aún en agar y agua solamente, aproximadamente 20% de los aislamientos de origen clínico, dan origen a conidias de varios tipos (Bustamante *et al.*, 1985). Parecería como si ante la necesidad de enfrentar el agotamiento del sustrato, el hongo hiciera un último esfuerzo para sobrevivir y produjera los elementos capaces de conservar su especie, las conidias (Bustamante *et al.*, 1985). Tan bien dotada para la supervivencia está la forma miceliar del *P. brasiliensis* que logra aumentar su masa y conservar cierta vitalidad, después de incubación prolongada a 22° y a 4°C, en agua destilada estéril (de Bedout *et al.*, 1986) (Tabla 2). Después de 4 meses de tal tratamiento, estudios al microscopio electrónico de transmisión, revelaron el fenómeno *hifa-intra-hifa*, el cual consiste en la penetración de una hifa viable, joven, al interior de otra en vías de extinción, con el objeto de obtener de ésta los materiales orgánicos necesarios para su desarrollo (de Bedout *et al.*, 1986). ¿Será este un ejemplo de canibalismo micótico?

Lo anterior demuestra la gran capacidad de adaptación de la forma miceliar del *P. brasiliensis* a condiciones nutricionales extremas, las que en ningún momento permitirían la supervivencia de la forma de levadura, dadas sus mayores exigencias nutricionales (Restrepo, 1994). Lo anterior señala que la forma miceliar debe ser el estado natural del hongo en el medio ambiente, en el cual cumple su aún desconocido papel como microorganismo saprofito (Lacaz, 1994b).

Tabla 2. Micelio de *P. brasiliensis* y desarrollo en condiciones extremas

Sustrato: Agua destilada estéril Meses de observación	Peso seco (mg)	
	Según temperatura (°C) de incubación	
	22	4
0	1.0	0.8
2	0.8	0.8
3	1.6	0.8
4	1.3	1.4
5	1.5	1.8
6	1.5	1.4
7	4.9	3.9
8	5.5	4.0

2. Dimorfismo térmico

El dimorfismo térmico revela la "doble personalidad" que es propia de *P. brasiliensis*. Puede seguirse la conversión morfológica incubando el micelio a temperaturas de 28° a 37°C. Bajo el estímulo del calor, las hifas comienzan a presentar alteraciones representadas por ensancha-

mientos intercalares que adoptan formas ovales o redondeadas, que aparecen recubiertas por paredes gruesas; finalmente aquellas dan lugar a levaduras con gemación múltiple (Salazar & Restrepo, 1984): Las conidias hacen la misma conversión pero en forma más directa. Inicialmente adquieren aspecto oval o esférico, y luego producen las gemas múltiples características de la forma levadura (Restrepo *et al.*, 1986). Por su parte, las levaduras al ser cultivadas a temperaturas inferiores a 28°C, emiten prolongaciones tubulares que con el paso del tiempo, terminan en hifas y micelios (Restrepo *et al.*, 1982).

Es admirable la capacidad del *P. brasiliensis* para enfrentar exitosamente el reto impuesto por este cambio de escenario. En efecto, en éste y en otros hongos dimórficos patógenos para el hombre, tal como *Histoplasma capsulatum*, cuyo hábitat externo es el suelo (Deepe, 1994), la afección humana es el resultado del encuentro accidental con un hospedero extraño, encuentro que obliga al hongo a cambiar su sistema de vida para sobrevivir (Deepe, 1994). En la PCM experimental, al ocurrir la infección primaria, las conidias y fragmentos miceliares que llegan al pulmón adoptan rápidamente la forma de levadura, impulsadas principalmente por el aumento de temperatura (McEwen *et al.*, 1987). De no hacerlo así, el hospedero eliminaría las formas infectantes derivadas del micelio (Deepe, 1994; McEwen *et al.*, 1987).

3. Batalla por el Hierro: elemento esencial

En general, el hierro cumple un papel importante en la interacción de los microorganismos patógenos y el hombre. Este último posee proteínas capaces de unirse con avidez al hierro, de quelarlo, como son la transferrina y la lactoferrina (Guerinot, 1994, Weinberg, 1984). Los microorganismos que dependen de tal elemento para su desarrollo, se ven restringidos y pueden fracasar en su intento de colonizar a su hospedero, a menos que también ellos logren producir otro tipo de quelantes, los sideróforos. Por ello, los quelantes del hierro que posee el hospedero representan una forma inespecífica de inmunidad (Guerinot, 1994, Weinberg, 1984).

Con el fin de determinar el grado de dependencia de hierro del *P. brasiliensis* se realizaron una serie de experimentos en los cuales se sembraron tubos con la levadura o el micelio en un medio de cultivo químicamente definido, con o sin hierro en concentraciones variables; tales cultivos se mantenían a la temperatura adecuada a la forma de crecimiento. A intervalos regulares, se medía el desarrollo del hongo por espectrofotometría. Además, en una segunda parte del experimento, se agregó al medio con hierro un quelante de reconocida afinidad a este elemento (fenantrolina). Así mismo, se analizó el sobredonante del medio donde había crecido el hongo, para buscar aquellos de sus productos metabólicos que fueran capaces de unirse al hierro (Arango & Restrepo, 1988).

Como se observa en las figuras 1 y 2, la dinámica del crecimiento de ambas formas del hongo fue similar en presencia y en ausencia de hierro. En los cultivos con exceso de hierro y con el quelante, las levaduras crecían adecuadamente, no así el micelio, el que sólo lograba un desarrollo parcial después de una incubación prolongada. En contraste con lo anterior, la adición de fenantrolina

al medio de cultivo normal sin hierro en exceso, retrasaba significativamente el desarrollo de la levadura, especialmente en los primeros días de cultivo. Por su parte, bajo las mismas circunstancias, el micelio se mostraba incapaz de soportar la ausencia de hierro ocasionada por la acción del quelante (Arango & Restrepo, 1988).

El análisis de los sobredonantes de los cultivos mostró que ambas formas del hongo liberaban una mayor concentración de metabolitos con afinidad al hierro cuando tal elemento se encontraba ausente del medio de cultivo (Fig. 3), indicando así que tanto el micelio como la levadura sintetizaban sideróforos, si bien ellos eran más potentes en esta última y le permitían quelar las pequeñísimas cantidades (trazas) del hierro presentes en el sustrato (Arango & Restrepo, 1988). Esta capacidad representa una ventaja para el hongo en su forma tisular cuando deba interactuar con su accidental hospedero, el hombre.

Tabla 3. Supervivencia del *P. brasiliensis* bajo condiciones de oxigenación reducida

Días estudio	% células viables en cultivos líquidos estacionarios en:	
	Microaerofilia	Anaerobiosis
1	81 (+)	85 (+)
7	65 (+)	11 (+)
14	45 (+)	0 (-)
21	24 (+)	0 (-)
28	22 (+)	0 (-)

(+): Producción de colonias al hacer siembras en medio sólido.

4. El hierro hace posible el desarrollo intracelular

En una serie de experimentos diseñados para determinar la capacidad fungicida (letal) de los macrófagos provenientes de ratones frente a las conidias de *P. brasiliensis* (Brummer *et al.*, 1989, Cano *et al.*, 1992). Se observó que al cultivarlas a 37°C en presencia de macrófagos residentes, eran rápidamente ingeridas por éstos. Contrariamente a la destrucción esperada, una proporción importante de tales conidias lograba transformarse intracelularmente en levadura. Los controles que medían tal capacidad de transformación y que carecían de macrófagos, mostraban un porcentaje inferior de conversión conidia-levadura. En otras palabras, las células macrófágicas permitían el desarrollo del microorganismo al que supuestamente debían combatir (Brummer *et al.*, 1989, Cano *et al.*, 1992).

Al tratar de explicar el hallazgo anterior, se encontró que si los macrófagos se activaban, es decir, si se les impulsaba a convertirse en agresores más potentes, las conidias ingeridas no lograban ya transformarse en levaduras. Es conocido que una de las estrategias empleadas por los macrófagos activados para detener el germen invasor es retener el hierro o presentarlo en una forma no utilizable por éste (Guerinot, 1994, Newman *et al.*, 1994, Weinberg, 1984). Con esta base se exploró el efecto que sobre el co-cultivo de conidias y macrófagos pudiera tener la adición de un quelante del hierro (desferoxamina). Se encontró que ocurría entonces una

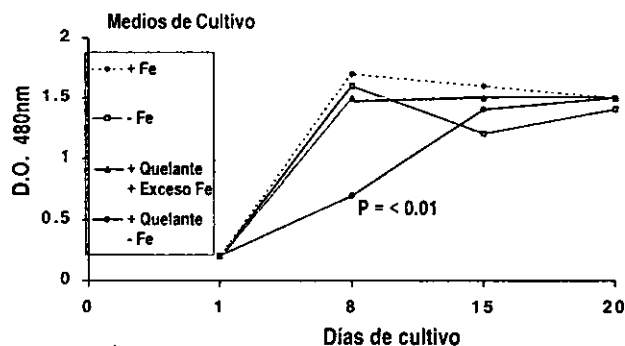
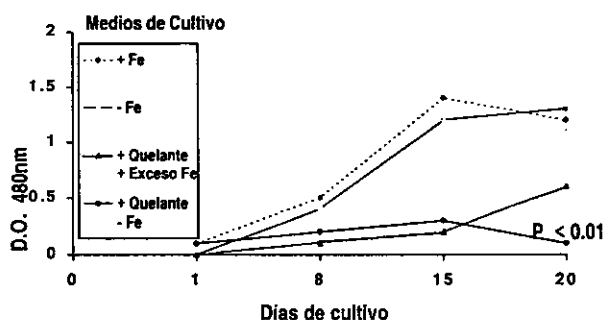
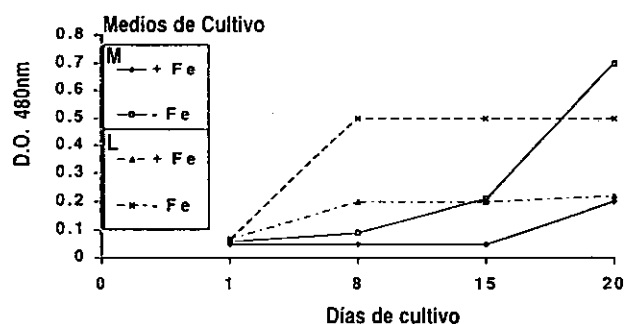
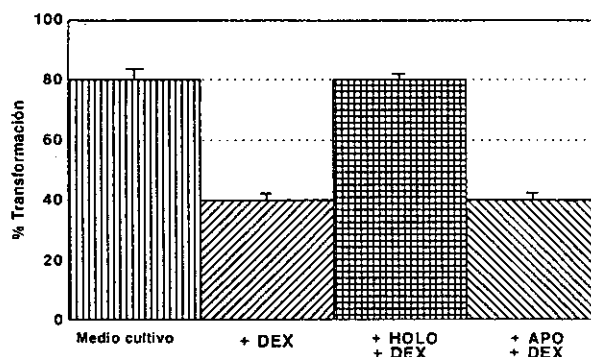
Figura 1. *P. brasiliensis*: Relación con el Hierro (I). Forma levadura.Figura 2. *P. brasiliensis*: Relación con el Hierro (II). Forma micelar.Figura 3. Sobrenadantes de cultivos de *P. brasiliensis*: Capacidad de unión al Hierro.

Figura 4. Efectos del hierro en la transformación conidia → levadura en macrófagos.

drástica reducción en la transformación de las conidias (Fig. 4). Si además del quelante se agregaba otro compuesto que fuera saturado (holotransferrina), el paso conidia-levadura se cumplía con la misma frecuencia que frente a los macrófagos residentes no activados, pues existía hierro suficiente para satisfacer al quelante y a las conidias. Si por el contrario, el compuesto que se adicionaba no era saturado en este elemento, eran pocas las conidias que lograban transformarse (Cano *et al.*, 1994). Los datos anteriores revelan cómo la disponibilidad de hierro en el interior de los macrófagos, al igual que la capacidad del hongo para aprovecharlo, constituyen una faceta importante de la relación hospedero-parásito en la paracoccidioidomicosis (Cano *et al.*, 1994).

5. *P. brasiliensis* y su relación con el oxígeno

La experiencia revela que tanto la levadura como el micelio al ser sembrados en medios de cultivo líquidos, requieren una oxigenación vigorosa para su desarrollo. No importa qué tan adecuado sea el sustrato líquido que se ofrezca, en ausencia de agitación o de otro medio que proporcione oxígeno, no ocurre crecimiento del hongo (Lacaz, 1994b). Esta condición de microorganismo aeróbico es difícil de reconciliar con los largos períodos de latencia que *P. brasiliensis* logra soportar en el tejido del hospedero infectado, cuando queda encerrado en las lesiones residuales que marcaron la afección y en las cuales el acceso al oxígeno es muy restringido (Restrepo *et al.*, 1981). Un ejemplo de tal circunstancia fue ofrecido por un paciente con historia de

paracoccidioidomicosis antigua, tratada adecuadamente pero en quien persistieron lesiones residuales en los ganglios mesentéricos. Estas lesiones ocasionaron obstrucción del drenaje linfático la que a su vez ocasionó ascitis. Los especímenes patológicos revelaron una gruesa cápsula fibrosa de tejido conectivo, con algunos depósitos de calcio, que rodeaba las lesiones. Se observó, además, la presencia de abundantes levaduras de *P. brasiliensis*, algunas en estado de degeneración. Todos los cultivos aeróbicos intentados fueron negativos; sin embargo, se logró recuperar el hongo cuando se utilizaron medios líquidos que ofrecían una atmósfera restringida en oxígeno (micro-aerofilia) (Restrepo *et al.*, 1981).

Este hallazgo llevó a un estudio sobre la tolerancia de la forma levadura del hongo a condiciones de oxigenación reducida (Restrepo *et al.*, 1981). Como se desprende de la Tabla 3, al cultivarla en condiciones de microaerofilia y de anaerobiosis, la proporción de levaduras vivas, que según la observación microscópica, contenía el inóculo inicial, disminuía paulatinamente con el tiempo de incubación. Sin embargo, en condiciones de microaerofilia, aproximadamente una cuarta parte de las levaduras retenía su vitalidad hasta la terminación del experimento (28 días). No sucedió así en los cultivos anaeróbicos, en los cuales una incubación de 14 días era suficiente para inactivar la totalidad del inóculo. Vale la pena anotar que la siembra de los medios líquidos así incubados, a medios sólidos aeróbicos, producía crecimiento de colonias con las características del *P.*

brasiliensis, confirmando la viabilidad de las levaduras. Ello indica que bajo esta forma, el hongo aprende gradualmente a tolerar restricciones en el acceso de oxígeno y logra así permanecer inactivo pero viable (Restrepo *et al.*, 1981). Este fenómeno podría explicar los prolongados períodos de latencia observados en las personas infectadas quienes, muchos años después de abandonar o de haber vivido en la zona endémica, padecen la micosis por reactivación de un foco primario insuficientemente controlado, posiblemente por fallas en su sistema de vigilancia inmune (San Blas, 1993). Es ésta otra demostración de la capacidad de adaptación de *P. brasiliensis* a condiciones deletéreas.

Bibliografía

- Arango, R. & A. Restrepo. 1988. Growth and production of iron chelants by *P. brasiliensis* mycelial and yeast forms. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 26: 113-118.
- Brummer, E., Hanson, L., Restrepo, A. & D.A. Stevens. 1989. Intracellular multiplication of *P. brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. *Infection and Immunity* 57: 2289-2294.
- , Castañeda, E. & A. Restrepo. 1993. Paracoccidioidomycosis: An update. *Clinical Microbiology Reviews* 6: 89-117.
- Bustamante, B., McEwen, J.G., Tabares, A.M., Arango, M. & A. Restrepo. 1985. Characteristics of the conidia produced by the mycelial form of *P. brasiliensis*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 23: 407-414.
- Cano, L.E., Brummer, E., Stevens, D.A. & A. Restrepo. 1992. Fate of Conidia of *P. brasiliensis* after ingestion by resident macrophages or cytokine-treated macrophages. *Infection and Immunity* 60: 2096-2100.
- , Gomez, B., Brummer, E., Restrepo, A. & D.A. Stevens. 1994. Inhibitory effect of deferoxamine or macrophage activation on transformation of *P. brasiliensis* conidia ingested by macrophages: reversal by holotransferrin. *Infection and Immunity* 62: 1494-1496.
- de Bedout, C., Cano, L.E., Tabares, A.M., Van de Ven, M. & A. Restrepo. 1986. Water as a substrate for the development of *P. brasiliensis* mycelial form. *Mycopathologia* 96: 123-130.
- Deepe, G.S. 1994. The immune response to *H. capsulatum*: Unearthing its secrets. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 123: 201-205.
- Guerinot, M.L. 1994. Microbial iron transport. *Annual Review of Microbiology* 48: 743-772.
- Lacaz, C.S. 1994a. Historical evolution of the knowledge on Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent, *P. brasiliensis*. En Franco, M., Lacaz, C.S., Restrepo, A., del Negro, G. *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Boca Ratón, Florida. pp. 1-12.
- . 1994b. *P. brasiliensis*: Morphology, evolutionary cycle, maintenance during saprophytic life, biology, virulence, taxonomy. En Franco, M., Lacaz, C.S., Restrepo, A., del Negro, G. *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Boca Ratón, Florida. pp. 13-26.
- McEwen, J.G., Bedoya, V., Patiño, M.M., Salazar, M.E. & A. Restrepo. 1987. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 25: 165-175.
- Newman, S.L., Gootee, L., Brunner, G. & G.S. Deepe. 1994. Chloroquine induces human macrophage killing of *H. capsulatum* by limiting the availability of intracellular iron and is therapeutic in a murine model of histoplasmosis. *Journal Clinical Investigation* 93: 1422-1429.
- Queiroz-Telles, F. 1994. *P. brasiliensis* ultra-structural findings. En: Franco, M., Lacaz, C.S., Restrepo, A., del Negro, G. *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Boca Ratón, Florida. pp. 27-48.
- Restrepo, A. 1993. Paracoccidioidomycosis. In Murphy, J.A., Friedman, H., Bendinelli, M. En *Infectious Agents and Pathogenesis*. Plenum Press, N.Y. pp. 251-276.
- . 1994. Ecology of *P. brasiliensis*. En Franco, M., Lacaz, C.S., Restrepo, A., del Negro, G. *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Boca Ratón, Florida. pp. 121-130.
- , Jimenez, B.E., & C. de Bedout. 1981. Survival of *P. brasiliensis* yeast cells under microaerophilic conditions. *Sabouraudia* 19: 301-305.
- , de Bedout, C., Cano, L.E., Arango, M.D., & V. Bedoya. 1981. Recovery of *P. brasiliensis* from a partially calcified lymph node lesion by microaerophilic incubation in liquid media. *Sabouraudia* 19: 295-300.
- , Cano, L.E., de Bedout, C., Brummer, E. & D.A. Stevens. 1982. Comparison of various techniques for determining viability of *P. brasiliensis* yeast-form cells. *Journal of Clinical Microbiology* 16: 209-211.
- Restrepo, B.I., McEwen, J.G., Salazar, M.E. & A. Restrepo. 1986. Morphological development of the conidia produced by *P. brasiliensis* mycelial form. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 24: 337-339.
- Ríos-Fabra, A., Restrepo, A. & R.E. Isturiz. 1994. Fungal infections in Latin American countries. *Infectious Diseases Clinics of North America* 8: 129-154.
- Salazar, M.E. & A. Restrepo. 1984. Morphogenesis of the mycelium to yeast transformation in *P. brasiliensis*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 22: 7-11.
- , Restrepo, A. & D.A. Stevens. 1988. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *P. brasiliensis*. *Infection and Immunity* 56: 711-713.
- San Blas, G. 1993. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent, *P. brasiliensis*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 31: 99-113.
- & F. San Blas. 1994. Biochemistry of *P. brasiliensis* dimorphism. En Franco, M., Lacaz, C.S., Restrepo, A., del Negro, G. *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Boca Ratón, Florida. pp. 49-66.
- Wanke, B. & A.T. Londero. 1994. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. En Franco, M., Lacaz, C.S., Restrepo, A., del Negro, G. *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Boca Ratón, Florida. pp. 109-120.
- Weinberg, E.D. 1984. Iron withholding: a defense against infection and neoplasia. *Physiology Reviews* 64: 65-102.