



UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO
PROGRAMA DE ESPECIALIDADES EN MICROBIOLOGÍA

*PARACOCCIDIOIDOMICOSIS, CONSIDERACIONES DE UNA MICOSIS
DESATENDIDA*

Trabajo final de investigación aplicada sometido a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Especialidades en Microbiología para optar al grado y título de Especialista en Micología Médica

ANDREA RUIZ MAYORGA

A03761

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

Octubre 2021

DEDICATORIA

A los pacientes que sufren enfermedades fúngicas y sus secuelas, las cuales en muchas ocasiones son menospreciadas y otras veces desatendidas u olvidadas. Que día a día podamos mejorar juntos su calidad de vida por medio del diagnóstico micológico.

AGRADECIMIENTOS

A la educación pública de nuestro país, por medio de la cual obtuve cada uno de los grados académicos que he alcanzado hasta el día de hoy.

Gracias infinitas a mis profesores de especialidad: Dra. Ingrid Salas, Dra. Daniela Jaikel, Dra. Lilliana Sandoval y a mi tutor el Dr. Allan Valverde. Gracias por todas las horas de esfuerzo y dedicación, por mantener viva la micología médica en Costa Rica.

A mis compañeros de especialidad por su alegría y amistad.

A mis compañeros del Hospital San Juan de Dios, gracias por todo el apoyo en cada etapa de este proceso de especialización.

A mi familia, mi mayor tesoro.

A Luis Alberto mi esposo y compañero de mil aventuras. Gracias por estar conmigo siempre.

A Dios, a quien le debo todo lo que soy.

Gracias

**SISTEMA DE ESTUDIOS EN POSGRADO
PROGRAMA DE POSGRADO EN ESPECIALIDADES EN MICROBIOLOGÍA****ACTA-72-2021****Acta presentación de Requisito Final de Graduación Trabajo de Investigación**

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el martes 5 de octubre de 2021 con el objeto de recibir el informe oral de la estudiante **Andrea Ruiz Mayorga** carné #**A03761**, quien se acoge al Reglamento General del Sistema de Estudios de Posgrado para presentar el Trabajo Final de Graduación, para optar por el grado académico de **Especialista en Micología Médica**. Están presentes los siguientes miembros del Tribunal Examinador: Allan Valverde Vindas, Esp., quien preside y tutor, Ingrid Salas Campos, MSc. y Mariamalia Cob Delgado, MSc. lectoras.

ARTICULO 1

Quien preside solicita a la postulante realizar la presentación oral de su Trabajo de Investigación titulado: **“Paracoccidioidomicosis: una revisión bibliográfica”**

ARTICULO 2

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan a la postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

ARTICULO 3

El Tribunal Examinador declara el Trabajo Final de Graduación: Aprobado Reprobado

ARTICULO 4

Se da lectura al acta que firman los miembros del Tribunal Examinador y el Postulante, a las 19:47 horas.

Nombre	Firma	No. Cédula
<u>Allan Valverde Vindas, Esp.</u> Quien preside	_____	<u>114290034</u>
<u>Ingrid Salas Campos, MSc.</u>	_____	<u>401380332</u>
<u>Mariamalia Cob Delgado, MSc.</u>	_____	<u>109890002</u>
<u>Andrea Ruiz Mayorga</u> Estudiante	_____	<u>111370280</u>

Observaciones: _____

1. Se solicita modificar el título del trabajo por: *“Paracoccidioidomicosis, consideraciones de una micosis Desatendida”*.

2. Se considera el trabajo merecedor de mención de honor. Por tanto, se solicita proceder con la respectiva asignación.

Nota: Solamente firmarán el acta los responsables de la actividad descrita

Si el trabajo es merecedor de mención de honor anotar en observaciones

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
TABLA DE CONTENIDOS	v
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Definición	2
1.2. Sinonimia	2
1.3. Historia	3
2. ETIOLOGÍA	8
2.1. Descripción de los agentes etiológicos	8
2.2. Clasificación taxonómica y aspectos genéticos	10
2.3. Dimorfismo	15
2.3.1. Vías de señalización intracelular del dimorfismo	16
2.3.2. Expresión de genes durante el dimorfismo	17
2.3.3. Otros mecanismos involucrados en el dimorfismo	18
3. ECOLOGÍA	19
3.1. Características del hábitat de <i>Paracoccidioides</i> spp.	19
3.2. El reservorio	20
4. ASPECTOS VETERINARIOS	22
5. EPIDEMIOLOGÍA	24
5.1. Distribución geográfica	24
5.2. Fuente de infección y vía de entrada	27
5.3. Sexo y edad	28
5.4. Período de incubación	32
5.5. Factores predisponentes	32
6. PATOGÉNESIS	37
6.1. Historia natural de la enfermedad	37

6.2. Factores de virulencia	39
6.2.1. Adhesión	40
6.2.1.1. Gp43	41
6.2.1.2. 32 kDa hidrolasa (PbHAD32)	42
6.2.1.3. Proteína de 30kD (Proteína 14-3-3)	42
6.2.1.4. Enolasa	43
6.2.1.5. Malato sintasa (MLT)	43
6.2.1.6. Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)	44
6.2.1.7. Fructuosa 1,6 bifosfato aldolasa (FBA)	44
6.2.1.8. Triosa fosfato isomerasa	45
6.2.1.9. Isocitrato liasa	45
6.2.1.10. Factor de elongación mitocondrial TufM	46
6.2.1.11. Otras moléculas asociadas a la adhesión: Aconitasa y Fosfolipasa B	46
6.2.2. Dimorfismo: cambios a nivel de la pared celular	48
6.2.3. Mecanismos de defensa contra el estrés ambiental	49
6.2.3.1. Melanina	49
6.2.3.2. Vesículas extracelulares	50
6.2.3.3. Defensa contra el estrés oxidativo	51
6.2.4. Invasión y diseminación	52
6.2.4.1. Rearreglo del citoesqueleto de las células no fagocíticas	53
6.2.4.2. Modulación de la apoptosis de células del hospedero	54
6.2.4.3. Modulación de la transducción de señales en las levaduras	54
6.2.4.4. Formación de biopelículas	55
6.2.4.5. Otros mecanismos de perpetuación del hongo	56
7. RESPUESTA INMUNE	60
7.1. Respuesta inmune innata	60
7.1.1. Respuesta innata celular	61
7.1.1.1. Receptores PRRs	62
7.1.1.2. Leucocitos polimorfonucleares y células NK	64
7.1.1.3. Macrófagos, ROS y RNS	65
7.1.1.4. Células dendríticas y otras células presentadoras de antígeno (APC)	67
7.1.2. Respuesta innata humoral	67
7.1.2.1. Sistema del complemento	68
7.1.2.2. Citoquinas	68
1) IFN- γ	68
2) IL-12	69
3) IL-4	69
4) IL-10	70
5) TNF- α	70
7.2. Respuesta inmune adaptativa	71
7.2.1. Respuesta humoral por anticuerpos	72
7.2.2. Respuesta adaptativa celular	73
7.2.2.1. Linfocitos T CD4 ⁺ y los CD8 ⁺ en la PCM	73
7.2.2.2. Linfocitos T reguladores y sus funciones en PCM	75
7.3. El granuloma en la PCM	78
7.4. Modulación de la respuesta inmune por <i>Paracoccidioides</i> spp.	81
7.4.1 Modulación de la respuesta innata	82
7.4.2 Modulación de la respuesta adaptativa	83

7.5. Vacunas contra <i>Paracoccidioides</i> spp. _____	84
8. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA PCM _____	86
8.1. La paracoccidioidomicosis como infección _____	86
8.2. Formas clínicas de la paracoccidioidomicosis _____	87
8.2.1. Forma aguda/subaguda (juvenil) _____	87
8.2.2. Forma crónica (adulto) _____	89
8.2.3. Forma residual _____	90
9. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LA PCM _____	92
9.1. Lesiones mucocutáneas _____	92
9.2. Lesiones linfáticas o ganglionares _____	93
9.3. Involucración pulmonar _____	94
9.4. Involucración ósea y formas viscerales diseminadas _____	96
9.5. Resumen de los diagnósticos diferenciales de la PCM _____	98
10. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA PCM _____	102
10.1. Diagnóstico micológico _____	102
10.1.1. Fase preanalítica _____	102
10.1.2. Examen directo _____	102
10.1.2. Cultivo de <i>Paracoccidioides</i> spp. _____	104
10.2. Diagnóstico histopatológico _____	107
10.3. Diagnóstico serológico _____	109
10.3.1. Intradermorreacción _____	110
10.3.2. Fijación del complemento _____	111
10.3.3. Precipitación en tubo _____	112
10.3.4. Inmunodifusión en agar _____	114
10.3.5. Técnica de aglutinación en látex _____	116
10.3.6. Inmunoelectroforesis y contraelectroforesis _____	117
10.3.6. Inmunobinding y Western blot _____	118
10.3.7. Discusión sobre las técnicas serológicas de diagnóstico de PCM _____	119
10.4. Diagnóstico molecular _____	120
10.4.1. PCR convencional _____	121
10.4.2. PCR anidado y PCR cuantitativo _____	122
10.4.3. Técnicas basadas en PCR para el tipaje de <i>Paracoccidioides</i> spp. _____	122
10.4.4. Amplificación isotérmica _____	124
10.4.5. Hibridación <i>in situ</i> _____	124
10.4.6. Espectrometría de masas y espectrometría infrarroja _____	124
10.4.7. Discusión sobre las técnicas moleculares de diagnóstico de PCM _____	127
10.5. Algoritmo propuesto para el diagnóstico de la PCM _____	127
11.1. Manejo terapéutico de la PCM leve y moderada _____	130
11.2. Manejo terapéutico de la PCM severa _____	131
11.3. Alternativas terapéuticas en poblaciones especiales _____	131
11.3.1. Embarazo _____	131

11.3.2. <i>PCM infantil</i>	132
11.3.3. <i>Pacientes en fase SIDA</i>	132
11.3.4. <i>Pacientes con patología renal</i>	133
11.3.5. <i>Pacientes con patología hepática</i>	133
11.4. Resistencia a los tratamientos contra la PCM	134
11.5. Uso de esteroides en el tratamiento contra la PCM	135
11.6. Moléculas antifúngicas en estudio	135
11.6.1. <i>Galato de decilo</i>	136
11.6.2. <i>Lectina ArtinM</i>	136
11.6.3. <i>Péptidos antibacterianos: el mastoparán</i>	137
11.6.4. <i>Derivados fúngicos: el farnesol y la citocalasina E</i>	137
11.7. Tratamientos utilizados en Costa Rica para la PCM	138
12. MODELOS DE INFECCIÓN	140
CONCLUSIONES	142
REFERENCIAS	146

RESUMEN

El presente trabajo corresponde a una revisión bibliográfica sobre el estado del conocimiento de las especies de *Paracoccidioides* spp. y los cuadros clínicos asociados a este hongo. La revisión inicia con un marco histórico sobre el desarrollo del conocimiento de la paracoccidioidomicosis a nivel latinoamericano, incluyendo un apartado sobre Costa Rica. Se detallan temas relacionados a la etiología, ecología, aspectos veterinarios y la epidemiología de la micosis.

Adicionalmente, se incluyen temas como la patogenicidad y los factores de virulencia de *Paracoccidioides* spp, así como la respuesta inmune que se desarrolla en el hospedero. Por último, y no menos importante, se describe lo encontrado en la literatura sobre los tópicos de diagnóstico diferencial, diagnóstico de laboratorio, el tratamiento contra la enfermedad, y las conclusiones del presente trabajo.

Este trabajo pretende recopilar el conocimiento básico sobre esta micosis y los últimos avances científicos reportados en la literatura en el tema de la paracoccidioidomicosis y su agente etiológico.

ABSTRACT

In this document, a literature review of the state of scientific knowledge about *Paracoccidioides* spp. species and their associated clinical manifestations was made. This review starts with a historical frame about knowledge development about paracoccidioidomycosis in Latin America, including Costa Rica. Etiology, ecology, veterinary aspects, and this mycosis epidemiology are reviewed.

Additionally, pathogenicity and virulence factors of the causing agent, *Paracoccidioides* spp., are included, as well as the host immune response to the fungus. Finally, topics such as differential diagnosis, laboratory diagnosis and the disease treatment are discussed, and the concluding remarks of this literature review are detailed.

This work tries to summarize basic knowledge about this mycosis and the latest scientific advances reported in literature about paracoccidioidomycosis and its etiological agent.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Moléculas involucradas en la virulencia de <i>Paracoccidioides</i> spp.....	58
Cuadro 2. Resumen de citoquinas involucradas según respuesta de células T colaboradoras.	81
Cuadro 3. Resumen de los diagnósticos diferenciales de la PCM.....	98
Cuadro 4. Composición de los medios Fava Neto, Kelly y Pine.....	105
Cuadro 5. Esquema terapéutico para el manejo de la PCM.....	134
Cuadro 6. Lesiones asociadas a PCM en Costa Rica y el tratamiento reportado.	138

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografías de las observaciones microscópicas del tercer caso de PCM reportado en Costa Rica. ...	6
Figura 2. Características morfológicas de <i>Paracoccidioides</i> spp.	9
Figura 3. Morfología de las conidias de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> y <i>P. lutzii</i>	10
Figura 4. Estructuras observadas en experimentos a apareamiento de <i>Paracoccidioides</i> spp.	12
Figura 5. Árbol filogenético esquemático de las especies del género <i>Paracoccidioides</i>	13
Figura 6. Esquema del fenómeno de dimorfismo en <i>Paracoccidioides</i> spp.	16
Figura 7. Esquema de la ecología de <i>Paracoccidioides</i> spp.	20
Figura 8. Evolución del conocimiento de la infección de <i>Paracoccidioides</i> spp. en animales.	23
Figura 9. Áreas endémicas de PCM.	25
Figura 10. Mapa de categorización de las áreas de endemicidad de la PCM.	27
Figura 11. Inducción del dimorfismo por temperatura en <i>Paracoccidioides</i> spp. y efecto del estradiol.	30
Figura 12. Diagrama de la región de los genes HLA (MHC) y sus clases en el cromosoma 6.	34
Figura 13. Flujograma de la historia natural de la PCM.	39
Figura 14. Representación esquemática de la afinidad de las adhesinas de <i>Paracoccidioides</i> spp.	48
Figura 15. Adaptación, defensa contra el estrés ambiental y diseminación de <i>Paracoccidioides</i> spp.	57
Figura 16. Vías inmunológicas de respuesta ante la interacción entre <i>Paracoccidioides</i> spp. y el hospedero.	75
Figura 17. Influencia de los PRRs en la expansión de linfocitos T _{Reg} en la PCM.	78
Figura 18. Modelo para explicar las respuestas inmunes observadas durante diferentes formas de PCM.	80
Figura 19. Manifestaciones clínicas de la PCM juvenil en niños y adultos.	88
Figura 20. Manifestaciones clínicas de la PCM crónica o adulta.	90
Figura 21. Diagnósticos diferenciales de la PCM mucocutánea.	93
Figura 22. Diagnósticos diferenciales de la PCM linfática o ganglionar.	94
Figura 23. Histopatología de los diagnósticos diferenciales de la PCM pulmonar.	95
Figura 24. Diagnóstico diferencial de PCM con fibrosis pulmonar y coinfección por histoplasmosis.	95
Figura 25. Diagnósticos diferenciales de la PCM con involucramiento óseo.	96
Figura 26. Diagnóstico diferencial de PCM en una esplenomegalia masiva.	96
Figura 27. Diagnóstico diferencial de neuroparacoccidioidomicosis.	97
Figura 28. Diagnóstico diferencial de PCM en caso con involucración gastrointestinal.	97
Figura 29. Levaduras multigemantes en examen directo positivo por PCM.	103
Figura 30. Cultivos en medios sólidos a temperaturas de 25-30°C y a 37°C de <i>Paracoccidioides</i> spp.	104
Figura 31. Morfología microscópica de <i>Paracoccidioides</i> spp. incubados a diferentes temperaturas.	107
Figura 32. Ulcera de la cavidad oral teñida con hematoxilina-eosina positiva por PCM.	108
Figura 33. Tinciones especiales para hongos mostrando levaduras multigemantes de <i>Paracoccidioides</i> spp.	109
Figura 34. Principio de la prueba serológica de fijación del complemento para el diagnóstico de la PCM. ...	112
Figura 35. Fundamento de la técnica de precipitación en tubo para el diagnóstico serológico de la PCM.	113

Figura 36. Diagnóstico serológico de la PCM por doble inmunodifusión radial.	115
Figura 37. Fundamento de la aglutinación en látex para el diagnóstico de PCM.....	116
Figura 38. Fundamento de la prueba de contrainmunolectroforesis.	117
Figura 39. Fundamento de la técnica de diagnóstico serológico Dot-ELISA o immunobinding.	118
Figura 40. Identificación de hongos miceliales por espectrometría de masas.....	126
Figura 41. Algoritmo de diagnóstico de la PCM, según el tipo de muestra para análisis.	128

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Células presentadoras de antígeno
CD	Células dendríticas
CIE	Contrainmunolectroforesis
CLR	Receptores de lectina tipo C
FBA	Fructuosa 1,6 bifosfato aldolasa
FC	Fijación de complemento
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i>
FT-IR	Espectrometría infrarroja con transformación de Fourier
GAL-3	Galectina 3
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
HE /H&E	Hematoxilina Eosina
HLA	Human Leukocyte Antigens
HSP	Proteínas de choque térmico
ID	Inmunodifusión
IDO	Indolamina 2,3 dioxigenasa
IFN	Interferón
IGS	Intergenic Spacer Regions
IL	Interleuquina
ITS	<i>“Internal Transcribed Spacer Regions”</i>
LAMP	Amplificación isotérmica mediada por bucle
LINES	<i>“Long interspread nuclear element”</i>
LTR	<i>“Long terminal repeat”</i>
MALDI-TOF	<i>“Matrix-assisted laser desorption/ionization -Time of flight”</i>
MAT	<i>“Mating Type”</i>
MHC	<i>“Major Histocompatibility Complex”</i>
MIC	Concentración mínima inhibitoria
MLSA	<i>“Multilocus sequence analysis”</i>
MLT	Malato sintasa
MR	Receptores de manosa
NK	Células asesinas naturales
NO	Óxido nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud

OPS	Organización Panamericana de la Salud
PABA	Ácido aminobenzoico
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PAS	Ácido peryódico de Schiff
PbST	Serina tiol proteinasa extracelular
PCM	Paracoccidioidomicosis
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMN	Leucocitos polimorfonucleares
PRRs	Receptores reconocedores de patrones
RAPD	Poliformismo de ADN aleatoriamente amplificado
rDNA	Operones ribosómicos
RFLP	<i>“Restriction fragment length polymorphism”</i>
RNS	Especies reactivas del nitrógeno
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RT	Retrotranscripción
SINEs	<i>“Short interspread nuclear element”</i>
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
SSR	<i>“Short sequence repeat”</i>
T _{reg}	Células T reguladoras
TAP	<i>“Transporter associated with Antigen Processing”</i>
TGF	Factor de crecimiento transformador
T _H	Linfocitos T cooperadores
TLR	<i>“Toll like receptor”</i>
TMX-SMX	Trimetoprim sulfametoxazol
TNF	Factor de necrosis tumoral
TPI	Triosa fosfato isomerasa
TUB1	Gen de la α tubulina



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

SEP Sistema de
Estudios de Posgrado

Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Andrea Ruiz Mayorga, con cédula de identidad 111370280, en mi condición de autor del TFG titulado Paracoccidioidomicosis, consideraciones de una micosis desatendida

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI NO *

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

1. INTRODUCCIÓN

Endémica de América Latina, la paracoccidioidomicosis (PCM) es una infección micótica que se presenta principalmente en personas que habitan zonas rurales, generalmente se trata de hombres dedicados a labores del campo y con mucha frecuencia esta enfermedad también está asociada a problemas socioeconómicos (1). En países como Brasil, donde se reporta la mayor incidencia de esta patología (2), muchos de los pacientes asisten a los centros de salud en etapas muy avanzadas de la enfermedad y esto afecta su calidad de vida e inclusive puede llevarlos a la muerte (3).

Más de 15 000 casos de PCM se han reportado desde 1930 hasta 2012 (4). Se estima que alrededor de 10 millones de latinoamericanos estarían infectados y que 1-2 % presentará alguna forma clínica de la enfermedad años o décadas después de la primoinfección (5). Pese a la severidad de la enfermedad y su prevalencia, la PCM no es de declaración obligatoria por lo que el subregistro de esta enfermedad se considera importante (6).

En este contexto, relacionado a la PCM se encuentra el término de enfermedad desatendida u olvidada. Este concepto se relaciona a una enfermedad que afecta a las personas más pobres, sin acceso a los servicios de salud e higiene básicos. La mayoría son enfermedades de evolución crónica e irreversible si no se diagnostican y tratan a tiempo. Son incapacitantes, lo que afecta al paciente y a su familia; la exclusión social por la estigmatización afecta también su salud mental (7).

En el 2018, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce como enfermedades olvidadas a la leishmaniasis, la lepra, la oncocercosis, la sarna, la filariasis y el micetoma, entre otras (8). La PCM no se encuentra citada dentro de este grupo de enfermedades; sin embargo, se asume que se encuentra “olvidada o encajonada” en el grupo denominado “micetoma, cromoblastomicosis y otras enfermedades micóticas profundas”(9).

Según la historia natural de esta enfermedad y lo descrito por diversos autores en sus reportes de caso, la PCM puede considerarse una enfermedad olvidada y desatendida de la cual el médico tiene poco o ninguna sospecha clínica en primera instancia. De aquí que el objetivo del presente trabajo es tratar de comprender mejor esta enfermedad y sintetizar

el conocimiento científico actual para ayudar a diagnosticar oportunamente esta micosis en nuestro medio y así mejorar la calidad de vida de los pacientes que la padecen y de sus familias.

En los siguientes apartados, se detallará la definición de la paracoccidioidomicosis, se listará la sinonimia de la enfermedad, junto a ejemplos de trabajos donde se emplean los distintos apelativos y, finalmente, se resumirá brevemente los aspectos históricos sobre la descripción inicial de la enfermedad y sus agentes etiológicos, así como los primeros trabajos científicos al respecto.

1.1. Definición

La paracoccidioidomicosis es una infección micótica sistémica granulomatosa primaria que se puede presentar de manera subaguda, aguda o crónica. La enfermedad es causada por los hongos dimórficos del género *Paracoccidioides* (10).

La infección inicia en los pulmones de donde puede diseminarse a distintas mucosas, además de piel, nódulos linfáticos y más infrecuentemente a órganos internos en pacientes inmunocompetentes. Dicha infección puede ser asintomática o subclínica y autolimitada, sin embargo, puede progresar y tornarse crónica e incluso producir la muerte si no se trata de manera oportuna (2,11).

Esta enfermedad es endémica en regiones tropicales y subtropicales de América Latina y suele ser más frecuente en hombres adultos de regiones rurales, asociada a actividades agrícolas (12). La mayoría de los casos se ha reportado en Brasil con cerca del 80 % de los casos (11). Asimismo, se han diagnosticado casos importados en Estados Unidos, Canadá, Europa, África y Asia, en pacientes que han vivido previamente en regiones endémicas (4,13). Actualmente se considera una de las micosis endémicas más frecuente en América Latina (10).

1.2. Sinonimia

Debido a su endemicidad en América Latina, principalmente en América del Sur, la paracoccidioidomicosis (PCM) también se conoce como (10,14):

- Blastomicosis suramericana (15,16);
- Blastomicosis brasileña (17);
- Blastomicosis latinoamericana (18);
- Granuloma paracoccidoidal (19);
- Blastomicosis paracoccidioidea (20);
- Hifoblastomicosis pseudococcidoidal (14);
- Micosis o enfermedad de Lutz (21);
- Micosis o enfermedad de Lutz-Splendore-de Almeida (22).

Los dos últimos nombres hacen referencia a los investigadores que describieron y estudiaron la paracoccidiodomicosis y su agente causal, como se detallará más ampliamente a continuación.

1.3. Historia

En 1908 en Sao Paulo, Brasil, Adolfo Lutz aisló, cultivó y describió al agente causal de la paracoccidiodomicosis a partir de lesiones bucales y de los nódulos linfáticos asociados, en dos pacientes masculinos (23,24). Igualmente, observó el fenómeno de dimorfismo fúngico, al describir levaduras multigemantes en el tejido y las formas filamentosas de crecimiento lento en cultivo en el laboratorio, a pesar de sus detalladas descripciones, no asignó un nombre al hongo que observó y llamó a la enfermedad “hifoblastomicosis pseudococcidoidal” (14,23).

Entre 1909 y 1912, Alfonso Splendore observó nuevos casos de esta enfermedad igualmente en Sao Paulo, Brasil y aisló el agente etiológico. Consideró que se trataba de un hongo ascomicete y lo llamó *Zymonema brasiliense* (10,25).

En 1930, Floriano Paulo de Almeida caracterizó ampliamente la enfermedad y su agente causal. Al presentar lesiones pulmonares similares, especuló que era similar a otro hongo dimórfico, *Coccidioides* (cuyo nombre deriva de una confusión con un protozooario

coccidio). Lo reclasificó al crear el nuevo género *Paracoccidioides*, llamando al hongo por tanto *P. brasiliensis* puesto que el epíteto de especie ya le había sido asignado (26). El nombre del género, al emplear el prefijo “para-” que significa “similar o cercano a”, implica que él podría traducirse como “similar a *Coccidioides*” y el epíteto específico hace referencia al país donde se llevaron a cabo las investigaciones y que todavía en la actualidad cuenta con el mayor número de casos, Brasil (10).

En 1931, Pablo Negroni confirmó las observaciones de Adolfo Lutz y describió ampliamente el fenómeno de dimorfismo en el agente causal de la paracoccidioidomicosis. Reportó una forma de levadura *in vivo* en cobayos y una forma micelial *in vitro* a temperatura cercana a 25 °C y la interconversión entre ambas formas (27).

En 1916, los trabajos pioneros de Arthur Moses sentaron las bases de las pruebas inmunológicas de precipitación y fijación de complemento para el diagnóstico serológico de la enfermedad (28). En 1927, da Fonseca y de Area Leão produjeron el primer antígeno de *Paracoccidioides* para uso intradérmico en el diagnóstico de la enfermedad (29). Basándose en estos trabajos, varias pruebas serológicas fueron estandarizadas por Fava-Neto varias décadas después (30,31).

En cuanto a las terapias, en 1940, Ribeiro (32) utilizó por primera vez sulfonamidas para tratar la paracoccidioidomicosis. A finales de la década de 1950, Lacaz, Sampaio y Ulson utilizaron la droga antifúngica anfotericina B *in vitro* y luego con pacientes con resultados positivos (33,34).

La patogénesis de la enfermedad se discutió durante años en aras de conocer el modo de infección y la diseminación del hongo. En 1956, se aportó información definitiva que apoyó la hipótesis planteada previamente de una inhalación de formas infectantes del hongo y una primera infección pulmonar (35), estos hallazgos serían confirmados tres años después en modelos experimentales (36).

Además, se realizaron múltiples esfuerzos por estudiar la ecología del hongo. Así, los primeros aislamientos del hongo en su fase saprófita en la naturaleza fueron realizados a finales de la década de 1960, en Argentina y Venezuela, a partir del suelo, por Negroni (37) y de Albornoz (38), respectivamente (14).

En 1971, se llevó a cabo el primer simposio panamericano sobre esta enfermedad en Medellín, Colombia, auspiciado por la Organización Panamericana de la Salud (OPS). En dicho simposio, se oficializó el término paracoccidioidomicosis para referirse a la enfermedad, por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoció también dicho nombre ese mismo año (10).

Luego de ser aislado de suelos varias décadas antes, el hongo patógeno causante de la paracoccidioidomicosis fue aislado de animales. El primer reporte de animales infectados con este hongo fue el de los armadillos en 1986 (39).

A partir del año 2005, varios estudios genéticos, genómicos y de la filogenia del hongo ampliaron el conocimiento de los agentes causales de la enfermedad (40,41). En 2013, la taxonomía del género *Paracoccidioides* se detalló al describir una nueva especie, *Paracoccidioides lutzii* en honor al descubridor del género (42). Además, se describió a la especie *P. brasiliensis* como un complejo con especies crípticas (42–44). Estos conceptos se detallarán más ampliamente en el apartado sobre la etiología de la enfermedad.

Costa Rica se considera una zona de baja endemicidad para esta enfermedad micótica, sin embargo, el primer caso de paracoccidioidomicosis descrito en Costa Rica, ocurrió en 1933 (45,46), antes que en otros países de Latinoamérica que presentan mayor número de casos como son Venezuela, cuyo primer caso fue reportado en 1937 (47,48), Colombia en 1950 (49,50) o México también en 1950 (14,51,52).

En Costa Rica, se han descrito pocos casos. El segundo caso de esta micosis fue reportado en 1949 (46,53), y un tercero en 1953 (46). Este tercer caso corresponde a un hombre de 61 años de edad, agricultor de la zona de Turrialba que presentaba lesiones en encías y en el surco nasogeniano (46). En 1963 se reportó un cuarto caso (54), un hombre de 54 años cuya ocupación y lugar geográfico de adquisición de la enfermedad no están claros. Adicionalmente, presentaba lesiones extensas de cromoblastomicosis en un miembro inferior y lesiones por paracoccidioidomicosis en pulmones, tejido linfoide, mucosa oral e incluso la pulpa dentaria (54). La figura 1 muestra las imágenes originales del reporte del tercer caso reportado en Costa Rica.

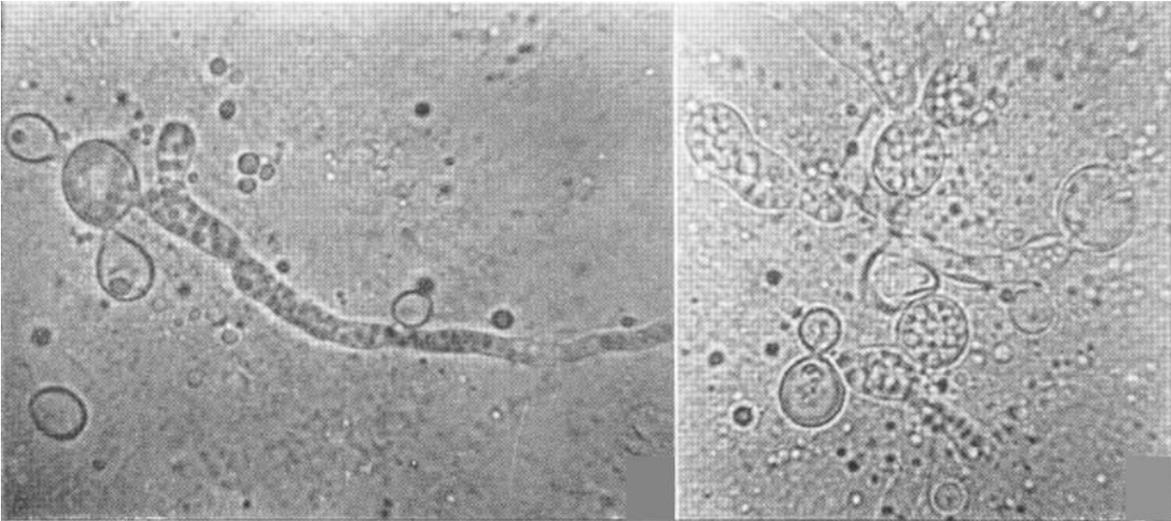


Figura 1. Fotografías de las observaciones microscópicas del tercer caso de PCM reportado en Costa Rica. En las fotografías originales del artículo se observan levaduras multigemantes al fresco y ampliadas 980X. Tomado y adaptado de Trejos & Romero 1953 (46).

Es de esperar que no todos los casos diagnosticados hayan sido publicados, por lo que los datos epidemiológicos de la enfermedad son probablemente subestimados. Esto puede evidenciarse por la falta de reporte de casos por varias décadas.

En 1986, se reporta el caso de una lesión en lengua, sin embargo, se desconocen los detalles pues el artículo no está disponible (55,56). En un reporte de casos publicado en 2008, que corresponde a una revisión de expedientes clínicos, se reportaron siete casos de paracoccidioidomicosis que ocurrieron entre 1999 y 2005 y afectaron a siete hombres con edades entre 15 y 88 años (edad promedio de 58 años), todos de zonas rurales y cinco de ellos agricultores, además de un fontanero y un estudiante. Todos los casos fueron diagnosticados en el Hospital San Juan de Dios y el Hospital México y provenían de Siquirres, Tejar del Guarco, Chachagua, Pérez Zeledón, San Vito de Coto Brus, Escazú y Puriscal. La presentación clínica de la enfermedad correspondía a dos casos de afectación pulmonar, uno de tejido ganglionar, uno de afectación pulmonar y tejido linfoide concomitantes, dos de mucosa oral y uno de hueso (57).

En 2011, se reportó el caso de un hombre de 70 años, agricultor, de la zona de Paraíso de Cartago, con una lesión circular ulcerada en la lengua producida por *Paracoccidioides* spp. que resolvió con tratamiento oral diario con 400 mg de ketoconazol

(58). En 2013, un reporte de un hombre de 49 años, agricultor de San Vito de Coto Brus describe afectaciones en piel, músculo y tejido óseo por este hongo patógeno (56). Finalmente, en 2019, se reportó un caso en un hombre de 60 años de edad, chofer de autobús con una masa en la cavidad oral y múltiples lesiones pulmonares (59).

Por ende, se puede concluir que, en Costa Rica, desde la primera descripción de la enfermedad hace casi un siglo, se han reportado cerca de 15 casos, todos en hombres adultos en su gran mayoría y de zonas rurales que se dedicaban a labores agrícolas. Las principales manifestaciones clínicas fueron a nivel pulmonar y en mucosa oral, además de tejidos linfoides y óseos. Sin embargo, no se debe olvidar que el subregistro de casos puede ser importante.

2. ETIOLOGÍA

2.1. Descripción de los agentes etiológicos

Los agentes etiológicos de la paracoccidioidomicosis son los hongos del género *Paracoccidioides* spp. Se trata de hongos dimórficos cuya morfología específica depende de la temperatura de incubación (60).

En tejidos infectados y cultivos *in vitro* a 37 °C, los hongos crecen de manera levaduriforme, con levaduras esféricas u ovaladas. Las colonias a esta temperatura y en medios ricos son levantadas, de color crema a café claro, pueden tornarse serosas y/o de apariencia húmeda (61). Microscópicamente, las levaduras poseen una pared refringente y son de tamaño variable, el diámetro puede variar entre 2 y 30 μm , según su estado de maduración, así como el aislamiento y/o la especie (62). Las células madre tienen un diámetro de 20 a 30 μm y las células hijas, de 2 a 10 μm (63). Las levaduras se multiplican por gemación múltiple, una misma célula madre puede producir de 10 a 12 células hijas. Las células hijas se unen a la célula madre con bases de implantación estrechas, otorgando a la estructura una forma similar a un timón de un barco (64). Cuando la célula madre presenta únicamente dos células hijas, se asemeja a la cabeza de “Mickey Mouse”, dichas estructuras son consideradas una característica diagnóstica de *Paracoccidioides* spp. (65). La observación de dichas estructuras es más sencilla con tinciones de azul de lactofenol, de plata metanamina de Grocott Gomori o de ácido peryódico de Schiff (PAS), con tinción de hematoxilina-eosina (HE) la visualización es más difícil ya que no tiñe fácilmente la pared fúngica (60).

La forma micelial crece lentamente a temperatura ambiente (20-30 °C). Luego de 15 a 30 días, se forman colonias blancas y compactas que se tornan aterciopeladas casi glabras o con micelio blanco aéreo corto que suele tornarse parduzco. El reverso suele ser crema o café claro (61). Microscópicamente, se puede observar micelio hialino septado con un ancho de 1 a 3 μm con ramificaciones (66). En la figura 2 se pueden observar algunas de las características coloniales y microscópicas de *Paracoccidioides* spp.

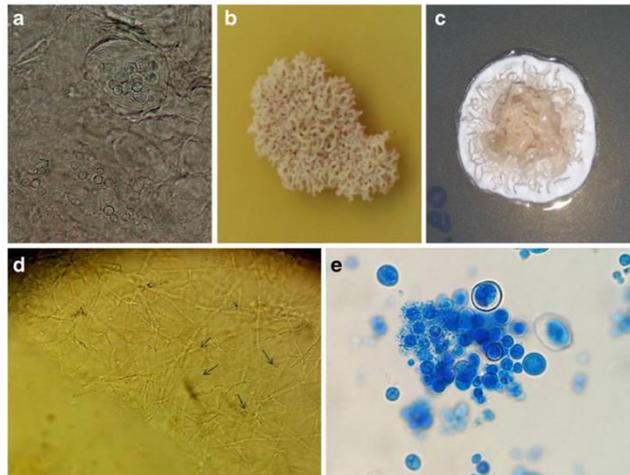


Figura 2. Características morfológicas de *Paracoccidioides* spp.

A. Levaduras en tejido del hospedero. **B.** Micelio en cultivo. **C.** Levaduras en cultivo. **D.** Micelio con conidias en cultivo en lámina. **E.** Levaduras en cultivo. Tomado y adaptado de da Costa & da Silva 2014 (67).

Cuando el hongo se cultiva en medios sin carbohidratos, se pueden observar clamidosporas intercalares o terminales, unas pocas conidias pueden ser observadas a lo largo de la hifa, de 2 a 5 μm de diámetro (60,61,67–69). Las conidias pueden germinar y producir levaduras a 37 °C capaces de infectar ratones o producir micelio ramificado a 20–30 °C (64). Una de las pocas diferencias morfológicas que se ha descrito entre *P. brasiliensis* y *P. lutzii* es la forma más alargada de las conidias de la segunda especie: *P. brasiliensis* presentó conidias de entre 2,25 y 7,99 μm (valor mediano de 5,13 μm), mientras que *P. lutzii* presentó conidias con un largo de entre 2,17 a 22,89 μm , con un valor mediano de 11,07 μm . Si bien es cierta la diferencia, el traslape de valores dificultaría la identificación de una especie u otra, basándose únicamente en este criterio, un tanto azarosa (70). En la figura 3 se puede apreciar los tamaños de las conidias de un aislamiento de *P. brasiliensis* y de otro de *P. lutzii*.

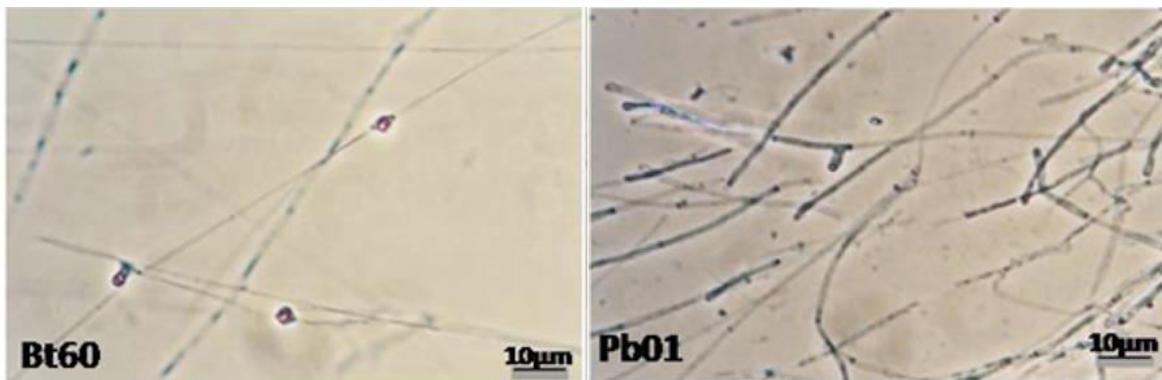


Figura 3. Morfología de las conidias de *Paracoccidioides brasiliensis* y *P. lutzii*.

Se observan las conidias de un aislamiento de *P. brasiliensis* y de otro de *P. lutzii*. Tomado y adaptado de Theodoro *et al.* 2012. (70).

2.2. Clasificación taxonómica y aspectos genéticos

Por casi un siglo, se consideró que el agente causal de la paracoccidioidomicosis era una especie huérfana en el género *Paracoccidioides*, *P. brasiliensis* (64), a pesar de una diversidad genética importante entre aislamientos de diferentes zonas endémicas de la enfermedad (71,72). Sin embargo, en 2006, el primer reporte de la filogenia molecular del hongo, sugirió la presencia de especies crípticas en *P. brasiliensis* (40). Además, una especie distinta se describió en 2009, *Paracoccidioides lutzii* (43,72–74).

Para entender los conceptos de especies crípticas y conocer la manera en la que se describieron las nuevas especies del género *Paracoccidioides*, es importante conocer primero el concepto de especie aplicado a la micología y las técnicas moleculares actuales que se emplean para definir las. Una especie puede definirse como “el conjunto con el menor número de poblaciones que tengan un linaje común que poseen características fenotípicas únicas y diagnósticas” ya sea a nivel morfológico, ecológico, fisiológico y/o metabólico (75). Sin embargo, un concepto tan amplio de especie se enfrenta a la necesidad de emplear una manera más sencilla de clasificación, una definición más actual y probablemente más práctica que emplea métodos moleculares sería que “especies diferentes representan linajes diferentes que evolucionaron independientemente sin intercambio de genes” (76,77).

Para determinar este intercambio de genes, la reproducción sexual es primordial, ya que esta suele definirse por el cruce de los individuos de las poblaciones en estudio (75). Por ende, lo primero que debería definirse en cualquier hongo a estudiarse es si presenta una fase de reproducción sexual.

Paracoccidioides spp. pertenece a la familia Ajellomycetaceae, orden Onygenales, clase Pezizomycotina (Euascomycetes) y filo Ascomycota (78). El proceso de reproducción sexual en los ascomicetes está controlada por los genes llamados *Mating-type* o *MAT1-1* y *MAT1-2* (79), ambos genes son idiomórficos (no alélicos), lo que significa que son genes alternativos y no homólogos (80). Ambos genes codifican por factores de transcripción que confieren identidad sexual a las células haploides (79).

Estudios moleculares demostraron la presencia de *MAT1-1* y *MAT1-2* en aislamientos del género *Paracoccidioides* spp. (41,81). Posteriormente, un estudio de 2013, identificó por estudios genómicos comparativos, la mayoría de los componentes de la vía de respuesta a las feromonas (vías de señalización iniciales para la diferenciación sexual) en 98 aislamientos de *Paracoccidioides* spp., y describió que la mayoría de los aislamientos (56 %) presentaron el locus *MAT1-1*, un tercio presentaron el locus *MAT1-2* (31 %) y 13 % presentaron ambos, lo que sugiere que podría existir homotalismo en el género *Paracoccidioides* (79), la capacidad de autofecundación sin necesidad de otro individuo (82). Para siete aislamientos, se determinó adicionalmente que los genes involucrados en la reproducción sexual se expresaban y esto en mayor nivel en la fase micelial. Asimismo, la co-incubación de aislamientos heterotálicos *MAT1-1* y *MAT1-2* produjo la formación de micelio enrollado, lo que sugiere la formación de ascocarpos, luego de dos meses. Sin embargo, no se pudo observar la formación de ascas o de un cleistotecio maduro incluso ocho meses luego de los co-cultivos; pero se observó una célula en una hifa enrollada que contenía múltiples núcleos, lo que sugiere migración nuclear durante la reproducción sexual (74,79).

Trabajos posteriores (83) lograron evidenciar los cambios morfológicos que permiten el apareamiento de las hifas y el desarrollo de cuerpos fructíferos de reproducción sexual llamados cleistotecios, en los que se producen las ascosporas (esporas sexuales), como ocurre en el género *Aspergillus* spp. y en *Histoplasma capsulatum*. El cleistotecio

debe rodearse de células especializadas que protegen y alimentan las ascosporas (84,85). En *Paracoccidioides* spp., se determinó la presencia de micelio enrollado y de estructuras similares a cleistotecios tempranos rodeados por células de Hülle (Figura 4). Sin embargo, estas estructuras similares a ascosporas no se pudieron cultivar (83).

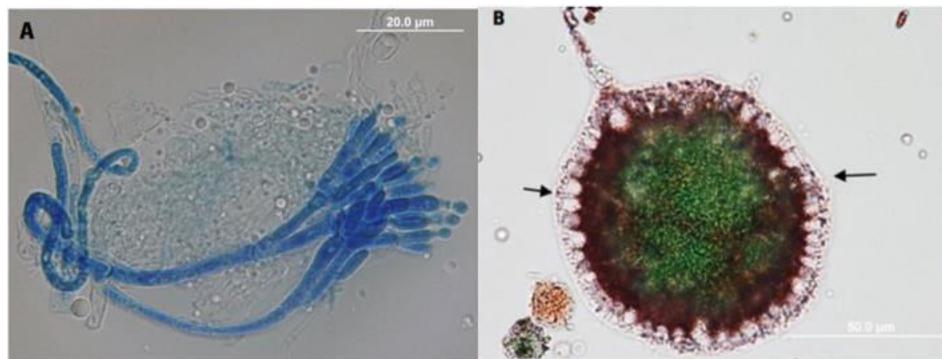


Figura 4. Estructuras observadas en experimentos a apareamiento de *Paracoccidioides* spp.

Se observan estructuras que recuerdan formaciones sexuales. **A.** Hifas arroyadas que se produjeron luego de 8 meses de co-incubación de aislamientos sexualmente compatibles. **B.** Tinción de ascosporas (en verde) y células de Hülle (señaladas con las flechas). Tomado y adaptado de Gomes-Rezende 2017 (83).

Debido a la incapacidad actual para producir ascosporas de *Paracoccidioides* spp. en el laboratorio, los estudios moleculares para definir especies en este género son las herramientas más comunes (74). En términos generales, las secuencias de regiones conservadas del ADN, que sean altamente variables, pueden emplearse para estudios filogenéticos que resulten en definición de especies. Los más empleados en micología son las regiones espaciadoras transcritas de los operones ribosómicos (rDNA), las “*Internal Transcribed Spacer regions*”, ITS1 e ITS2, así como las regiones espaciadoras no transcritas del mismo operón, las “*Intergenic Spacer Regions*” o IGS. Algunos otros genes (por ejemplo, de la β -tubulina o genes de histonas) se han empleado pues varían en sus intrones o en el tercer nucleótido del codón. Sin embargo, se carece de una metodología estandarizada que pueda emplearse en todos los clados de hongos y que sea universalmente aceptada, a diferencia de los estudios en bacterias que emplean, con varias limitaciones, el gen codificante del ARN ribosómico 16S (75).

En el caso específico de *Paracoccidioides* spp., dos estudios emplearon estrategias diferentes. El primer estudio empleó 5 genes nucleares (codificantes de la sintetasa de la quitina, la sintetasa del β -glucano, de la α -tubulina, del factor de adenilribosilación y de la gp43, glicoproteína inmunogénica e importante de la virulencia del hongo y determinó la presencia de especies crípticas en *P. brasiliensis* (40). El segundo estudio empleó cinco genes mitocondriales (*COB*, *COX3*, *RNS*, *RNL* Y *ATP6*) y pudo separar claramente las especies *P. brasiliensis* y la que sería luego llamada *P. lutzii* (42,73). Las especies crípticas ocurren cuando dos o más especies distintas se clasifican erróneamente bajo un mismo nombre de especie (86). De este modo, *P. brasiliensis sensu lato* es un complejo de especies crípticas compuesto por al menos cuatro especies: *P. brasiliensis sensu stricto* (que posee al menos dos demes o un grupo de individuos que pertenecen a un mismo clado, llamados S1a y S1b), *P. americana*, *P. restrepiensis* y *P. venezuelensis* (87). En la figura 5, se puede observar un árbol filogenético esquemático de la relación entre las especies de *Paracoccidioides* spp.

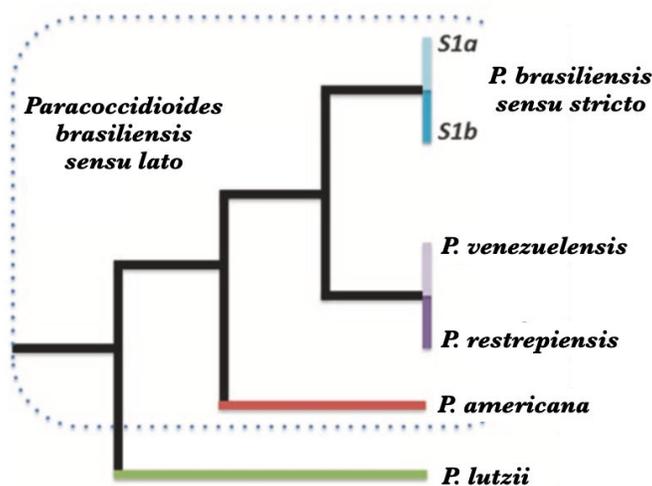


Figura 5. Árbol filogenético esquemático de las especies del género *Paracoccidioides*.

Se presentan, esquemáticamente, las cuatro especies crípticas de *P. brasiliensis* (o *P. brasiliensis sensu lato*): *P. brasiliensis sensu stricto* (con los dos demes: S1a y S1b), *P. americana*, *P. restrepiensis* y *P. venezuelensis*. Además, se presenta la especie *P. lutzii*. Tomado y adaptado de Niño-Vega *et al.* 2017 (64).

Los genomas de *Paracoccidioides* spp. poseen cinco cromosomas distintos, las células suelen ser diploides, aunque también pueden ser haploides y sus genomas poseen un

rango de entre 29,1 Mb y 32,9 Mb, y codifican por un estimado de entre 7 500 y poco más de 8 000 genes (41,88–90). Los genomas de este hongo son altamente colineares y presentan una sintenia alta (los genomas están estructurados macroscópicamente de la misma manera y presentan los genes en el mismo orden), lo que sugiere poca recombinación (71,91). La ausencia, o la poca frecuencia, de intercambio génico, pese a tener distribución similar para algunas especies (para una descripción ampliada, favor referirse al apartado ecología), concuerda con la división en especies diferentes de *P. brasiliensis sensu lato* (87).

Los contenidos de elementos transponibles entre los genomas de las diferentes especies de este hongo varían significativamente: menos de 10 % para especies como *P. brasiliensis sensu stricto* y *P. americana* (las que además poseen mayor porcentaje de identidad) y de más del 15 % para *P. lutzii*. Los más abundantes son los retrotransposones LTR (“*long terminal repeat*”) y los LINEs (“*long interspread nuclear element*”), y no presentan SINEs (“*short interspread nuclear element*”) (41,71).

Estudios del grupo de Leonel Mendoza mencionan dos temas de importancia: la existencia de una nueva variedad de *P. brasiliensis*, *P. brasiliensis* var. *ceti*, y abogan por la inclusión de *Lacazia loboi* dentro del género *Paracoccidioides* (92,93). Ambos hongos, llamados *P. brasiliensis* var. *ceti* y *L. loboi* por los autores, no han podido ser cultivados en el laboratorio y de los materiales que parten los autores son del ADN total aislado de las lesiones queloides subcutáneas y cutáneas en delfines de varias especies y de humanos. Por ende, la pureza del material y la posible co-infección por algún otro hongo o patógeno no pudo ser verificada. Los estudios se basan en amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de un fragmento de un gen específico, el gen *KEX*, de 151 bp. La filogenia de este gen, que difícilmente puede ser extrapolada al microorganismo completo, parece agrupar en un grupo monofilético las secuencias de *P. brasiliensis* (n=5) junto con las del llamado *P. brasiliensis* var. *ceti* (n=6). Adicionalmente, separa a *P. lutzii* (n=5) y *L. loboi* (n=4) de dicho grupo. El artículo utiliza además tres fragmentos adicionales de genes o intergenes (*ITS*, *GP43* y *CHS4*) con aislamientos distintos de los 4 hongos de interés y produce árboles filogenéticos que si bien es cierto separan los hongos, no siempre los agrupa en grupos monofiléticos. Adicionalmente, los autores mencionan que, si bien es cierto, las secuencias de los ITS separan claramente *P. brasiliensis*, *P. brasiliensis* var. *ceti*

y *P. lutzii* de *L. loboi*, las secuencias de genes codificantes de proteínas (datos no mostrados o afirmación incongruente con las figuras del artículo), mostrarían que tienen un ancestro común y que por ende pertenecen al mismo género, *Paracoccidioides* spp. (92).

Con estos datos, que como mínimo requieren de verificación, de un mayor número de aislamientos, de genes de mayor tamaño, de verificación de cambios a nivel de las proteínas, o mejor aún, de genomas completos y de aislamientos cuya pureza pueda verificarse, es difícil concluir si el grupo de Mendoza está en lo cierto o si se trata de datos preliminares. Un rápido análisis bibliométrico muestra que el artículo inicial de 2016 (92) ha sido citado cerca de 25 veces (un número bajo para hallazgos que, de ser ciertos, serían una pequeña revolución en micología médica), adicionalmente el segundo artículo se trata de un capítulo de libro, de un artículo de revisión (93) que ha sido citado únicamente dos veces.

2.3. Dimorfismo

El epitelio del tracto respiratorio es el primer sitio de interacción entre *Paracoccidioides* spp. y su hospedero. Durante la infección, las primeras células en encontrarse con el organismo son los macrófagos, las células endoteliales y las células epiteliales alveolares (94). Este evento puede contribuir activamente en los eventos de señalización durante la respuesta inmune pero también puede ser un factor de evasión de la respuesta inmune y de diseminación (95). Adicionalmente, se ha detectado la presencia de levaduras a nivel intracelular, esta característica fue observada también en neutrófilos y en la superficie del tejido mucocutáneo infectado (96).

Una vez que se ha inhalado la conidia o el fragmento de hifa y que llega al alvéolo pulmonar, se debe dar el cambio morfológico hacia su forma levaduriforme. Esto es un requisito para el establecimiento del hongo en el hospedero (97). Este fenómeno, conocido como dimorfismo, se define como la capacidad de un hongo de importancia médica de transformarse entre dos morfologías, cada una de ellas asociada a condiciones ambientales específicas (98,99). *Paracoccidioides* spp. se encontrará en forma de levadura multigemente, con base de implantación puntiforme, a 37 °C en el organismo del hospedero afectado y en forma de micelio hialino septado en su forma saprofítica (100,101). En la

figura 6 se puede observar un esquema del dimorfismo en *Paracoccidioides* spp.

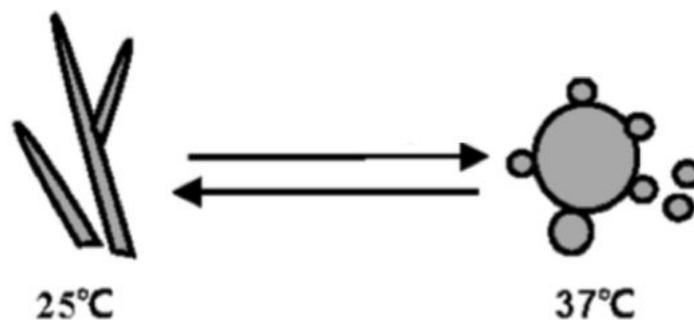


Figura 6. Esquema del fenómeno de dimorfismo en *Paracoccidioides* spp.

Se presenta una vista muy simplificada y esquemática del dimorfismo en *Paracoccidioides* spp. Tomado y adaptado de Li & Nielsen 2017 (101).

A continuación, se describirán los principales mecanismos del proceso de dimorfismo conocidos en la actualidad.

2.3.1. Vías de señalización intracelular del dimorfismo

Existen tres vías de señalización principales involucradas en el proceso de dimorfismo (102) que están conservadas en los hongos dimórficos para lograr el cambio de micelio a levadura a 37 °C: i) Sistema de dos componentes, ii) las proteínas G heterotriméricas y Ras, y iii) las vías dependientes de calcio.

Los sistemas de dos componentes de *P. brasiliensis* están regulados por la histidin quinasa reguladora del dimorfismo *DRK1*, cuya función es semejante en *H. capsulatum* y *Blastomyces dermatitidis*. Durante la transición de fase micelial a levaduriforme aumentó la expresión del ARNm de *PbDRK1* después de 24 horas de incubación a 37 °C. Al someterse la forma micelial a un inhibidor de *DRK1*, se observó una disminución en la transición dimórfica (103).

Por su lado, las GTPasas Ras controlan diversos procesos como la señalización de AMPc, morfogénesis, diferenciación, progresión del ciclo celular y la expresión de genes de patogenicidad. Diversos estudios han demostrado que las proteínas G heterotriméricas y la señalización por Ras influyen en el dimorfismo. Las unidades alfa y beta de las proteínas

G heterotriméricas son inducidas durante el cambio de micelio a levadura. Los inhibidores de las proteínas Ras promueven, por el contrario, la transición de levadura a micelio (104).

Por último, el dimorfismo también está muy relacionado con las vías de señalización del calcio, a través de las proteínas de choque térmico (Hsp90), que unen y estabilizan la calcineurina, controlando de esta manera la diferenciación celular (105,106). Su expresión aumenta considerablemente durante la transformación de micelio a levadura, en una respuesta que es termodependiente (105). La chaperona PbHsp90 también es importante para prevenir el daño celular y durante el crecimiento en medios ácidos, aumentando la capacidad del hongo para adaptarse en el hospedero (102).

Estas vías de señalización promueven la transcripción de genes que, como se dijo, están relacionados con el cambio morfológico y fisiológico llamado dimorfismo.

2.3.2. Expresión de genes durante el dimorfismo

Se ha identificado algunos de los genes que se expresan durante el proceso de dimorfismo en *Paracoccidioides* spp., lo que ha permitido conocer mejor las adaptaciones metabólicas del hongo que están relacionadas con el ambiente en el que vive (102). Se ha demostrado que se da la expresión de proteínas involucradas en el metabolismo de aminoácidos, nitrógeno, transducción de señales y muchas proteínas de choque térmico como Hsp88, Hsp90 y Hsp70 (62,107).

Adicionalmente, enzimas como la transaldolasa y la transcetolasa son inducidas durante el dimorfismo indicando una sobreexpresión de la vía de las pentosas, ligada a la producción de intermediarios como la fructuosa-6-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato; el reciclaje de NADP⁺ a NADPH, lo cual será utilizada por la levadura para producir ATP bajo condiciones de anaerobiosis (102).

Al ser fagocitadas por macrófagos, neutrófilos y las células dendríticas (108), el ambiente disminuido en glucosa y aminoácidos es una presión que selecciona positivamente estrategias para sobrevivir en condiciones de privación de estos nutrientes en las levaduras de *Paracoccidioides* spp. (102).

Cuando la concentración de carbono en el ambiente es baja, *P. lutzii* aumenta el transporte específico de cobre, hexosas y monosacáridos, y aumenta el metabolismo de proteínas para la degradación de aminoácidos y utilización de precursores de la β oxidación

como acetyl-CoA, piruvato, oxalacetato y succinato para la producción de etanol. Se favorece también la gluconeogénesis y el ciclo de Krebs. Estos mecanismos se utilizan para sobrevivir dentro del macrófago (109). Adicionalmente, durante el estrés oxidativo se aumenta la respuesta ante las especies reactivas del oxígeno con producción de enzimas como citocromo C peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa (110).

2.3.3. Otros mecanismos involucrados en el dimorfismo

Diversos estudios muestran que el metabolismo del sulfuro está directamente correlacionado con la virulencia de bacterias y hongos dimórficos. Los compuestos de sulfuro son importantes en la formación de grupos tiol, vitales para gran variedad de compuestos celulares y procesos de señalización (111).

Los requerimientos de sulfuro de *P. brasiliensis* difieren en su estado micelial y levaduriforme (112–114). El factor de transcripción SCONC regula negativamente la vía de asimilación de sulfuro inorgánico y la disminución en su expresión promueve la transición de micelio a levadura (111,112,114).

Por otro lado, la síntesis de poliaminas, necesarias para el crecimiento celular y la diferenciación de células eucariotas, también se ha relacionado con el dimorfismo (102). Las poliaminas son originadas a partir de la descarboxilación de ornitina por la enzima ornitina descarboxilasa, produciendo la primera poliamina de la vía metabólica, la putresina (115). *P. brasiliensis* presenta niveles altos de actividad de esta enzima, en la transición de micelio a levadura, durante la gemación y el desarrollo de las levaduras. La adición de un inhibidor de esta enzima inhibe la transición dimórfica (115,116).

3. ECOLOGÍA

3.1. Características del hábitat de *Paracoccidioides* spp.

La zona de distribución de *P. brasiliensis* está limitada entre el Trópico de Cáncer y de Capricornio. La zona “reservárea” de la PCM se ubica entre los 30° latitud Sur y 34° latitud Norte, con precipitación pluvial de 500 a 2000 mm y altitud de 500 a 2000 m, temperatura media 14-18 a 23-30 °C, con presencia de ríos y corrientes de agua. Se considera que el hongo habitaría el suelo con estas condiciones geográficas. Además, el suelo debe ser rico en sustancias orgánicas y tener un pH ácido (6). Otros autores citan rangos de precipitación pluvial de entre 2000-2999 mm/año y elevaciones de suelo menores de 800 m (112).

En las últimas décadas se ha observado un cambio en las características demográficas y geográficas de la distribución de la PCM. Estos cambios son atribuibles al aumento en la urbanización, la mejora en los métodos de detección de la enfermedad y la presencia de múltiples comorbilidades e inmunosupresión (1). Además, factores ambientales como la deforestación y el incremento de la producción de café podrían contribuir al aumento en la incidencia en zonas endémicas (117). Los cambios climáticos pueden asociarse también a aumentos en la incidencia de la enfermedad. Por ejemplo, a principios de la década de 1980, en el sur de Brasil, debido al fenómeno de El Niño, se dio un aumento en la temperatura del suelo y la humedad, lo cual fue favorable para la esporulación del hongo y su dispersión. Durante este período de tiempo, se observó un aumento en el número de casos de PCM en esta zona, el cual se asoció a este fenómeno atmosférico (118).

En su interacción con el medio ambiente, tanto los seres humanos como los armadillos de nueve bandas y los armadillos de siete bandas pueden convertirse en hospederos accidentales de *Paracoccidioides* spp. Sin embargo, *P. lutzii* no ha sido aislado de armadillos (1). Además, se ha descrito que *P. lutzii* está concentrado en el centro y el oeste de Brasil, región en la cual este microorganismo ha sido aislado. En términos generales, todos los datos sobre eco-epidemiología, infección y las manifestaciones clínicas no distinguen entre estas dos especies del agente causal (119). En la figura 7 se puede observar la interacción entre ser humano, el ambiente, los animales y el hongo patógeno.

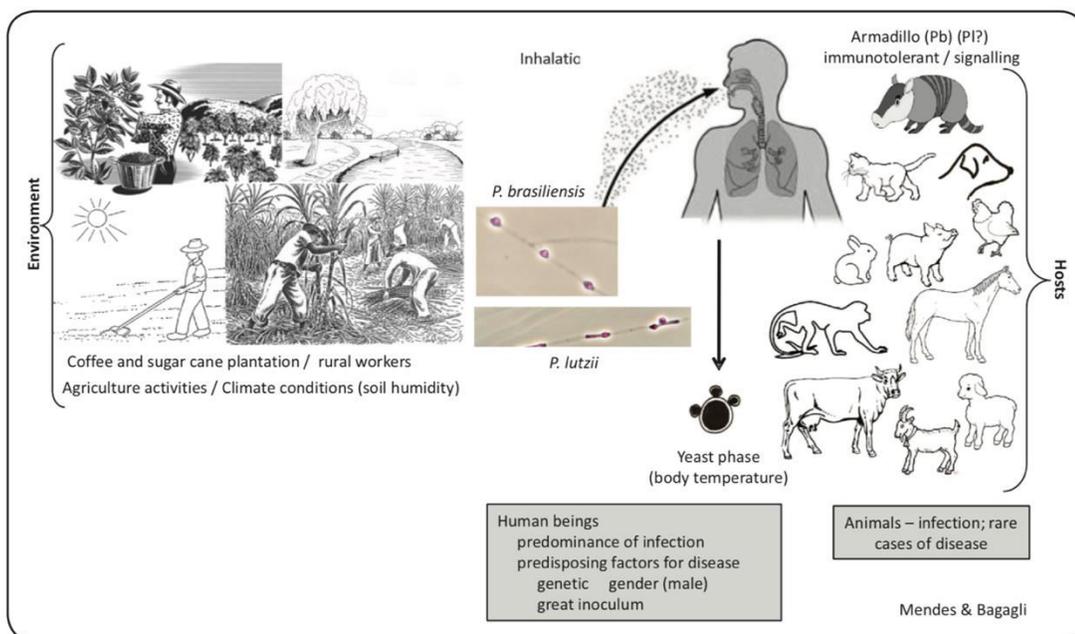


Figura 7. Esquema de la ecología de *Paracoccidioides* spp.

Se representa la ecología de *Paracoccidioides* con los aspectos del ambiente, el hongo y los posibles hospederos del hongo (incluido el ser humano). Tomado de Shikanai-Yasuda *et al.* 2017 (1).

3.2. El reservorio

El armadillo de nueve bandas, *Dasypus novemcinctus*, es el reservorio conocido para *P. brasiliensis*. El hongo puede ser aislado con facilidad del armadillo en órganos como bazo, hígado y nódulos linfáticos lo cual indica un proceso sistémico (102,120).

En el estudio de la biología del hongo en este reservorio, los investigadores, principalmente en Brasil, se han dado a la tarea de capturar armadillos y determinar la presencia del hongo en ellos. Se ha logrado encontrar armadillos que desarrollan el granuloma pulmonar, el cual contiene las formas levaduriformes. Este hallazgo establece la relación entre los seres humanos y los armadillos, sugiriendo que las infecciones ocurren en el mismo ambiente que comparten sea este agrícola o el bosque (120).

Los armadillos están en contacto estrecho con el suelo, excavan túneles y viven en madrigueras subterráneas, con lo cual favorecen la dispersión de las esporas del hongo. También se considera al armadillo como un hospedero atractivo para *Paracoccidioides*

brasiliensis, ya que tienen una temperatura corporal baja y la inmunidad celular disminuida (alrededor de 32-33°C), lo que permite el desarrollo de la infección y podría ser un factor importante en la evolución de este hongo en condición zoofílica. Por medio de técnicas como la PCR anidada se ha logrado la identificación de *Paracoccidioides* spp. en aerosoles de la entrada de madrigueras de armadillo (121).

4. ASPECTOS VETERINARIOS

En la naturaleza, *P. brasiliensis* y *P. lutzii* desarrollan la forma filamentosa y producen la forma infectante que corresponde a la conidia. Si se inhala, este propágulo puede transformarse a una forma levaduriforme dentro del hospedero, proceso conocido como dimorfismo. La infección se puede producir tanto en el ser humano como en animales domésticos y salvajes. El armadillo de nueve bandas y el armadillo de siete bandas son reconocidos como el reservorio en la naturaleza de *Paracoccidioides* spp. (1).

La infección por *Paracoccidioides* spp. se ha documentado en animales de experimentación como ratones, ratas, hámsteres, cerdos de guinea, perros y ganado. En la naturaleza, la infección se ha descrito en animales de compañía y animales salvajes; esto se ha demostrado por medio de la prueba de intradermorreacción, ensayos serológicos, histopatológicos, moleculares y el aislamiento del patógeno en cultivo. Se ha encontrado que la seroprevalencia en los animales de zonas endémicas puede alcanzar hasta un 80 % de positividad. Entre los animales con seropositividad podemos citar a los perros en zonas endémicas de Brasil y de Argentina especialmente en zonas rurales (119).

También se ha observado la infección en gatos (122), pollos (123), ganado vacuno de leche (124), cerdos (125), cabras (126), conejos (127) y ovejas (128). Entre los animales salvajes se puede citar al mono capuchino (*Cebus* spp.), monos aulladores dorados (*Alouatta caraya*), pequeños roedores, armadillos de nueve bandas desnudos, armadillos de nueve bandas, armadillos de siete bandas, puerco espines, comadreja y mapaches (119).

En el caso de los armadillos citados anteriormente, se ha demostrado la multiplicación del hongo en órganos internos como en ganglios mesentéricos y lesiones menos extendidas en hígado y bazo. En algunas zonas endémicas se ha encontrado positividad de hasta el 100 % en los cultivos. No hay evidencia clara de si los armadillos infectados desarrollan los signos de la PCM activa, ya que se han observado pocos granulomas que contienen formas fúngicas tanto en ganglios linfáticos, hígado y pulmón. También se han encontrado animales infectados como osos hormiguero, osos perezosos, tanto al realizar pruebas moleculares como en la histopatología (120).

Por último, citar que en los últimos años se han realizado estudios para determinar la incidencia de *P. lutzii* en animales de zonas de Brasil. En un estudio realizado en 2017 se

incluyeron 85 animales salvajes, 200 caballos y 196 perros domésticos. De estos animales 105 fueron positivos en la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos anti-*P. lutzii*. Este estudio se realizó con animales de la zona norte de Brasil, lo cual llama la atención ya que los estudios anteriores muestran que esta especie se encuentra principalmente en el centro oeste y sureste de este país (129).

En la figura 8 se puede observar un panorama general de la evolución del conocimiento de la paracoccidioidomicosis en animales.

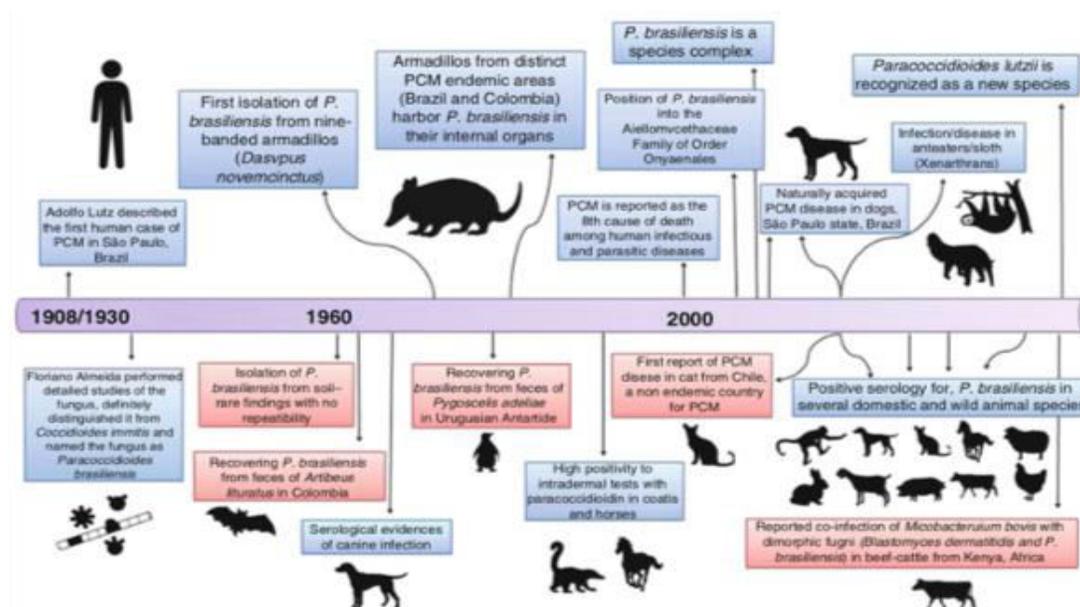


Figura 8. Evolución del conocimiento de la infección de *Paracoccidioides* spp. en animales.

Se observa que, con el paso del tiempo, el hongo se detecta en más animales, en rojo se señalan las descripciones anecdóticas sin repetición y/o confirmación de un nuevo hospedador. Tomado de Bosco & Bagagli 2018 (119).

En armadillos, la formación de granulomas puede observarse en el hígado y los pulmones, lo que indica que estos animales desarrollan la PCM (130). En perezosos de dos dedos, se ha reportado letargia progresiva, anorexia y deshidratación. En la necropsia de dichos animales, se detectaron lesiones granulomatosas en pulmones, hígado, bazo y riñones con numerosas levaduras (131). Adicionalmente, los perros son comúnmente infectados por *Paracoccidioides* spp., sin embargo, la enfermedad se ha reportado en pocos casos, con reportes de linfadenomegalia (132–134).

5. EPIDEMIOLOGÍA

5.1. Distribución geográfica

Paracoccidioides spp. es un hongo endémico del continente americano, específicamente de América Latina, crece de forma saprófita en el suelo, y rara vez se ha logrado su aislamiento en la naturaleza. Esto impide conocer de forma exacta la ubicación y las características del nicho donde este hongo se encuentra (99,120).

Se considera que la forma micelial del hongo es la que se desarrolla en la naturaleza y que está asociada a regiones húmedas, con pluviosidad de media a alta, temperaturas cálidas y la presencia de ríos y bosques. En los últimos años se ha descrito que se puede encontrar el hongo y que la enfermedad y las formas asintomáticas también se presentan en zonas de cultivos agrícolas. Estas zonas con vegetación primaria, suelos arenosos y ácidos también permiten el desarrollo del hongo (121).

Por mucho tiempo se reconoció un único agente del género *Paracoccidioides* (*P. brasiliensis*). Sin embargo, los estudios genotípicos han revelado variantes de esta especie, que se han asignado como especies crípticas y estas son:

- **S1a, S1b:** la más común y aislada de diferentes regiones de Brasil, Argentina y Paraguay (*P. brasiliensis sensu stricto*)
- **PS2:** aislado de Brasil y Venezuela, pocos reportes (*P. americana*)
- **PS3:** aislado de Colombia (*P. restrepensis*)
- **PS4:** aparentemente restringido a Venezuela (*P. venezuelensis*) (1,74,135)

Una especie distinta, *P. lutzii* fue descrita hace más de diez años (43), como se indicó previamente. En la figura 9 se puede observar la distribución geográfica de las especies de *Paracoccidioides* spp. actualmente descritas.

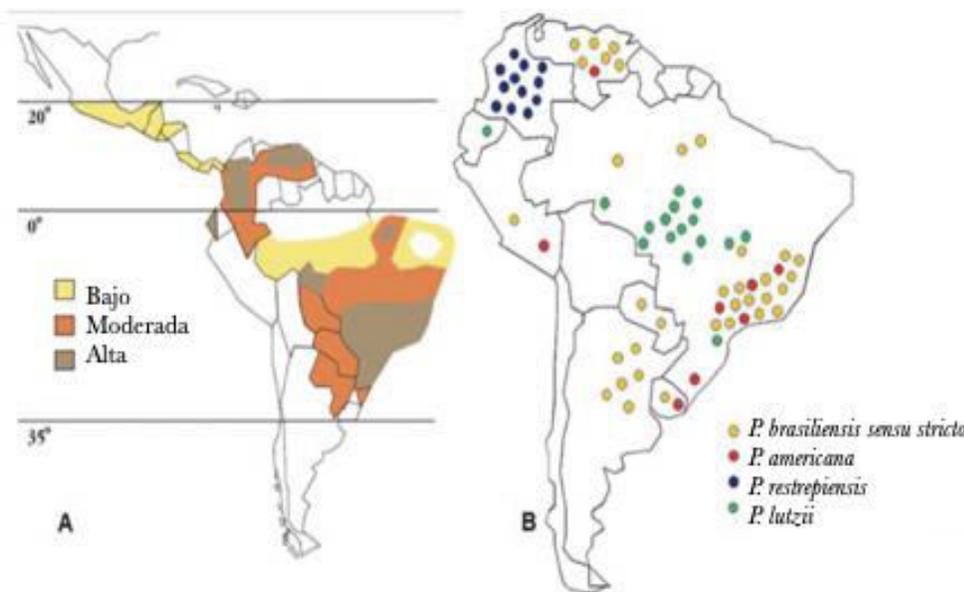


Figura 9. Áreas endémicas de PCM.

Se observa la distribución geográfica de las áreas endémicas de la paracoccidiomicosis y de las especies de *P. brasiliensis* y *P. lutzii*. Tomado y adaptado de Bosco & Bagagli 2018 (119).

El área endémica se extiende desde México hasta Argentina, con mayor prevalencia en América del Sur con respecto a América Central. El país que cuenta con la mayor cantidad de casos es Brasil, seguido de Venezuela y de Colombia. Otros países con alta incidencia son Ecuador y Argentina. La enfermedad es rara en los estados del noreste y en el bosque tropical de Manaus, Amazonía de Brasil. No se han documentado casos en algunos países de América del Sur, incluidos Guyana, Surinam, Guyana Francesa y Chile. Tampoco se reportan casos en países de América Central como en Nicaragua y Belice. Finalmente, no se reportan casos en las Antillas u otras islas del Caribe (2).

Se han encontrado casos de paracoccidioidomycosis en países fuera de la zona endémica, más de 60 casos se han reportado en América del Norte, Europa, África y Oriente Medio. Por ejemplo, desde el 2011, se han reportado más de 18 casos en Japón. Este aumento en el número de casos es esperado dado el incremento de viajes internacionales y las migraciones en los últimos años (99,112).

Debido a que la PCM no es de declaración obligatoria en los países latinoamericanos, la verdadera prevalencia e incidencia no se conoce. Así, en Costa Rica la

enfermedad tampoco se encuentra en la lista de enfermedades de declaración obligatoria. Por ende, en nuestro país, el conocimiento de casos se da por medio de publicaciones científicas de reportes de casos, desde el año 1933.

En Brasil se estima que hay una incidencia anual de 1-3 casos/100 000 habitantes y que la mortalidad promedio es de 0,14/ 100 000 personas (136). Las áreas endémicas se han establecido por medio del uso de la intradermorreacción. Borelli, en 1964, propuso diferenciar las áreas endémicas donde los casos generalmente se diagnostican, de las áreas donde se adquiere la infección, ya que estos sitios corresponden al micronicho del hongo. Para describir estas áreas se utiliza el término “reservárea” (137).

Con respecto al establecimiento de las áreas endémicas, el uso de la prueba intradérmica o paracoccidioidina se ha utilizado para orientar el estudio de la epidemiología del hongo. El antígeno desarrollado por Fava-Netto en Brasil en 1961 tiene como base un polisacárido obtenido de la fase levaduriforme de *P. brasiliensis* (6,138). En los últimos años se ha implementado el antígeno Gp43 para realizar la intradermorreacción en poblaciones pediátricas de Brasil (139).

En la figura 10 se puede observar la categorización de las áreas de endemidad de la paracoccidioidomicosis según el número de casos reportados.

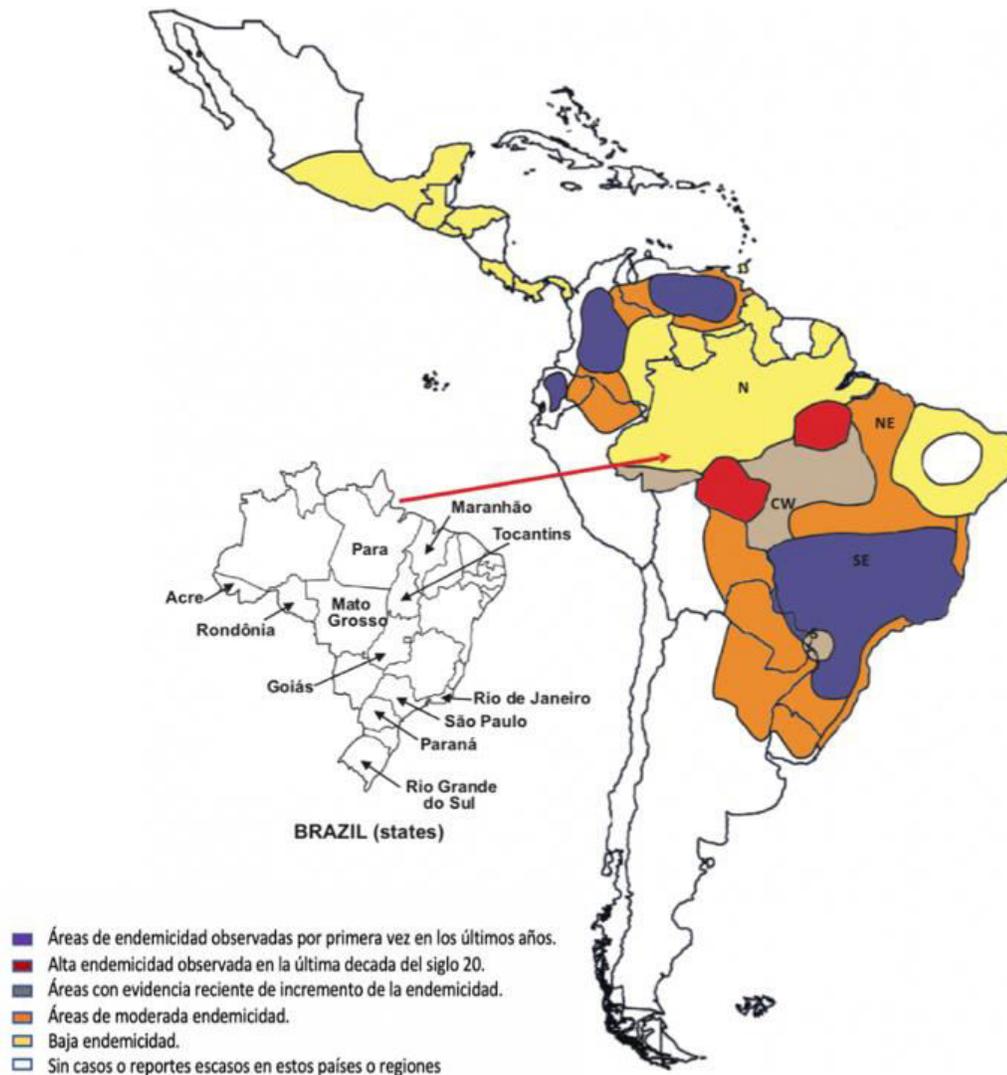


Figura 10. Mapa de categorización de las áreas de endemicidad de la PCM.

Se observan las áreas geográficas de la endemicidad de la paracoccidioidomicosis en América Latina.

Tomado y adaptado de Shikanai-Yasuda *et al.* 2017(1).

5.2. Fuente de infección y vía de entrada

Es bien conocido que la inhalación de fragmentos de hifas, clamidosporas o microconidias es el paso inicial para desarrollar la PCM (14). Estas formas se transformarán en células levaduriformes dentro de los macrófagos alveolares del hospedero. Puede no existir un período de latencia, pero lo más común es la reactivación de un foco quiescente o granuloma luego de algún tiempo (140). De la interacción entre el

hospedero y las especies de *Paracoccidioides* spp. dependerá el desenlace de este encuentro (141,142). La inoculación directa del hongo en piel o la mucosa oral no es común, aunque podría explicar algunos casos de lesiones de tegumento sin involucración pulmonar (143).

Tanto *P. brasiliensis* como *P. lutzii* entran en el cuerpo por el tracto respiratorio, y desarrollan tanto las formas subclínicas de la enfermedad como la diseminación a piel y otros órganos. Menos frecuente como se mencionó anteriormente, la ruta traumática se puede presentar de forma especial en personas con oficios de zonas rurales relacionadas al trabajo de campo; se ha descrito que la inoculación puede darse por limpiarse los dientes o la zona anal con materia vegetal (144).

5.3. Sexo y edad

Ambos sexos tienen la misma probabilidad de ser infectados, pero el desarrollo de la enfermedad, especialmente las formas crónicas es más frecuente en hombres que en mujeres, con una proporción promedio de 13:1 o 15:1. Las mujeres están protegidas de la enfermedad por el estradiol, el cual previene que las formas filamentosas desarrollen la forma levaduriforme (1,5).

La PCM es una infección primaria, que se adquiere por lo general en las dos primeras décadas de la vida, con un pico entre los 10 a 20 años. Sin embargo, las manifestaciones clínicas y la evolución de la enfermedad se presentan con poca frecuencia en esta edad. Por el contrario, la PCM ocurre con mayor frecuencia en adultos con edades entre los 30 y los 50 años, lo que resulta de la reactivación de un foco latente endógeno (145). Aunque pueden existir diferencias entre regiones, en promedio solo un 10 % de personas de alrededor de 20 años manifiestan la enfermedad y el 90 % restante presentan síntomas en etapas más tardías. En la niñez, la frecuencia de los casos se distribuye igual entre ambos sexos, con una pequeña predominancia en varones (1).

En estudios de casos se ha documentado que alrededor de un 70 % de los pacientes tenían una edad alrededor de 30 años, 20 % eran adolescentes y 10 % corresponden a niños. La edad promedio de los casos se encontró entre los 40 y 59 años. No se ha observado predilección entre diferentes etnias, sin embargo, se ha visto que los emigrantes europeos y

asiáticos que se han establecido en zonas endémicas para PCM tienden a desarrollar la enfermedad en forma muy severa (64).

Epidemiológicamente, la PCM es más frecuente en hombres que en mujeres a pesar de tener igual exposición al hongo. Además, se ha observado que la enfermedad se desarrolla igual entre los hombres y las mujeres prepúberes y postmenopáusicas. Esto ha guiado la observación que las hormonas sexuales pueden tener un efecto sobre la progresión de la enfermedad (146).

Utilizando sistemas de microcultivo, se ha inducido la transformación de la forma micelial a la levaduriforme de aislamientos de *P. brasiliensis* en presencia de esteroides como 17- β -estradiol (E_2), dietilstilbesterol, testosterona y 17- α -estradiol y estrógeno no esterooidal en diversas concentraciones. El efecto de la inhibición es dependiente de la concentración de E_2 al igual que con el dietilstilbesterol. Con respecto a la testosterona, tamoxifen y 17- α -estradiol estos fueron inactivos. La inhibición de la transformación morfológica ocurre solo en una dirección (de micelio a levadura) y ninguno de los compuestos probados bloqueó la transformación de la levadura a micelio ni afectó el crecimiento de la levadura o la gemación. El único que bloqueó la transformación de conidia a levadura fue la E_2 . Se demuestra entonces que la inhibición del proceso de dimorfismo es un fenómeno específicamente asociado a E_2 y su esteroisómero 17- α -estradiol es inefectivo (147).

Estudios realizados en los últimos años, han permitido comprender mejor el efecto de E_2 a nivel transcripcional durante la transición dimórfica. E_2 puede bloquear o retrasar la transición morfológica por modulación en la expresión de genes de diversas categorías como la respuesta de las proteínas de choque térmico, el mantenimiento y el remodelaje de la pared celular, metabolismo energético, transporte y detoxificación, señalización celular y la función de elementos retrotransponibles (148).

En cuanto al efecto, se ha demostrado que en presencia de E_2 se mantiene la morfología de hifa a las 216 horas de incubación, contrario al grupo control que creció en ausencia de E_2 y manifestó a lo largo de todas estas horas todos los cambios necesarios para desarrollar las formas levaduriformes características de *P. brasiliensis*. Por medio de este estudio de microarreglos se ve la respuesta global de muchos genes, alrededor del 25 % del

genoma, esto permite visualizar un panorama amplio de la respuesta de *P. brasiliensis* hacia E_2 durante el proceso de dimorfismo. Este estudio por microarreglos se complementó con la evaluación de la expresión de genes por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) cuantitativa (148). Los resultados a partir de este estudio corroboran lo observado por diversos autores desde la década de los 70s, donde se describe la respuesta inducida en *P. brasiliensis* en presencia de E_2 , la cual induce la inhibición de la transición micelio a levadura multigemente (149), como se puede observar en la figura 11.

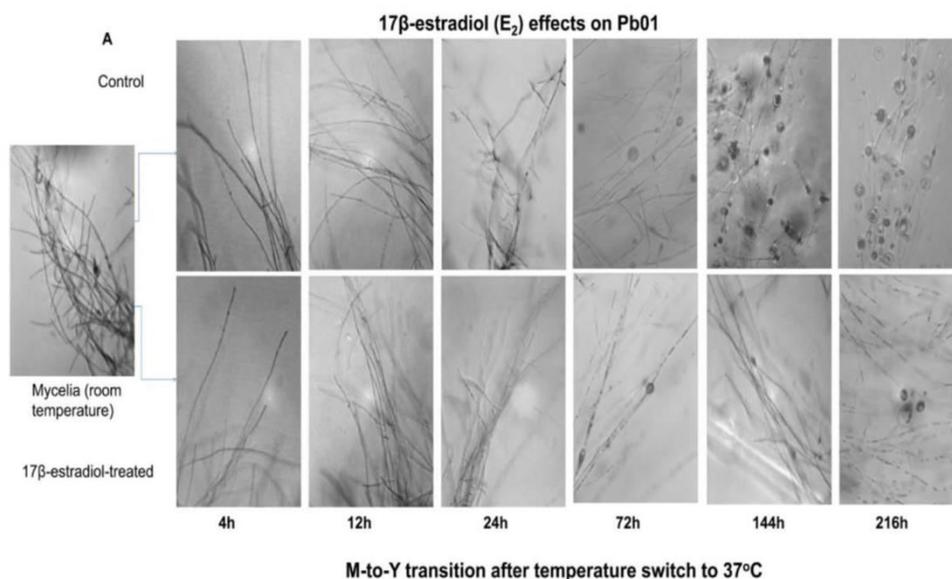


Figura 11. Inducción del dimorfismo por temperatura en *Paracoccidioides* spp. y efecto del estradiol.

Se observa la diferencia a lo largo del tiempo en el desarrollo de las formas levaduriformes en la cepa control con respecto a la cepa en presencia de E_2 . Tomado de Shankar *et al.* 2011 (148).

Los resultados de la PCR cuantitativa muestran que, por ejemplo, las proteínas de choque térmico como Hsp90 y Hsp70 tuvieron una menor respuesta ante la presencia de E_2 al iniciar el dimorfismo. El tratamiento con E_2 afecta la expresión de alrededor de 550 elementos, 331 muestran sobre-expresión y 219 muestran disminución en su expresión. Con baja expresión luego de 4 a 12 horas de exposición a E_2 se observan las proteínas de choque térmico, genes asociados al metabolismo térmico y muchos elementos retrotransponibles. La regulación de genes asociados a α -glucano sintasa disminuyeron; genes involucrados en la señalización como las GTPasas RhoA, fosfatidilinositol-4-quinasa

y serina treonina protein quinasa muestran baja expresión. Se sobreexpresaron genes asociados a la respuesta al estrés oxidativo en presencia de E₂ (148).

En cuanto a los genes involucrados en el metabolismo energético se muestran perfiles alterados en presencia de E₂. Entre los genes afectados podemos citar los asociados a la NADH deshidrogenasa, citocromo oxidasa, ATP sintasa, enzimas asociadas a la fosforilación. Importante destacar la baja expresión de la isocitrato liasa, necesaria para el ciclo de glioxilato que muestra baja expresión al inicio del tiempo en las muestras con E₂, tiempo después se muestra una mayor expresión de su ARNm; este resultado sugiere que junto la afectación morfológica de las muestras tratadas con el E₂ también hay una afectación inicial del ciclo del glioxilato (148). La activación del ciclo del glioxilato, sugiere que su activación es necesaria para la sobrevivencia dentro del macrófago. Este cambio a metabolismo fermentativo durante el proceso de infección incluye la co-activación del ciclo del glioxilato y la gluconeogénesis y la disminución en la expresión de genes asociados a la glicólisis (150).

Durante la alteración de genes en presencia de E₂, también se observa que la triosa fosfato isomerasa muestra una alta expresión (148). La expresión de esta enzima incrementa cuando el hongo toma la forma levaduriforme y es importante en la interacción hospedero-parásito al interactuar con los neumocitos a través de la unión a componentes de la matriz extracelular como laminina y fibronectina (151).

Por último, con respecto al sitio de interacción entre *P. brasiliensis* y las hormonas, se conoce que este receptor tiene una mayor afinidad por E₂ y menor afinidad por estrógenos relacionados como estrona y estriol, con una afinidad de alrededor 25 % con respecto a E₂. Sin embargo, se necesitan más estudios para comprender mejor la naturaleza del receptor de estrógenos en *P. brasiliensis*, las cascadas intracelulares que se desencadenan y los efectos de esta interacción (147).

5.4. Período de incubación

Diversos aspectos de la historia natural de la PCM no están esclarecidos aún, y se presume que los signos de esta enfermedad se presentan muchos años después de la exposición, en un promedio de alrededor de 15 a 20 años luego de este evento. El período de incubación no se conoce con certeza (152).

Se ha descrito que en personas infectadas con *Paracoccidioides* spp., el hongo puede permanecer en latencia, pero viable durante largos períodos de tiempo, esto queda demostrado por la presencia de casos diagnosticados en países de zonas no endémicas. Con la reactivación, puede ocurrir la diseminación a ganglios linfáticos, piel, mucosas, laringe, bazo, hígado, huesos, glándulas suprarrenales, sistema nervioso central y otros órganos (64).

En un reporte de casos del 2015, se describe el caso de un paciente con infección pulmonar no aparente y la primera manifestación de la forma aguda/subaguda de la enfermedad se presentó cuatro meses después de la supuesta exposición con *Paracoccidioides* spp. En otro caso documentado en el mismo reporte se describe el caso de otro paciente con síntomas respiratorios y sistémicos luego de 45 días de la exposición; se observó el compromiso a nivel de vasos linfáticos pulmonares con síntomas de leves a moderados con imágenes sugestivas de la enfermedad en las placas de rayos X; la resolución se dió de forma espontánea. Los autores de este estudio concluyen que el desarrollo de la forma aguda/subaguda de la enfermedad está sujeta a las condiciones propias del hospedero, el hongo y los factores ambientales. Luego de instaurarse en pulmón y afectar el sistema linfático pulmonar, *Paracoccidioides* spp. puede diseminar por vía hematogena-linfática causando de esta manera la forma aguda y subaguda de la enfermedad (153).

5.5. Factores predisponentes

El principal factor de riesgo para adquirir la infección es la profesión o las actividades relacionadas a las labores agrícolas o trabajo de suelos que están contaminados con el hongo. Entre las labores podemos encontrar la agricultura, la construcción con remoción de suelos, la jardinería y el manejo y transporte de productos vegetales. La

mayoría de los pacientes con la PCM han estado expuestos a este tipo de labores, principalmente la agricultura en las primeras dos décadas de su vida con aparición de los síntomas muchos años después. En los pacientes que sufren la enfermedad se ha encontrado asociación con el fumado con más de 20 cigarrillos al día por un período mayor a 20 años, así como a un consumo de alcohol de más de 50 g/día (144,154,155). La malnutrición y la inmunosupresión iatrogénica también se consideran factores predisponentes (156).

La PCM no está relacionada con enfermedades inmunosupresoras, a diferencia de otras micosis como la criptococosis, la histoplasmosis o la candidiasis. Sin embargo, si se han descrito algunos casos en pacientes con HIV, neoplasias y menos común aún con trasplantados de órganos y pacientes con inmunoterapias (14,99).

Es importante destacar que la relación de la PCM con los alelos de los genes pertenecientes al “*Major Histocompatibility Complex*” o MHC, también llamado “*Human Leukocyte Antigens*” o HLA no está esclarecida. Al menos seis estudios independientes han estudiado dicha relación (157–163) y han presentado resultados contradictorios.

Los genes *HLA* se ubican en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21), la región más variable del genoma humano, y se clasifican en tres clases (164–166): los *HLA* de clase I corresponden a tres genes clásicos (*A*, *B* y *C*), además de tres genes no clásicos y con menor distribución tisular (*E*, *F* y *G*); los genes *HLA* de clase II corresponden a cuatro genes (*DR*, *DQ*, *DM* y *DP*); y los genes de clase III que corresponden a varias categorías de moléculas inmunes implicadas en la respuesta inflamatoria y la maduración de los leucocitos, como citoquinas y factores del complemento, además de los genes que codifican por las proteínas “*Transporter associated with Antigen Processing*” o TAP, que se ubican en la región de los genes de clase II (Figura 12).

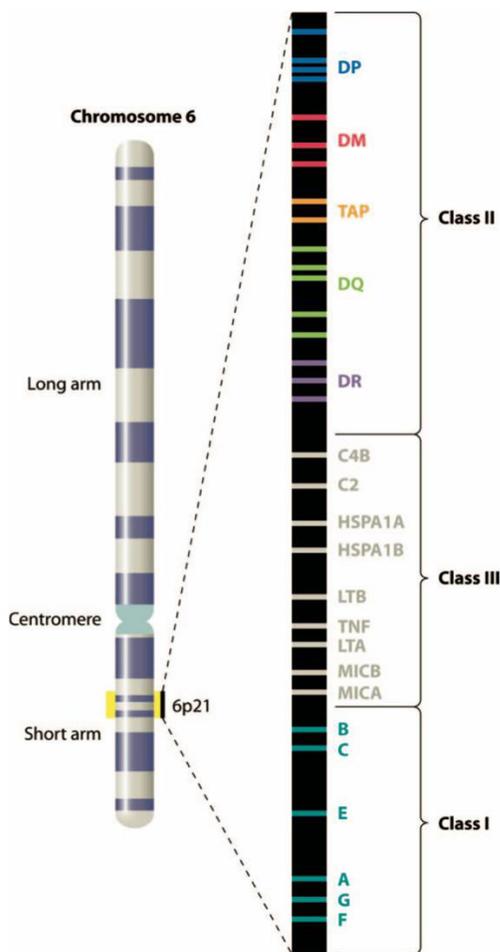


Figura 12. Diagrama de la región de los genes HLA (MHC) y sus clases en el cromosoma 6.

Se observa la distribución de los genes HLA en tres clases, así como los genes en cada una de ellas. Tomado y traducido de Blackwell *et al.* 2009 (165).

Se ha identificado más de 15 000 alelos de los genes que codifican por los antígenos HLA de clase I clásicos y los de clase II. Dicha región es la que más se ha asociado a patologías en humanos, principalmente aquellas con un componente inmunológico entre las cuales destacan las enfermedades autoinmunes (166). Adicionalmente, multitud de estudios han relacionado ciertos alelos de las clases I y II con enfermedades infecciosas entre las que se pueden citar virosis crónicas como el HIV o la hepatitis, la tuberculosis, la lepra y enfermedades parasitarias como malaria o leishmaniasis (165).

En cuanto a la relación entre la PCM y los alelos de *HLA*, algunos estudios reportan una frecuencia incrementada de ciertos alelos en la PCM, aunque suelen contradecirse entre

sí. Por ejemplo, en 1983, se reportó un incremento en la frecuencia de los alelos *HLA-A9* (que incluye los alelos *HLA-AW23* y *HLA-AW24*) y *HLA-B13* en pacientes colombianos y que en los controles la frecuencia de los antígenos *HLA-A1* y *HLA-B40* fue mayor (157). El mismo año, en Venezuela, se reportó un incremento en la frecuencia de *HLA-B12* en pacientes con PCM (158). Adicionalmente, en 1988, se describió que pacientes brasileños con PCM presentaban con mayor frecuencia el alelo *HLA-B40* con respecto al grupo control y que éste presentó una mayor frecuencia del antígeno *HLA-B12* (159). En 1991, se reportó en pacientes brasileños con PCM, un incremento en la frecuencia del antígeno *HLA-B40* y *HLA-Cw1*, además de *HLA-A2*, *HLA-B9* y *HLA-B21* (160). Finalmente, en el 2007, el alelo *HLA-DRB1*11* se detectó, por PCR, en mayor frecuencia en pacientes brasileños con PCM pulmonar que en pacientes con otras formas de PCM o controles (163).

Por otro lado, dos estudios no encontraron diferencias significativas entre las frecuencias de alelos de HLA (clases I y II) con respecto a controles. En 1996, un estudio en población brasileña no mostró diferencias significativas contra controles (161) y en el 2000, otro estudio en población brasileña con la forma crónica de la PCM no encontró diferencias significativas entre los casos y los controles, y, sorprendentemente, no detectó el antígeno *HLA-B40* entre los pacientes con PCM (162).

Es importante destacar que, en todos los estudios citados, el número de participantes fue pequeño (menos de 100 pacientes) y con grupos control la mayoría de las veces con un número mayor de participantes. Solamente en uno de los estudios brasileño se menciona que el grupo control fue seleccionado lo más similar en cuanto a factores como edad, género, ocupación, etnia, estatus socioeconómico y lugar de residencia (159). Dicho estudio contradice el estudio en Colombia, que encontraba mayor frecuencia de *HLA-B40* en pacientes con PCM (157). Adicionalmente, es importante mencionar que el método de detección y tipaje de los antígenos de HLA fueron ensayos de microcitotoxicidad y que los sueros que se emplean muestran una reactividad cruzada entre los antígenos *HLA-B40*, *HLA-B13* y *HLA-B12* (167) además de presentar incluso reactividad cruzada entre antígenos A y B, como por ejemplo entre *HLA-A2* y *HLA-B17* incluso cuando se emplean anticuerpos monoclonales (168), por lo que los hallazgos reportados para PCM podrían no ser exactos o válidos.

Finalmente, los estudios no hacen diferencia entre las especies de *Paracoccidioides* spp. ni toman en cuenta las especies crípticas, así como las diferentes presentaciones clínicas de la PCM que presentan una respuesta inmune diferente, por lo que probablemente los antígenos HLA no son los mismos según la presentación de la PCM. Para poder concluir sobre la posible relación entre los alelos de HLA y la PCM, como para cualquier otra enfermedad infecciosa, son necesarios estudios de familias y cohortes más grandes (162).

6. PATOGÉNESIS

6.1. Historia natural de la enfermedad

Una vez dentro de los tejidos, *Paracoccidioides* spp. puede ser eliminado o por el contrario puede darse la multiplicación en las células del hospedero como resultado de la inoculación en el foco primario pulmonar. El hongo puede llegar a la región de los nódulos linfáticos donde se producen lesiones satélites por diseminación linfática. Tanto la inoculación como las lesiones satélite forman lo que se conoce como el complejo primario. La diseminación hematogena del hongo puede ocurrir al mismo tiempo, con el establecimiento de focos metastásicos en diversos órganos. Durante este período no hay signos ni síntomas, así esta fase generalmente es silenciosa y pasa desapercibida. Sin embargo, durante esta fase se puede desarrollar una prueba de intradermorreacción positiva. Como anteriormente descrito, en áreas endémicas cerca de un 60 % de la población muestra la intradermorreacción positiva (169).

Otros hallazgos durante esta fase asintomática consisten en la presencia de nódulos calcificados o fibrosos en pulmón y en la zona hilar de nódulos linfáticos que se han observado en cadáveres de pacientes sin sintomatología previa asociada a la PCM. También en pacientes con enfermedades oncológicas se ha dado el hallazgo de linfangitis y adenopatías a nivel pulmonar (170).

De forma ocasional la PCM se presenta en etapas tempranas con síntomas respiratorias que cursan leve o con sintomatología no específica semejante a una gripe. En esta enfermedad el foco inicial podría evolucionar a la destrucción del hongo y la formación de tejido de cicatrización estéril, evolucionar a la persistencia de formas fúngicas viables y la formación de un granuloma, por último puede progresar y desarrollar los signos y síntomas propios de la enfermedad (153,169).

La apariencia de los signos clínicos puede desarrollarse en diferentes vías: la progresión directa de la forma primaria sin latencia, la reactivación de un foco localizado y la reinfección después de una exposición previa. Una vez establecido y dependiendo del origen de la enfermedad, la PCM podría evolucionar a las formas aguda o subaguda, así como la forma crónica (169,171).

En la forma aguda y subaguda, la enfermedad progresa rápidamente por diseminación linfática, o en combinación de la vía linfática con la vía hematógena, se puede dar la diseminación por el sistema reticuloendotelial que incluye bazo, hígado, nódulos linfáticos y médula ósea (64). Estos pacientes presentan una forma conocida anteriormente como anérgica o de polo negativo de la PCM (171).

En la forma crónica de la enfermedad, esta puede desarrollarse directamente del foco primario o reactivación de un foco luego de un período de latencia. La enfermedad tiende a progresar lentamente con lesiones que permanecen localizadas con involucración de uno o más órganos o sistemas. Debido a que el foco primario es pulmonar, la enfermedad podría permanecer localizada con una enfermedad pulmonar lenta pero progresiva. Esta puede diseminarse por medio de los vasos linfáticos pulmonares o por rutas linfohematógenas. En este último caso, otros órganos o sistemas son involucrados, incluida la piel y las mucosas. De forma menos frecuente, una forma mucocutánea progresiva primaria puede ser el resultado de una inoculación directa (1,99,144).

La enfermedad puede darse también debido a la reactivación de focos metastásicos que estuvieron en latencia en el sistema nervioso central, intestino, hueso, órganos adrenales y genitales. Por lo general, los pacientes con estas manifestaciones buscan atención médica por cuadros no asociados al sitio de infección primaria; este tipo de manifestaciones suelen ser llamadas paracoccidiomicosis de presentación clínica extrapulmonar. Existen también formas circunscritas o encapsuladas conocidas como formas pseudotumorales. El paracoccidioma pulmonar y en sistema nervioso central son ejemplo de esto (169).

La forma crónica es la forma más frecuente de la enfermedad. Se presentan principalmente en hombres adultos. Pacientes con la forma crónica de la enfermedad cursan con daño a nivel pulmonar en más del 95 % de los casos (155). Como se detallará más adelante, la forma crónica puede clasificarse en leve, moderada o severa. Sin una terapia adecuada, los pacientes pueden llegar a la muerte, a su vez, con un tratamiento adecuado puede darse la recuperación. En formas excepcionales puede darse la regresión espontánea de las lesiones (172).

Las lesiones que han sanado pueden contener focos quiescentes (hongos viables). Bajo condiciones favorables para el hongo, éste podría reactivarse, reiniciando el ciclo. El relapso puede darse, con síntomas distintos a los de la primera presentación. Considerada como una enfermedad insidiosa y de lento curso, la PCM varía en intensidad, extensión, diseminación y de variabilidad de las lesiones; esto depende de las características propias del hospedero, la virulencia de la cepa fúngica y de factores ambientales (173). La figura 13 resume la historia natural de la paracoccidioidomicosis.

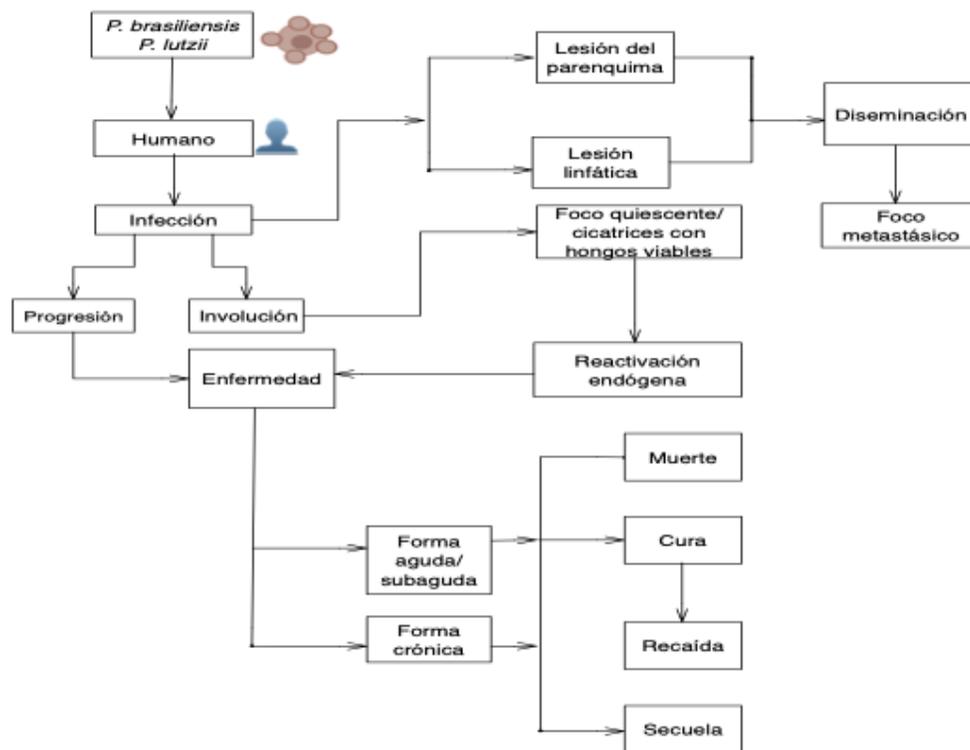


Figura 13. Flujograma de la historia natural de la PCM.

Tomado y adaptado de Franco *et al.* 1993 (169).

6.2. Factores de virulencia

Se considera como un factor de virulencia al componente del patógeno que lo habilita para adaptarse y sobrevivir dentro del hospedero, pudiéndole causar un daño dependiendo de su susceptibilidad (102,114). La virulencia es el resultado de la interacción entre el hospedero y el microorganismo. El hospedero buscará controlar de forma efectiva al patógeno, causando poco o ningún daño a sus propios tejidos y, por su parte, el hongo

tratará de evadir y adaptarse a la respuesta inmune del hospedero para lograr su sobrevivencia (113,174).

De este modo, la adherencia, la invasión a las células y su posterior colonización en distintos nichos dependerá de las condiciones del ambiente donde se da la interacción hongo-hospedero, así como de las características propias del hongo, como su composición antigénica y los mecanismos que pueda desarrollar para asegurar su replicación dentro del hospedero. En cuanto a los factores relacionados al hospedero, será vital el tipo de respuesta inmune que se desencadene durante la interacción con el hongo (102,113,141,175,176). La interacción entre el hongo, el ambiente y el hospedero, han dirigido la evolución molecular y estructural de este hongo, particularmente en lo que respecta a la virulencia (177).

A continuación, se desarrollarán los principales factores de virulencia que actúan durante la invasión de *Paracoccidioides* spp. en el hospedero, iniciando con la adhesión y la interacción con las células del hospedero, la diseminación y la modulación de la respuesta inmune por parte de *Paracoccidioides* spp.

6.2.1. Adhesión

Las moléculas de adherencia son fundamentales en la interacción entre el hospedero y el hongo (141). Se trata, generalmente, de estructuras expuestas en la superficie del hongo capaces de facilitar la adherencia a las células del hospedero o a proteínas específicas en la matriz extracelular (176). Durante esta interacción, la pared celular está en continuo contacto con el hospedero, además, se ha observado que el hongo mantiene en su citoplasma una reserva de moléculas como adhesinas y enzimas con la capacidad de adaptar su interacción con moléculas del hospedero (113,178).

El conocimiento sobre las estructuras de la superficie celular y los mecanismos relacionados a la interacción con las células del hospedero ha incrementado considerablemente en los últimos años. Esto gracias al análisis molecular y estructural de las diversas moléculas, entre las que se encuentran las adhesinas (62,107,112).

Las adhesinas son cruciales para el establecimiento de la infección y para interactuar con las células del hospedero y así lograr en primer lugar colonizar y luego diseminar a sitios lejanos al foco primario. Las adhesinas median la unión de las células

fúngicas con las del hospedero, uniéndose a elementos de la matriz extracelular como la fibronectina, laminina, colágeno tipo I y IV, fibrinógeno y plasminógeno, así como a las células epiteliales y endoteliales del pulmón (102,176,179). Diversos estudios han descrito una gran cantidad de adhesinas que también están involucradas en la formación de biopelículas, lo que evidencia la capacidad del hongo de adaptarse a las condiciones del nuevo ambiente (178,180). A continuación, se describirán las principales adhesinas encontradas en la literatura.

6.2.1.1. Gp43

La proteína Gp43 es la glicoproteína más estudiada de *P. brasiliensis*, debido a la importancia que tiene en su interacción con el hospedero en el proceso de adhesión (181). Fue la primera adhesina en ser descrita, y tiene afinidad por la laminina y la fibronectina. Esta proteína media la adhesión y la internalización del hongo en las células epiteliales y los macrófagos. Además, las cepas que no expresan Gp43 tienen menos adherencia e internalización con respecto a las cepas salvajes (181,182).

Intracelularmente Gp43 es almacenada en vacuolas y lomasomas (invaginaciones o vacuolas entre la pared y la membrana) y su secreción ocurre en un sitio específico de la pared celular. Ya en la pared celular, esta glicoproteína media la adhesión por la interacción con elementos de la matriz extracelular de las células del hospedero (114).

Gp43 tiene actividad proteínasa (endopeptidasa) a pH ácido (183). Esta glicoproteína tiene un efecto proteolítico en el colágeno, la elastina y la caseína. La digestión de las proteínas de la matriz extracelular es importante para la implantación del hongo en los tejidos (181). Además, esta interacción depende también de la acción de otras proteasas que degradan la matriz extracelular (184).

Gp43 también es importante porque inhibe la fagocitosis y la muerte intracelular del hongo, protegiéndolo, según la ruta de infección, e induciendo fuertemente la formación de granulomas en estudios *in vitro* (185). Así, la reducción de la expresión de Gp43 favorece la fagocitosis por la activación de macrófagos debido al incremento de IFN- γ y TNF- α , causando la reducción de la carga fúngica, debido al tipo de respuesta inmune inducida de tipo T_H1 (184).

Además, al evaluar *in vitro* la interacción entre Gp43 con los receptores TLR2 y TLR4 de los neutrófilos se pudo concluir que la glicoproteína promueve el escape a la respuesta inmune del hospedero al modular la liberación de IL-17 A y PGE2 de los neutrófilos a través de la interacción del TLR2 y TLR4 (186).

Adicionalmente, Gp43 está involucrada en la apoptosis de las células fagocíticas generando un estado de hiporeactividad de las células T ante *P. brasiliensis*. Por otro lado, el hongo permanece viable en el citoplasma de las células epiteliales e inicia su proceso de gemación, siendo capaz de gemar más cuando están libres dentro del citoplasma que cuando están dentro de fagolisosomas. *P. brasiliensis* puede entonces evadir la respuesta inmune, al disminuir los mecanismos de defensa del hospedero (187).

En términos generales podemos decir entonces que la Gp43 es un antígeno inmunodominante y un factor de virulencia, ya que permite al hongo evadir los mecanismos de defensa del hospedero y perpetuarse en los tejidos (188).

Finalmente, esta glicoproteína es ampliamente utilizada para el diagnóstico inmunológico de pacientes con PCM ya que el 100 % de los casos de PCM por *P. brasiliensis* son positivos para esta glicoproteína (183). Sin embargo, *P. lutzii* posee una glicoproteína ortóloga de Gp43 llamada Plp43, y que posee solo unos pocos epitopos en común con esta proteína, razón por la que Gp43 no debería utilizarse para el diagnóstico de *P. lutzii* (189).

6.2.1.2. 32 kDa hidrolasa (*PbHAD32*)

Esta adhesina se conoce como PbHAD32, es miembro de una familia de hidrolasas, y se une a laminina, fibronectina y fibrinógeno. Se ha demostrado su importancia en la adhesión inicial de las conidias a las células en los pulmones (64,102,176). Asimismo, tiene un papel importante en el dimorfismo en los cambios de levadura a micelio y viceversa (190).

6.2.1.3. Proteína de 30kD (*Proteína 14-3-3*)

La proteína 14-3-3 está localizada en el citoplasma y en la pared celular y su concentración en la pared se ve aumentada considerablemente durante la infección.

Además, podría estar involucrada en la biosíntesis del ergosterol. Ha sido descrita como una “moonlighting protein” (proteínas que evolucionaron y desarrollan más funciones que su ancestro). Esta proteína muestra afinidad para unirse a laminina, demostrando su importancia en las primeras etapas de la adherencia (102,191).

La silenciación de Pb14-3-3 altera considerablemente la morfología de las levaduras y obstaculiza el cambio morfológico sin afectar la viabilidad celular. Además, se reduce significativamente la virulencia del hongo en un modelo de infección en el invertebrado *Galleria mellonella* (192).

6.2.1.4. *Enolasa*

Es una proteína de 54 kDa que se une a laminina, fibronectina, plasminógeno y colágeno tipo I y IV (193) y tiene una actividad glicolítica ampliamente conocida. La habilidad de la enolasa para unirse al plasminógeno está mediada por mecanismos dependientes de lisina, por la degradación de la matriz extracelular y por el aumento de la invasión (194,195). Esto favorece la internalización en los tejidos del hospedero por modificación de la superficie celular al degradar la fibronectina. Por tanto, juega un rol importante en el establecimiento de la PCM (113,176). Además, su expresión permanece aumentada hasta siete días en pulmón, bazo e hígado de ratones, sugiriendo su importancia en los procesos de adhesión e invasión (102).

6.2.1.5. *Malato sintasa (MLT)*

La malato sintasa es una enzima que participa en la vía de glioxilato y en el caso de *Paracoccidioides* spp. es también necesaria en la vía de degradación de alantoína, para utilizar purinas como fuente de nitrógeno (178). Esta enzima convierte el glioxilato y el acetil-CoA en malato (196).

La malato sintasa se encuentra en la pared celular e interactúa con otras adhesinas como la enolasa y la trifosfato isomerasa, interacción que potencia la adhesión de *Paracoccidioides* spp. Se une a ciertos componentes de la matriz extracelular como colágeno tipo I y IV y la fibronectina en los neumocitos (113). Además, interactúa con proteínas de diferentes categorías como las involucradas con transporte celular, biosíntesis

de proteínas, degradación de proteínas, modificación y transducción de señales. Todo esto sugiere que la malato sintasa es importante en diversos roles, y se considera también como una “moonlighting protein” (197).

La enzima se sobre-expresa durante la transición de micelio a levadura y en células levaduriformes durante la fagocitosis por macrófagos de origen murino (198). Los anticuerpos anti-malato sintasa de *Paracoccidioides* spp. inhiben la interacción con las células epiteliales *in vitro*, lo cual sugiere que esta proteína contribuye en la adhesión entre el hongo y las células del hospedero (178).

6.2.1.6. Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)

La enzima gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es una enzima glicolítica que cataliza la conversión de gliceraldehído 3 fosfato en 1,3-bifosfoglicerato. La forma más común de la enzima es la forma NAD⁺ dependiente, típicamente ubicada en el citoplasma (199). Además de estar localizada de forma intracelular, la GAPDH también está presente en la parte más externa de la pared celular de *Paracoccidioides* spp. en la forma levaduriforme y en mayor cantidad que en el citoplasma. La presencia de esta enzima en la pared y en vesículas extracelulares durante el cambio de micelio a levadura sugiere su participación en la patogénesis (200).

Se ha demostrado la interacción de esta enzima con la laminina, la fibronectina y el colágeno tipo I. Así, esta enzima participa en las etapas iniciales de la infección fúngica ya que se ha observado una reducción en la interacción entre *Paracoccidioides* spp. y las células epiteliales al confrontar la levadura con anticuerpos policlonales anti-GAPDH, lo cual sugiere que esta proteína puede ser importante durante el proceso de infección (201). Finalmente, estudios de inducción de genes en presencia de las levaduras en hígados animales, para simular la diseminación hematogena del hongo, muestran una sobreexpresión del gen asociado a esta enzima, lo cual refuerza su potencial como parte activa del proceso de infección (202).

6.2.1.7. *Fructuosa 1,6 bifosfato aldolasa (FBA)*

La enzima fructosa 1,6 bifosfato aldolasa (FBA) cataliza la reacción reversible que divide la fructuosa 1-6 bifosfato en dos triosas fosfato, dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído 3 fosfato. Esta es una reacción común en glicólisis y gluconeogénesis (203). *Paracoccidioides* spp. contiene dos genes que codifican por la FBA. Esta duplicación supone distintas funciones para las dos enzimas ya que se ha observado una expresión diferencial de ambas enzimas (Pbfba1 y Pbfba2), lo cual indica diferencias funcionales entre ellas (204). Esto se conoce como un gen parálogo, el cual supone la adquisición de una nueva función, siempre y cuando la función esté relacionada con la función original (205). En este caso el transcripto pbfba2 se detecta solo en la forma micelial, mientras que la pbfba1 es detectada en la forma levaduriforme (204).

Además, se conoce también que la FBA en la superficie celular tiene propiedades inmunogénicas (206). En el género *Paracoccidioides* spp., ambas isoformas pueden unirse al plasminógeno humano y convertir el plasminógeno en plasmina en presencia del activador de plasminógeno tisular, el cual puede incrementar la capacidad fibrinolítica del hongo, por lo cual estaría involucrado en el proceso de adhesión (207).

6.2.1.8. *Triosa fosfato isomerasa*

Esta enzima interconvierte rápidamente la dihidroxiacetona fosfato en D-gliceraldehído 3-fosfato (206). Se ha encontrado esta enzima en vesículas extracelulares de *P. brasiliensis* (178). La expresión de esta enzima incrementa cuando el hongo toma la forma levaduriforme y es importante en la interacción hospedero-parásito al interactuar con los neumocitos a través de la unión a componentes de la matriz extracelular como laminina y fibronectina. Anticuerpos contra la triosa fosfato isomerasa de *P. brasiliensis* inhiben la adhesión a células epiteliales (151).

6.2.1.9. *Isocitrato liasa*

Durante el dimorfismo, especialmente en condiciones de estrés nutricional aumenta la transcripción de la enzima isocitrato liasa, que convierte el isocitrato en glioxilato y succinato (196). Esta enzima es importante para generar piruvato en condiciones de

glicólisis baja y cuando la beta-oxidación de ácidos grasos es la principal vía para obtener carbono. Se sugiere que participa en la vía de degradación de alantoína, la cual permite a las células obtener nitrógeno a partir de purina (64,102).

Este gen es regulado de acuerdo a las concentraciones de carbono en el ambiente, induciéndose su expresión en momentos de interacción entre el hongo y el macrófago bajo condiciones de privación de carbono (208). El transcrito de la isocitrato liasa es inducido durante la fase levaduriforme y durante la fase de transición de micelio a levadura (209). Estas son razones para considerar que la inhibición de esta enzima de acuerdo a las concentraciones de carbono puede afectar el crecimiento y la diferenciación del hongo (208).

En cuanto a la adhesión, esta enzima se une a fibronectina, colágeno tipo IV y células epiteliales. Se ha observado además que esta enzima es secretada a la superficie, reforzando su importancia en la interacción hongo-hospedero (208).

6.2.1.10. Factor de elongación mitocondrial TufM

La proteína TufM (antes conocida como EF-Tu) (114) posee funciones entre las cuales se encuentran la adhesión, invasión y modulación del sistema inmune (210). En aislamientos de *P. brasiliensis*, se expresa en la superficie del hongo y facilita la unión a fibronectina y plasminógeno participando en la interacción con las células pulmonares (211).

Se ha estudiado el efecto de la regulación negativa de PbTUFM por medio de la tecnología de ARN antisentido para silenciar el gen. Se encontraron diferencias fenotípicas, en la elongación de la traducción, defectos en la respiración celular, aumento en la reactividad a especies reactivas del oxígeno (ROS), disminución de la viabilidad después de la fagocitosis y reducción de la interacción con los neumocitos. Estos resultados han correlacionado con los observados en modelos experimentales con *Galleria mellonella* y modelos murinos, evidenciando la importancia de PbTUFM en la adhesión y la virulencia de *P. brasiliensis* y su potencial como posible blanco en el desarrollo de antifúngicos (212).

6.2.1.11. Otras moléculas asociadas a la adhesión: Aconitasa y Fosfolipasa B

La aconitasa está involucrada en la generación de energía al catalizar la isomerización de citrato a isocitrato en el ciclo de Krebs y el ciclo del glioxilato. De esta manera, facilita la formación de precursores esenciales para la biosíntesis de aminoácidos, ácidos grasos y carbohidratos (206).

Es una proteína de 80 kDa descrita en *P. brasiliensis* que se expresa principalmente en las formas levaduriformes en asociación a la pared celular, a las mitocondrias, al citosol y a los peroxisomas (213). Durante la fase levaduriforme, la expresión de la aconitasa aumenta en condiciones de altas concentraciones de hierro, lo que indica un rol importante en el metabolismo de este metal y en la defensa contra el estrés oxidativo (214).

Finalmente, la fosfolipasa B es una enzima involucrada en la interacción temprana con el macrófago, que es crucial durante la invasión, y se sugiere que modula la respuesta inmune. Fue descrita al detectarse la actividad proteínasa y fosfolipasa de cepas de *P. brasiliensis* en medios de cultivo suplementados con albúmina y yema de huevo como sustratos para la evaluación de producción de enzimas (215).

El rol de la fosfolipasa B se determinó al enfrentar levaduras de *P. brasiliensis* a macrófagos alveolares en presencia de inhibidores de la enzima y de surfactantes. En presencia de inhibidores de la fosfolipasa, se observó una inhibición de la adhesión e internalización de las levaduras en los macrófagos y una regulación negativa de genes involucrados en la fagocitosis (por ejemplo, *TLR2* y *CD14*), así como una disminución en la respuesta inflamatoria. En contraste, en presencia de surfactante pulmonar, aumentó la actividad de la fosfolipasa y la internalización del hongo. El surfactante pulmonar no altera la producción de citoquinas, mientras que el inhibidor de la fosfolipasa disminuyó los niveles de IL-10 e incrementó los niveles de IL-12 y TNF- α . Por ende, la actividad de esta enzima está involucrada en el proceso de adhesión e internalización de levaduras dentro de los macrófagos y puede disminuir la activación de macrófagos al favorecer una respuesta de tipo T_H2 (216).

En la figura 14, se resume esquemáticamente las adhesinas descritas en *Paracoccidioides* spp. y sus ligandos.

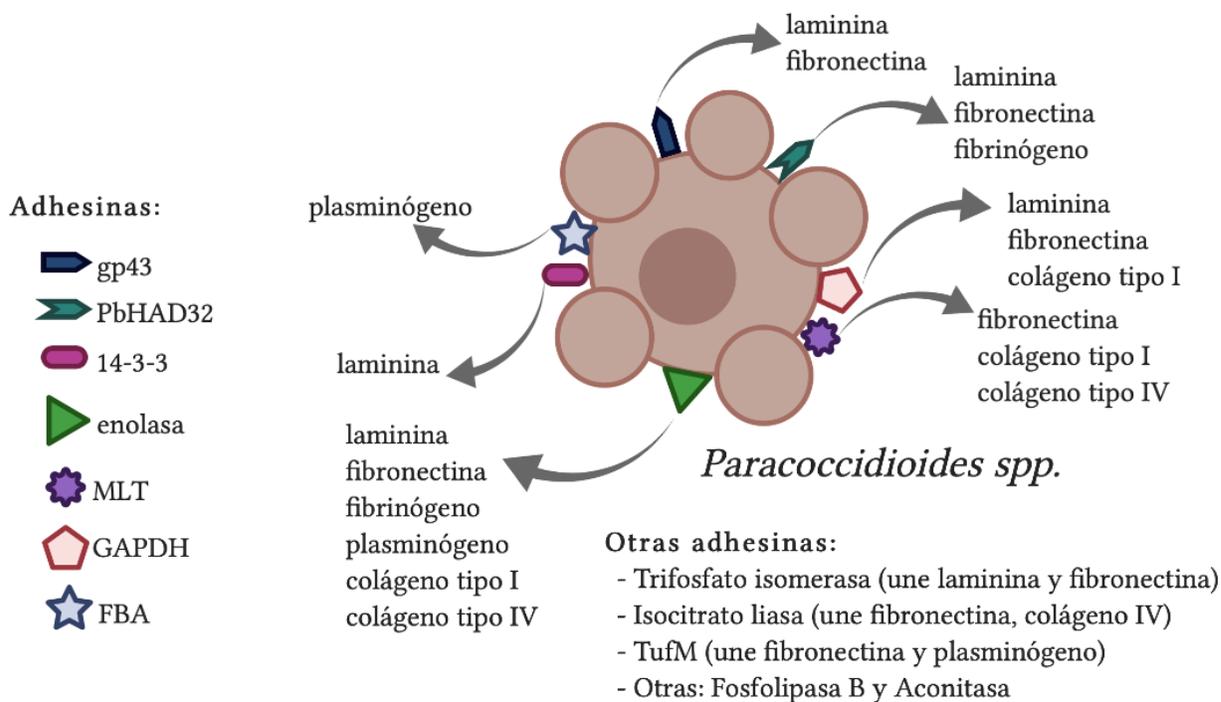


Figura 14. Representación esquemática de la afinidad de las adhesinas de *Paracoccidioides spp.*

Ver texto para los acrónimos y mayores detalles. Elaboración propia según las referencias citadas en el texto.

6.2.2. Dimorfismo: cambios a nivel de la pared celular

Durante la fase micelial, *Paracoccidioides spp.* tiene en su pared el β -1,3-glucano como polímero principal. La levadura multigemante reduce este polisacárido al mínimo y lo sustituye por α -1,3-glucanos y quitina en mayor proporción, con cierta variación entre los diferentes aislamientos de *Paracoccidioides spp.* (64,102,113,179,217).

Diversos estudios han relacionado la expresión de la α -(1-4) amilasa con la síntesis de α -1,3-glucanos. Al silenciar la PbAMY1 con una reducción de hasta 60 % en el α -1,3-glucano (218). La exposición de estos α -glucanos en la capa más externa de la pared podría ser una ventaja evolutiva, obstaculizando el reconocimiento de las células levaduriformes por las células fagocíticas, actuando de esta manera como defensa contra la respuesta del hospedero (219).

Este cambio en los componentes de la pared ha sido relacionado con patogenicidad y la pérdida de α -glucanos correlaciona con la disminución de la virulencia. Adicionalmente, el recambio en la pared celular dificulta el reconocimiento por las células fagocíticas ya que los PRR (receptores de reconocimiento de patrones) reconocen las β -1,3-

glucanas, desencadenando la fagocitosis, el estallido respiratorio, y la liberación de citoquinas como TNF- α , IL-12 y otras interleuquinas (102).

6.2.3. Mecanismos de defensa contra el estrés ambiental

Luego de su cambio dimórfico y de la adhesión a los tejidos del hospedero, *Paracoccidioides* spp. requiere adaptarse y soportar el estrés ambiental para permanecer viable en ese ambiente y lograr diseminarse a otros sitios para que se dé la progresión de la enfermedad en el hospedero. A continuación, se detallarán los factores de virulencia que le permiten a este hongo la sobrevivencia y el crecimiento en los tejidos del hospedador.

6.2.3.1 Melanina

Los pigmentos de melanina están presentes en diversos reinos, y están asociados con múltiples funciones debido a sus propiedades fisicoquímicas. La melanina, pese a no poseer una estructura del todo conocida, tiene compuestos indólicos y/o fenólicos, está cargada negativamente, posee naturaleza hidrofóbica y un alto peso molecular (102). En el reino Fungi, especialmente en lo referente a patogénesis, se ha establecido la importancia de la melanina en la virulencia (220).

P. brasiliensis produce conidias melanizadas después del crecimiento micelial en medios de cultivo pobres, se producen levaduras melanizadas en medio mínimo suplementado con L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), adicionalmente, se ha demostrado la melanización *in vivo* en modelos animales (221). Por su lado, durante la PCM se ha demostrado la presencia de melanina mediante pruebas inmunológicas en muestras de suero de pacientes (222).

Mediante microscopía electrónica se logró observar que la melanina en *Paracoccidioides* spp. está distribuida en gránulos electrodensos distribuidos en la superficie celular de las levaduras y en el citoplasma. La síntesis de melanina está mediada por la enzima lacasa, la cual está contenida en vesículas conocidas como melanosomas (223) que pueden interactuar con componentes de la pared como quitina para facilitar la deposición de melanina dentro de la pared celular (179).

Los estudios iniciales, en lo referente a melanina y su capacidad de proteger a las células levaduriformes de *P. brasiliensis* del sistema inmune del paciente, muestran que las mananas pueden parcialmente inhibir la fagocitosis y que las células melanizadas fueron más resistentes con respecto a las no melanizadas a la acción fungicida y fungistática de los macrófagos (224). Además, se observa un incremento en la opsonización de las levaduras cuando se adicionó complemento y/o anticuerpos antimelanina (225).

Análisis *in vitro* han demostrado que las células melanizadas son menos susceptibles al óxido nítrico, los derivados oxidantes del oxígeno (ROS), hipoclorito de sodio y peróxido de hidrógeno con respecto a las células no melanizadas. Estos estudios correlacionan con la infección en modelos murinos, los cuales muestran un incremento en el crecimiento fúngico de las levaduras melanizadas con respecto a las no melanizadas, atribuible a la reducción de la internalización por células fagocíticas y el aumento de la resistencia ante la muerte celular. Por lo tanto la melanina promueve la virulencia del hongo por inhibición de la fagocitosis y neutralización de los agentes oxidantes generados por las células inmunes (102).

Por otro lado, la resistencia a la inhibición fotodinámica y a diferentes antifúngicos sobre aislamientos de *Paracoccidioides* spp. melanizados se puede atribuir a los niveles bajos de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ROS Y RNS) (226). Además, los datos de concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) muestran que las levaduras melanizadas son menos susceptibles principalmente a la anfotericina y al itraconazol. Esto puede ser atribuido a la reducción en la permeabilidad de la pared, que la melanina neutraliza los radicales libres liberados por las membranas dañadas o a una interacción con la droga (102,224–226).

6.2.3.2 Vesículas extracelulares

Las vesículas extracelulares son semejantes a los exosomas observados en mamíferos. Este compartimento extracelular está compuesto de una bicapa lipídica que tiene el potencial de regular la patogenicidad durante la infección fúngica. Sin embargo, poco se conoce sobre estas vesículas, salvo que cruzan la pared celular y pueden transportar moléculas que son muy importantes en la adquisición de nutrientes, defensa celular y en la modulación de la respuesta inmune. Sin embargo, actualmente no se conoce cómo logran

atravesar la pared celular y alcanzar el espacio extracelular y cómo logran modular la respuesta inmune (227). Análisis realizados en hongos como *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Sporothrix schenckii* sugieren que podrían tener estas vesículas y algunos autores las denominan “bolsas de virulencia” (223).

En el caso específico de *Paracoccidioides* spp., las vesículas están cargadas de componentes antigénicos como α -galactopiranosil (228). El análisis comparativo de las vesículas extracelulares de *Paracoccidioides* spp. con vesículas de otros hongos como *C. neoformans* y *H. capsulatum* encuentra una alta similitud con estas (229).

Algunas de las proteínas contenidas en las vesículas extracelulares podrían tener un rol claro durante la infección, algunas de ellas son la superóxido dismutasa, peroxiredoxina mitocondrial y tioredoxina, enzimas relacionadas con la homeostasis de las especies reactivas de oxígeno y la promoción de la viabilidad fúngica intracelular. Interesantemente la composición de estas vesículas está fuertemente afectada por las condiciones de crecimiento, sugiriendo su adaptación y sobrevivencia en condiciones ambientales con funciones muy diversas de señalización celular y respuesta al estrés (229,230).

Finalmente, la superficie de las vesículas de *Paracoccidioides* spp. pueden ser reconocidas por el sistema inmune, luego de la incubación por 48 horas de las vesículas con macrófagos peritoneales murinos se indujo la liberación de mediadores proinflamatorios como NO, IL-12, IL-6, TNF- α e IL-1 β (231).

6.2.3.3. Defensa contra el estrés oxidativo

El estallido oxidativo de los macrófagos está caracterizado por el incremento en la captura de oxígeno y la producción de ROS que permiten la liberación de enzimas hidrolíticas y metabolitos tóxicos. El fagolisosoma es el sitio dentro del macrófago donde se busca eliminar al hongo. Los macrófagos tienen actividad fungicida ejercida por medio de moléculas como el óxido nítrico, que es producido cuando se da la activación del macrófago por IFN- γ (232,233).

Paracoccidioides spp. inicia un cambio metabólico para tolerar el ambiente dentro del macrófago al activar la vía de las pentosas fosfato que permite una mayor producción de NADPH que proporciona un mecanismo de defensa contra los grupos sulfhidrilo y los ROS del hospedero al mantener el glutatión en un estado reducido (64,102). Además, en

respuesta al peróxido de hidrógeno, *Paracoccidioides* spp. induce la activación de enzimas antioxidantes como catalasas, citocromo C peroxidasa, tiorrexina y superóxido dismutasa. De esta manera, se mantiene la fuente de electrones para el sistema glutatión peroxidasa y así mantener el potencial redox (214). Estos datos correlacionan con la regulación positiva de genes que codifican para las enzima catalasa peroxisomal y la superóxido dismutasa de manganeso en células levaduriformes que infectan macrófagos en medios con disminución de glucosa y aminoácidos (234).

6.2.4. Invasión y diseminación

Para muchos microorganismos patógenos, la invasión a las células del hospedero es un paso crítico para el mantenimiento de la infección (95). Al avanzar la infección a través del tracto respiratorio, *Paracoccidioides* spp. deberá cruzar los tejidos para lograr permanecer en el hospedero. En ese sentido, las células epiteliales del pulmón son importantes como posibles reservorios de hongos patógenos como *Paracoccidioides* spp. al protegerlas de la fagocitosis (95,141,187,235).

El proceso de invasión a las células involucra una serie de cambios, tanto en el citoesqueleto de la célula fúngica, como en la del hospedero (236). Así, la internalización del hongo es un paso fundamental para el desarrollo y la cronicidad de la enfermedad, máxime cuando este hongo no es intracelular (140). Adicionalmente, la migración de las levaduras por las células endoteliales es necesaria para la multiplicación en múltiples órganos y lograr la diseminación desde el pulmón. Debido a que es difícil la observación de la adhesión de *P. brasiliensis* a la monocapa del sistema endotelial *in vitro*, se ha postulado que la migración del hongo se da a través de la capa endotelial de manera muy rápida (141). De esta manera *Paracoccidioides* spp. podría cruzar el endotelio con rapidez, y probablemente pueda invadir tejido subcutáneo, la diseminación hematógena constituyendo entonces la primera etapa en el desarrollo de innumerables nuevos sitios de infección (141). A continuación, se describirán modificaciones en las células hospederas inducidas por *Paracoccidioides* spp., la transducción de señales y la formación de biopelículas por este hongo, fenómenos involucrados en la invasión de los tejidos y la diseminación del patógeno.

6.2.4.1. Rearreglo del citoesqueleto de las células no fagocíticas

Muchos organismos patógenos pueden invadir las células del hospedero y posteriormente usar ese ambiente para multiplicarse, para atravesar tejidos y causar enfermedad invasiva o poder escapar de la respuesta inmune. Las células fagocíticas y las no fagocíticas como las células epiteliales y las endoteliales pueden ser invadidas por *Paracoccidioides* spp. La invasión celular ocurre porque el microorganismo induce ser endocitado por las células, promoviendo señales intracelulares específicas en las células del hospedero, induciendo rearrreglos del citoesqueleto en el punto de contacto (141).

Se ha demostrado que *P. brasiliensis* induce una modificación de la estructura del citoesqueleto de las células del hospedero y que esto interfiere con la tubulina, actina y componentes de la citoqueratina (182). *P. brasiliensis* expresa al menos dos mecanismos diferentes de invasión, uno dependiente de microfilamentos y otro dependiente de los microtúbulos. La expresión de una u otra vía podría depender de la presencia de receptores de membrana específicos y esto ocurriría bajo condiciones específicas. Sin embargo, los mecanismos y los receptores aún no se conocen (141).

Paracoccidioides spp. induce la producción de pseudópodos en las células epiteliales, por movimientos de actina en la superficie celular, promoviendo su endocitosis. La formación de estos pseudópodos viene acompañada por la acumulación de microfilamentos de las células epiteliales en el citoplasma y alrededor del hongo. Este mecanismo no es utilizado por todos los microorganismos, por lo cual se considera un factor de virulencia de *P. brasiliensis* (95,182).

Por otro lado, el rompimiento de la citoqueratina por *P. brasiliensis* puede involucrar enzimas específicas como por ejemplo la proteína Gp43 (188), causando pérdida de la estructura de los filamentos. Esta degradación de citoqueratina puede explicarse por el proceso de invasión *in vitro* y la capacidad de *Paracoccidioides* spp. de cruzar las barreras epiteliales (187).

La sobrevivencia de *P. brasiliensis* en el ambiente intracelular puede ser un mecanismo protector contra los componentes involucrados en la respuesta inmune y en la actividad de los antifúngicos. Por otro lado, los organismos patógenos pueden aumentar su habilidad para persistir en el hospedero al causar la muerte de las células inmunes (141).

6.2.4.2. *Modulación de la apoptosis de células del hospedero*

Las células no fagocíticas carecen de una maquinaria microbicida como la de las células fagocíticas profesionales. La muerte de estas células infectadas por *P. brasiliensis* puede proveer una ruta de diseminación a largas distancias dentro del organismo. Otra hipótesis es que la internalización de las levaduras en las células apoptóticas permite la entrada dentro de los macrófagos sin estimular la actividad microbicida (141). En ese sentido, *P. brasiliensis* induce la apoptosis de las células epiteliales y permanece viable dentro de las células y con capacidad de multiplicarse. Así, la inducción de la apoptosis podría explicar la eficiente diseminación tisular y por vía hematogena de *P. brasiliensis* (182).

Por otro lado, *Paracoccidioides* spp. puede inducir la apoptosis en macrófagos, mecanismo conservado entre varios patógenos. Dicha apoptosis puede eliminar los fagocitos en los tejidos disminuyendo su acción sobre el hongo. Además, puede estimular la respuesta inflamatoria y ser beneficioso para el hongo al facilitar la invasión de tejidos como consecuencia del daño causado por esta inflamación (237, 238). En cultivos de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con PCM estimulados con Gp43 se encontraron niveles altos de IL-10. La adición de un anticuerpo anti-IL-10 aumenta el nivel de apoptosis en células, sugiriendo un rol antiapoptótico de la IL-10 (239).

En resumen, se considera que la invasión de células del hospedero tanto las fagocíticas y no fagocíticas puede tener consecuencias en cuanto a la invasión de tejidos y la diseminación a sitios extrapulmonares (182).

6.2.4.3. *Modulación de la transducción de señales en las levaduras*

Los hongos patógenos han desarrollado una diversidad de estrategias para interactuar con las células del hospedero y manipular su comportamiento, para así sobrevivir y propagarse. Durante este proceso, un gran número de vías de señalización fúngicas son activadas. Utilizando estudios *in silico* se han descrito varias rutas de señalización (240):

1. **Señalización de protein quinasas** activadores de mitógenos, con consecuencias en la integridad celular, construcción de la pared, osmorregulación y reproducción;
2. **Sistema AMPc** que regula el desarrollo del hongo y su virulencia;
3. **Proteínas Ras** que permiten la interacción entre diversas cascadas;
4. **Sistema calcio-calmodulina-calcineurina** controla la viabilidad celular bajo el estrés oxidativo, temperaturas altas y la integridad de membranas y pared celular;
5. **Vía de la rapamicina** controla el crecimiento celular y la proliferación.

Estas vías de señalización son generalmente pleiotrópicas, pues poseen diversidad de efectos a nivel intracelular, sobre el citoesqueleto, factores de transcripción y regulación nuclear que a su vez pueden tener efecto sobre la expresión de otros genes. Estas vías de señalización se consideran que pueden ser expresadas tanto en la forma micelial como en la forma levaduriforme (241–243). En la mayoría de los casos, falta dilucidar cada paso en la interacción del hongo con las células del hospedero y esclarecer la importancia de cada una de estas vías en la virulencia y adaptación del hongo a la vida parasitaria y los procesos de invasión y diseminación (141).

6.2.4.4. *Formación de biopelículas*

Durante el último estado del proceso de infección, la habilidad para establecerse en nichos distantes por medio de la formación de biopelículas representa un factor de virulencia crítico (64,102). *P. brasiliensis* puede colonizar superficies y formar biopelículas en su forma levaduriforme. La biopelícula fúngica consiste en una red densa de células levaduriformes caracterizadas por la expresión de genes que codifican adhesinas como la Gp43 y la GAPDH, así como enzimas hidrolíticas, necesarias para la adhesión, la invasión y la destrucción de tejidos (113,180).

La formación de biopelículas por el hongo puede ser un factor crítico en la persistencia de la infección fúngica, ya que puede dificultar la acción de los antifúngicos y contribuir al estado crónico de la enfermedad. Por otro lado, la Gp43 presente en la

biopelícula puede inhibir la capacidad fagocítica y fungicida de los macrófagos, mediante la unión a los receptores de manosa e induciendo la producción de IL-18 (244,245).

6.2.4.5. Otros mecanismos de perpetuación del hongo

Otros mecanismos de permanencia del hongo en el hospedero corresponden a enzimas particulares de *Paracoccidioides* spp. y la atrofia del timo por este patógeno fúngico. En primer lugar, se ha descrito una serina tiol proteinasa extracelular (PbST) involucrada en la degradación de componentes de la membrana basal en estudios *in vitro*, incluyendo la laminina, fibronectina, colágeno tipo IV y proteoglicanos, sugiriendo su rol en la invasión fúngica a los tejidos y la diseminación (102).

Otra estrategia de evasión del sistema inmune se realiza alterando el repertorio de células T. La diferenciación y maduración de las células T se produce en el timo, por lo que la integridad del microambiente tímico es crucial para el desarrollo y la maduración de los timocitos (246). Datos experimentales en modelo murino de PCM aguda muestran que la infección con células levaduriformes promueve la atrofia del timo y la consecuente desorganización de las células epiteliales y el aumento de la expresión génica de mediadores inflamatorios. Esto disminuye la diferenciación de las células T específicas de patógenos conduciendo a la inmunosupresión del hospedero, lo que permite que *Paracoccidioides* spp. pueda multiplicarse dentro del microambiente del timo (246,247).

En la figura 15 se resumen algunos de las estrategias de adaptación y de defensa al estrés ambiental de *Paracoccidioides* spp.

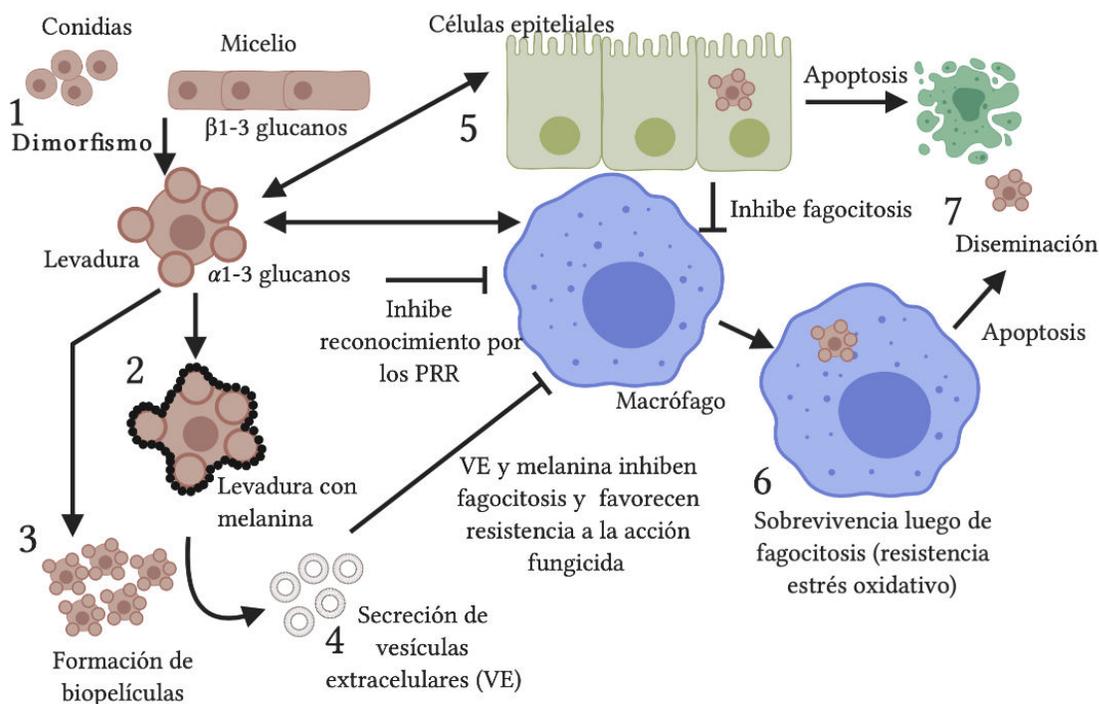


Figura 15. Adaptación, defensa contra el estrés ambiental y diseminación de *Paracoccidioides* spp.

Algunos de los mecanismos de adaptación y de defensa ante el ambiente hostil en el hospedero son: **1.** El dimorfismo al cambiar la composición de su pared y cambiar morfológicamente; **2.** La síntesis de gránulos de melanina; **3.** La formación de biopelículas; y **4.** La secreción de vesículas extracelulares. Por otro lado, cuando el hongo es endocitado (**5**) es capaz de sobrevivir y de inducir la apoptosis de la célula hospedera; en caso de ser fagocitado (**6**) puede sobrevivir resistiendo a las condiciones adversas. En ambos casos, la capacidad de multiplicarse le permite su posterior diseminación sistémica (**7**). Ver detalles en el texto. Elaboración propia según las referencias citadas en el texto.

Los factores de virulencia del hongo dimórfico *Paracoccidioides* spp. pueden dividirse en diferentes categorías, varias veces entremezcladas, y que se dividen en factores que ayudan a: **i.** la adhesión (glicoproteínas y enzimas de pared); **ii.** al crecimiento en el hospedero (dimorfismo y crecimiento a 37 °C, obtención de nutrientes...); **iii.** la resistencia al estrés y detoxificación (melanina...); **iv.** la invasión y la diseminación (formación de biopelículas...); y **v.** la evasión de la respuesta inmune (113).

En el cuadro 1, se resume la información más relevante sobre los factores de virulencia descritos en este patógeno fúngico.

Cuadro 1. Moléculas involucradas en la virulencia de *Paracoccidioides* spp.

Moléculas	Función	Referencias
Hsp90	Une y estabiliza la calcineurina controlando la diferenciación celular. Promueve la adaptación ante el daño por cambios de temperatura.	(102)
Rho GTPasa	Coordinación del crecimiento celular y Morfogénesis de las células levaduriformes. Promueve la evasión de la respuesta inmune.	(241,242)
SCONC	Regula negativamente la vía de asimilación de sulfuro inorgánico.	(62,111)
Gp43	Une a laminina y fibronectina. Inhibe la fagocitosis y la muerte celular. Actividad proteínasa. induce producción IL-18. Altera la estructura del citoesqueleto. Modula la apoptosis.	(181,182)
Fosfolipasa B	Actividad proteínasa y fosfolipasa. Activa macrófagos, modula la respuesta inmune,	(215)
Enolasa	Une laminina, fibronectina, plasminógeno, colágeno I y IV. Degrada matriz extracelular.	(193)
32 kDa hidrolasa	Une laminina, fibronectina y fibrinógeno. Induce apoptosis.	(182,217)
30kDa o proteína 14-3-3	Biosíntesis de ergosterol. Adhesión a laminina. Importancia dimorfismo. Modulación apoptosis.	(192)
Triosa fosfato isomerasa (TPI)	Mantiene glicólisis. Une a laminina y fibronectina de neumocitos. Interactúa con las células epiteliales.	(151)
Malato sintasa	Modula vía glioxilato y alantoína. Interactúa con la enolasa y TPI para potenciar adhesión. Une colágeno I y IV y fibronectina.	(113)
Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa	Glicólisis. En vesículas extracelulares. Une laminina, fibronectina, colágeno tipo I.	(201)
Fructosa 1,6 bifosfato aldolasa	Glicólisis y gluconeogénesis. Dos variantes con diferenciación en expresión Micelio-levadura. Se une a plasminógeno	(204)
Isocitrato liasa	Mantiene el ciclo de Krebs Mantiene ciclo de alantoína (para obtener nitrógeno). Une fibronectina, colágeno tipo I y IV y células epiteliales. Se expresa en las levaduras y en la transición del dimorfismo.	(208)
Aconitasa	Ciclo de glioxilato Metabolismo hierro. Biosíntesis de aminoácidos.	(206)
Ef-Tu	Une fibronectina y plasminógeno. En su ausencia disminuye la sobrevivencia y hay defectos respiración con aumento de ROS:	(212)
Citocromo C oxidasa	Evita el daño causado por el estrés oxidativo y las especies del NO. Promueve sobrevivencia dentro del macrófago. Potencial factor de virulencia.	(110)
Superóxido dismutasa (SOD)	SOD citosólica: previene ante ROS endógeno. SOD extracitosólica: combate radicales libres producidos por la interacción con el hospedero. Potencial factor de virulencia.	(229)
Catalasas	Homeostasis ante ROS endógenos (catalasa A y B)	(214)

Moléculas	Función	Referencias
	se activa principalmente en la presencia de ROS exógeno y muy importante como factor de virulencia.	

Elaboración propia, adaptado de las referencias citadas en el cuadro.

En resumen podemos decir que la virulencia es considerada un atributo de un microorganismo patógeno que está fuertemente asociado a la susceptibilidad del hospedero. En el caso de *Paracoccidioides* spp., los factores de virulencia le permitirán al hongo lograr su sobrevivencia en cada paso del proceso de invasión, desde la instauración en el sitio primario de infección hasta la diseminación a otros órganos y su persistencia en el nuevo nicho. El hongo necesita moléculas como enzimas, pigmentos y estructuras como vesículas, así como también la formación de biopelículas para lograr resistir el ambiente nuevo dentro del hospedero. La modulación de los factores de virulencia está mediada por la regulación negativa y positiva de cascadas de señalización y la expresión de genes que favorezcan su sobrevivencia. Esta expresión está modulada por el ambiente en el cual se encuentra el hongo, sea este el medio saprobio o el parasítico y de su forma estructural, sea esta micelial o levaduriforme (102).

Sumado a esto *Paracoccidioides* spp. debe desarrollar estrategias que le permitan evadir la respuesta inmune del hospedero. Del tipo de respuesta celular y de citoquinas que predominen durante la exposición al hongo patógeno, dependerá la manifestación clínica de la PCM (108). En los últimos años, el uso de técnicas moleculares ha permitido comprender mejor la interacción que existe entre las células fúngicas y las del hospedero. En la actualidad se conoce que esta relación es compleja y dinámica y que dependerá tanto de los factores propios del hospedero como de los factores de virulencia expresados por *Paracoccidioides* spp. Se espera que este conocimiento permita a futuro el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento de esta enfermedad que es endémica de América Latina y manifestada principalmente entre personas en condición de vulnerabilidad (176).

7. RESPUESTA INMUNE

El conocimiento de la respuesta inmune desarrollada durante la PCM se ha ampliado en los últimos años, con lo cual se conocen con mayor profundidad los mecanismos involucrados en la respuesta inmune, sea esta innata o adaptativa (248,249).

La mayoría de los individuos infectados viven en áreas endémicas, pero no desarrollan la enfermedad. Estos individuos desarrollan el tipo de respuesta de linfocitos T colaboradores T_H1 , que resulta en la formación del granuloma y el control de la replicación con formas fúngicas en estado de latencia. Por el contrario, individuos que desarrollan la enfermedad generalmente tienen deficiencia en la respuesta T_H1 (250). Se ha observado que los pacientes que presentan las formas agresivas de PCM (forma juvenil) desarrollan una respuesta mixta de tipo T_H2/T_H9 , que no forma los granulomas y que activa la formación de linfocitos B y en consecuencia la respuesta humoral con hipergamaglobulinemia con predominio de IgE y eosinofilia; mientras que en pacientes con la forma crónica de PCM predomina la respuesta T_H17/T_H22 con una respuesta T_H1 deficiente que no permite la resolución de la infección pese a una inflamación rica en neutrófilos (249). En los pacientes con formas crónicas y severas de PCM, la respuesta T reguladora suprime la inmunidad mediada por las células T produciendo anergia de estas células (175,251).

7.1. Respuesta inmune innata

El primer lugar de contacto entre el sistema inmune y los patógenos fúngicos corresponde a las barreras físicas del organismo. Dichas barreras son los epitelios de la piel y las mucosas de la boca, las vías respiratorias, el tracto gastrointestinal y el tracto genitourinario (252).

La respuesta inmune innata está basada en la respuesta mediada por elementos preexistentes que modulan la interacción con microorganismos para lograr así destruirlos o inhibir su crecimiento. Este tipo de respuesta no genera memoria, y está mediada por barreras físicas, elementos químicos y diferentes células del sistema inmune (253).

Los mecanismos de la respuesta innata tienen diferencias dependiendo del sitio en el que se desarrolle su acción. En el caso del hongo patógeno primario *Paracoccidioides* spp. la infección primaria ocurre en el pulmón. Gran parte del conocimiento que se tiene sobre cómo se desarrolla la respuesta inmune ante *Paracoccidioides* spp. se ha desarrollado a partir de modelos murinos, esto debido a que en los seres humanos la PCM es diagnosticada en etapas tardías de la enfermedad, lo que ha dificultado la comprensión de los eventos iniciales de la enfermedad (253).

La respuesta en pulmones será, en primera instancia, la secreción de gran cantidad de proteínas antimicrobianas por las células epiteliales pulmonares, acompañados de la acción fagocítica de los macrófagos alveolares que habitan el pulmón (187,253,254). Entre las proteínas antimicrobianas podemos citar la lisozima que degrada la pared celular, la proteína quelante de hierro, la lactoferrina; las defensinas, las catelicidinas y las proteínas de la familia de las pentraxinas que permeabilizan la membrana y son secretadas en la capa de revestimiento alveolar del epitelio pulmonar (255).

Como toda respuesta innata, la respuesta ante el hongo *Paracoccidioides* spp. comprende componentes celulares y humorales. Para facilitar su estudio, se empleará esta división clásica, sin embargo, es importante tomar en cuenta que ambas se interrelacionan y se presentan al mismo tiempo.

7.1.1. Respuesta innata celular

Diversas células están involucradas en la defensa contra patógenos fúngicos, entre estas podemos citar a los macrófagos, neutrófilos, células NK, células dendríticas (DCs) y linfocitos T. Los macrófagos, neutrófilos y células dendríticas son conocidas por su capacidad fagocítica y participar en la respuesta innata, así como establecer el enlace con la respuesta inmune adaptativa. Su actividad es fundamental para evitar el crecimiento de patógenos, al estar estimulados por citoquinas, su actividad aumenta y de esta manera contribuyen a controlar la multiplicación fúngica (112).

La actividad de las células fagocíticas está mediada por las especies reactivas del oxígeno (ROS) y del óxido nítrico (RNS), estas moléculas se encargan además de disminuir

los nutrientes necesarios para que el hongo pueda cumplir con sus funciones metabólicas y crecimiento (110).

7.1.1.1. Receptores PRRs

En la iniciación de la respuesta inmune, el reconocimiento de patrones o componentes específicos de los hongos es crítico, estos se conocen como patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs y son reconocidos por los receptores reconocedores de patrones o PRRs. Dentro de estos PRRs se encuentran los Toll-like receptors (TLRs), los receptores de lectina tipo C (CLRs), los NOD-like receptors, los receptores tipo RIG, los receptores de manosa (MR) y los receptores de complemento (256).

La interacción entre los PAMPs y los PRRs es importante para la síntesis de citoquinas proinflamatorias, producción de ROS y activación de fagocitosis. Sin embargo, los receptores de dectina 1, MR, TLR-2 y TLR-4 controlan la proliferación de linfocitos durante la infección con *P. brasiliensis*, lo que podría tener un efecto negativo con mayor daño tisular y daño proinflamatorio (112,257).

Dentro de los PRRs, los TLR2 y TLR4 y el receptor de dectina 1 tienen un rol fundamental en detectar los PAMPs de la pared celular fúngica. Así, con los PRRs, células como los macrófagos, células dendríticas y neutrófilos pueden reconocer a los hongos. Luego de este reconocimiento inicia la respuesta contra el hongo patógeno por medio de la fagocitosis y la liberación de componentes antimicrobianos como los radicales libres y la producción de citoquinas. Las citoquinas producidas serán el enlace entre las respuestas innata y adaptativa, al inducir la maduración de los linfocitos CD4⁺ y la formación de subgrupos específicos de linfocitos cooperadores, sean estos T_{H1}, T_{H2}, T_{H17} o T_{Reg} (258).

Los TLR están involucrados en la resistencia de células del hospedero ante patógenos como *Candida* spp., *Aspergillus fumigatus*, y *Cryptococcus neoformans*. Con la activación temprana de estos receptores se dará la producción de mediadores pro y anti inflamatorios; del balance de esta producción dependerá la respuesta innata que se desencadene (255). En términos generales, el receptor TLR4 es el receptor clave para el

reconocimiento de lipopolisacáridos, mientras que TLR2 está involucrado en la interacción con peptidoglicanos bacterianos y lipoproteínas (257,259).

Sin embargo, se ha observado que en el caso de *P. brasiliensis* hay susceptibilidad a la infección cuando se confrontan a ratones deficientes de TLR4 a este hongo con respecto a los ratones con expresión normal de este receptor. Estudios *in vitro* han demostrado que este receptor interactúa con *P. brasiliensis* y esto activa a los macrófagos con aumento en la síntesis de óxido nítrico e IL-12. Esta activación está asociada con una mayor viabilidad de las células levaduriformes en los macrófagos infectados (253).

En la fase aguda de la enfermedad pulmonar, la presencia de TLR4 induce una enfermedad más severa, esto está asociado, como se mencionó, con los niveles elevados de NO e IL-12. En la fase crónica, se ha observado una carga fúngica aumentada a nivel pulmonar en ratones con expresión normal de TLR4 esto asociado con el aumento de IL-12 y anticuerpos de tipo IgM e IgG. Por estas razones es que se considera que la activación de macrófagos inducida de forma temprana por TLR4 no puede controlar la infección por *P. brasiliensis* (260).

Si bien los receptores TLRs son utilizados en la naturaleza para combatir a los microorganismos, en conjunto los estudios realizados con *P. brasiliensis* muestran que en este caso en particular, estos receptores parecen ser utilizados por las células levaduriformes para acceder a los macrófagos y escapar de otros mecanismos fungicidas o fungistáticos de la inmunidad del hospedador (253).

A su vez, se ha observado que Gp43 también interactúa con los receptores TLR2 y TLR4. Se ha evaluado el efecto de esta interacción en monocitos humanos y la producción de citoquinas que se induce. Los monocitos se incubaron con anticuerpos dirigidos contra los tres tipos de receptores (MR, TLR2 y TLR4), en combinación e individualmente, y se observó un efecto más fuerte con la interacción entre TLR2 y MR. En todos los casos se elevaron los niveles de IL-10 y la producción de TNF- α se asoció a los receptores TLR4 y MR. Se considera que la interacción entre Gp43 y los monocitos puede afectar la respuesta inmune innata ya que modula la expresión de estos receptores y la producción de citoquinas pro y antiinflamatorias (259).

Con respecto a los receptores de manosa (MR) se ha descrito su importancia en la fagocitosis (261). Adicionalmente, se ha observado que las células dendríticas inmaduras de ratones resistentes a la enfermedad parecen usar los receptores de manosa para internalizar las levaduras (262).

Otro receptor es la galectina 3 (Gal-3), miembro de la familia de las galectinas, las cuales unen galactósidos y en el caso de PCM, induce la respuesta hacia T_H2 . Estudios recientes han mostrado que por medio de la Gal-3 se inhibe el crecimiento de *P. brasiliensis* ya que inhibe la gemación. Además, se ha visto que Gal-3 impide la internalización de vesículas extracelulares del hongo por parte de los macrófagos. Se considera entonces que el aumento de la expresión de este receptor durante la infección puede afectar el crecimiento fúngico y desestabiliza las vesículas extracelulares, promoviendo así la resistencia ante la PCM. En modelos murinos, la deficiencia de Gal-3 lleva a un incremento en la carga fúngica y disminución en la supervivencia de los animales. Se ha observado que los ratones *knock out* a Gal-3 mueren rápidamente si se compara con las cepas salvajes cuando se produce la infección. Este efecto antifúngico está conservado, y se ha observado también su importancia en el control de la criptococosis (263).

7.1.1.2. Leucocitos polimorfonucleares y células NK

Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) tienen la capacidad de eliminar a las levaduras de *P. brasiliensis* a través del metabolismo oxidativo. La actividad antifúngica en células murinas y humanas es estimulada por el IFN- γ , GM-CSF e IL-1 β e inhibida por la IL-8 y el TNF- α (264). Se ha demostrado que el TNF- α estimula mejor a los macrófagos con respecto al IFN- γ (265). También se ha observado que los patrones genéticos del hospedero ejercen una influencia importante en la inmunoprotección e inmunorregulación de la acción de los neutrófilos, lo cual es muy importante para la posterior regulación de la respuesta celular (266). Además de la fagocitosis, los neutrófilos forman una estructura conocida como NET, compuesta por material nuclear (ADN descondensado e histonas) y material granular como la elastasa; sin embargo en el caso de *P. brasiliensis* este mecanismo no es suficiente para controlar la infección (267).

Las células NK tienen la habilidad de matar directamente las levaduras de *P. brasiliensis* y a la vez pueden reconocer las células infectadas por mecanismos de citotoxicidad dependiente de anticuerpos. Estas células se han encontrado en concentraciones elevadas en la sangre periférica de pacientes con PCM, pero tienen una actividad citotóxica disminuida. En estudios *in vitro* se ha demostrado que las células NK tienen un efecto inhibitorio en el crecimiento de *P. brasiliensis* y además las células NK controlan la entrada de leucocitos PMN a los pulmones de los ratones infectados; esta observación refuerza el concepto de que estas células colaboran en la protección ante la PCM y su función es aún más importante en modelos murinos con deficiencia de linfocitos T con respecto a los ratones con niveles y funciones normales de las linfocitos T (268).

7.1.1.3. Macrófagos, ROS y RNS

La infección por *P. brasiliensis* ocurre inicialmente por la inhalación de conidias o fragmentos de hifa, los cuales llegan a pulmón y eventualmente el sistema inmune puede controlar la presencia fúngica, o se da la evasión de la respuesta inmune con la siguiente diseminación a sangre periférica, órganos linfáticos y mucosas (269). En la primera línea de defensa en pulmón, los macrófagos alveolares son importantes para controlar al hongo por medio de mecanismos de inmunidad innata. Los monocitos y las células dendríticas también fagocitan partículas y microorganismos, los cuales son llevados vía linfática a nódulos linfáticos (270). Los macrófagos producen citoquinas proinflamatorias como el IFN- γ y TNF- α que modulan la respuesta inmune adquirida (271). De esta manera los monocitos estarían involucrados en la respuesta tanto adaptativa como innata (270).

La actividad de estas células está mediada por las especies reactivas del oxígeno o ROS. En ese sentido, se ha encontrado que los ratones susceptibles presentan una disminución en la producción de peróxido de hidrógeno por parte de los macrófagos, con respecto a ratones resistentes que presentaron mayores niveles de ROS. La activación de macrófagos también está asociada al IFN- γ que potencia la actividad fungicida de estas células, en un proceso que es dependiente del estallido respiratorio.

Muchas investigaciones muestran el rol fundamental que tiene el óxido nítrico (NO) en la actividad fungicida de los macrófagos, en mecanismos que son dependientes de hierro

y que permiten la inhibición del dimorfismo. Durante la infección, los macrófagos peritoneales de ratones resistentes a la infección secretan niveles bajos de NO junto a niveles altos de TNF- α (272).

El NO desempeña un papel dual durante la PCM, se ha observado que ratones deficientes en la enzima NO-sintasa inducible desarrollan granulomas mejor desarrollados con respecto a los ratones salvajes, esto a pesar de observar una infección fúngica con mayor carga fúngica. La secreción de TNF- α así como una mayor participación de los linfocitos T activados en los pulmones junto con la formación del granuloma compensan la deficiencia en la producción de NO (253,273,274).

En modelos murinos de cepas susceptibles a PCM se ha observado que los macrófagos se activan con bajas dosis de IFN- γ , secreción aumentada de IL-12 y NO, y muestran una eliminación eficiente del hongo. Por el contrario, en el caso de ratones resistentes a PCM, los macrófagos se activaron de forma deficiente con dosis bajas de IFN- γ y se secreta IL-12 y NO en baja concentración y presentan una capacidad fungicida pobre que correlaciona con la producción de altos niveles de TGF- β activo. Parece ser entonces que los macrófagos de ratones susceptibles parecen ser más eficientes que los macrófagos de ratones resistentes a PCM (253,272,275).

Esto permite comprender las observaciones de diversos investigadores en las que inicialmente la carga fúngica es mayor en ratones resistentes con respecto a los susceptibles. Por tanto, la inmunidad innata parece ser más eficiente en las cepas de ratones susceptibles a la enfermedad con respecto a las cepas resistentes. Esta hiperactividad puede ser explicada con la alta producción de NO que es capaz de frenar el crecimiento de *P. brasiliensis*, pero también interfiere con la respuesta inmune adquirida que lleva a una inmunosupresión de la inmunidad mediada por los linfocitos T (275).

En resumen, estos estudios evidencian que el medio pro inflamatorio originado por la respuesta innata produce una exacerbación de la respuesta de los linfocitos T CD4+ con subsecuente enfermedad progresiva. Además parece que el crecimiento temprano y no controlado de *P. brasiliensis* en el sitio de infección parece no perjudicar al hospedero y puede dar lugar a la presentación de antígenos a los linfocitos T de forma adecuada y con enfermedad regresiva (275).

7.1.1.4. Células dendríticas y otras células presentadoras de antígeno (APC)

Los linfocitos T tienen la capacidad de reconocer antígenos por medio del receptor en su superficie llamado TCR; los antígenos son presentados por medio de las células presentadoras de antígeno en el contexto del Complejo Mayor de Histocompatibilidad II. Entre estas células podemos citar a los macrófagos, las células B, las células endoteliales y las células dendríticas (CD) las cuales se consideran como verdaderas profesionales por su habilidad de activar a los linfocitos T (252,255,258). La activación y maduración de las DCs esta asociada con la secreción de IFN- γ , IL-4 y de IL-17 con aumento de la respuesta de las células T_{Reg}. Durante la infección las CDs de la periferia son activadas por la interacción con los microorganismos o con mediadores inflamatorios y también se estimula la expresión de MHC II y la co-estimulación de moléculas como el CD80, CD86 y CD40. Las DCs también modifican su expresión de receptores de citoquinas y de moléculas de adhesión, con lo cual se da la migración de las CDs de la periferia a la zona T de los ganglios linfáticos. Una vez activada, la CDs muestra los antígenos a los linfocitos T ingenuos quienes se activan e inician la respuesta adaptativa (276).

7.1.2. Respuesta innata humoral

Por otro lado, el componente humoral de la respuesta innata incluye el sistema del complemento y otros factores humorales como péptidos antifúngicos, lectinas de unión a manosa, defensinas y colectinas que proveen un mecanismo de defensa a través de la opsonización de hongos. En este sentido, es importante citar el reconocimiento de depósitos de partículas del complemento con β -(1-6)-glucano de la superficie fúngica por medio del receptor del complemento CR3 el cual es expresado en células como los neutrófilos, los monocitos/macrófagos y las células NK que llevan a cabo la eliminación de patógenos en coordinación con las células fagocíticas en un proceso conocido como opsonización u opsonofagocitosis (255).

7.1.2.1. Sistema del complemento

P. brasiliensis tiene la capacidad de activar la vía alterna del complemento y la adherencia de las levaduras a las moléculas del C3b, de esta manera se facilita la fagocitosis por los macrófagos (277). Se ha demostrado que cuando se da la opsonización de conidias de *P. brasiliensis* se media la activación del complemento guiando a la adherencia y fagocitosis de las conidias por medio del receptor CR3. En modelos murinos se ha observado que al inactivar con calor y poner los macrófagos en incubación con anticuerpos monoclonales anti-CR3, se disminuye la fagocitosis (261).

Tanto la forma micelial como la forma levaduriforme del hongo pueden activar el complemento y activar la opsonización. Por su parte, el CR3 a su vez puede unir 1,3- β -glucano y mediar la fagocitosis de microorganismos que tienen este compuesto en su pared celular (261).

7.1.2.2. Citoquinas

Las citoquinas son el puente entre la inmunidad innata y adaptativa, y pueden ser secretadas tanto por células inmunes innatas como adaptativas. A continuación, se detallará brevemente algunas de las citoquinas mayormente estudiadas y consideradas importantes en la respuesta contra *Paracoccidioides* spp.

1) IFN- γ

La sobrevivencia y el control de la carga fúngica está mediada por la producción de citoquinas, principalmente de IFN- γ . Al neutralizar el IFN- γ , se induce la exacerbación del cuadro pulmonar, la diseminación a bazo e hígado, fallo de la respuesta celular específica y un aumento de la respuesta humoral adaptativa. Además esta neutralización cambia la conformación del granuloma a nivel pulmonar, con lo cual se da una destrucción de la arquitectura del pulmón (278).

No se conoce claramente cuál es la célula encargada de la producción de IFN- γ durante la fase temprana de la respuesta inmune contra *Paracoccidioides* spp., sin embargo, se conoce que las células NK son una fuente importante en otras infecciones fúngicas. Se

considera también que otra fuente importante de IFN- γ son los linfocitos T cooperadores y los citotóxicos (270).

En humanos, se ha observado que la producción de IFN- γ está asociado con resistencia y remisión clínica (250). Personas con PCM asintomática presentan alto porcentaje de CD8⁺/IFN- γ ⁺, CD4⁺/TNF- α ⁺ y CD4⁺/IL-2⁺ si se compara con los pacientes con la forma crónica y juvenil de la enfermedad. Esto confirma que la respuesta T_H1 es protectora en este grupo de pacientes (270).

2) IL-12

Esta citoquina estimula la producción de IFN- γ y la activación y proliferación de los linfocitos T y las células NK. La infección menos diseminada es concomitante con la disminución de citoquinas y la producción de anticuerpos específicos. La administración de IL-12 induce lesiones menos severas pero de alta respuesta inflamatoria a nivel pulmonar. La deficiencia de esta citoquina está asociada con diseminación a hígado y bazo (214).

La enfermedad severa relacionada con la ausencia de IL-12 está asociada con la producción de anticuerpos específicos y la pérdida del granuloma el cual se convierte en una lesión no organizada con gran cantidad de eosinófilos y fibrosis pulmonar. Se observan lesiones metastásicas con gran carga fúngica en múltiples órganos, incluidos el corazón, el timo, riñones e intestinos, entre otros. Junto con la producción de anticuerpos se da la producción de citoquinas como el TNF- α , IFN- γ , GM-CSF, IL-3, IL-4, IL-5 e IL-10 (279).

3) IL-4

Esta citoquina se considera la más importante en la respuesta tipo T_H2 y determina en gran parte la susceptibilidad o la resistencia del hospedero. La depleción de esta citoquina promueve una respuesta protectora en modelos animales. Esta interleuquina puede activar o inhibir la acción fagocítica de las células (248,255,280).

En humanos se ha observado la participación de la IL-4 en la forma juvenil de la enfermedad. Esto está relacionado con la inducción de subtipos de inmunoglobulinas de tipo IgE e IgG4. También se ha descrito la producción de IL-4 e IL-5 en pacientes con

PCM activa y en las formas juveniles de la enfermedad (281). Por otro lado en muchos pacientes con la forma crónica de la PCM no se encuentran niveles aumentados de IL-4, esto puede indicar que existe otro mecanismo inmune asociado a la severidad de la enfermedad (282).

4) IL-10

La producción de esta citoquina está conservada en la PCM, independientemente de la forma clínica (282). Además, se ha demostrado que existe una relación negativa entre la IL-10 y la IL-12. La IL-10 es la citoquina más abundante en la respuesta temprana tipo T_H2 , la cual se produce después de la estimulación con el antígeno en las células de nódulos linfáticos de ratones susceptibles. Por el contrario, ratones resistentes tienen baja producción de esta citoquina. Estudios en animales permiten sugerir que en humanos la deficiencia de IL-10 permite que se establezca una respuesta T_H1 más potente que puede impedir el desarrollo de la enfermedad. Además la producción tardía de esta citoquina puede ser beneficiosa ya que impide la producción de citoquinas tipo 1 y restringe su actividad inflamatoria deletérea en los tejidos del hospedero (270, 283).

Se han utilizado modelos animales con cepas de ratones que no producen IL-10. En este escenario, se ha observado una disminución considerable de la carga fúngica a nivel pulmonar, hepático y de bazo. Se observa también una disminución en la producción del anticuerpos IgG pero con altos niveles de citoquinas. Este hallazgo es consistente con la actividad inhibitoria que presenta la IL-10. En ratones salvajes se observa la formación de un granuloma bien organizado, rodeado de linfocitos y que contiene una gran cantidad de células levaduriformes en crecimiento con gemación evidente (270).

5) TNF- α

El TNF- α amplifica la respuesta inmune, promoviendo la formación del granuloma y la actividad fagocítica mediada por los macrófagos. Con respecto al granuloma, se sabe que la expresión de TNF- α esta distribuida de manera difusa y que se expresa en las células mononucleares alrededor del granuloma, también se expresa en los queratinocitos, lo que

indica que esta citoquina es importante en la formación del granuloma pero también en su mantenimiento (284). Adicionalmente, la producción sistémica de TNF- α puede ser responsable de síntomas como fiebre, anorexia, pérdida de peso y daño tisular, comúnmente asociados con formas moderadas y severas de PCM (285,286).

7.2. Respuesta inmune adaptativa

Diversos estudios epidemiológicos han estimado que en áreas endémicas más de 10 millones de individuos pueden estar infectados con *P. brasiliensis* (136). Sin embargo, una gran mayoría de estas personas no desarrollan la enfermedad y esto se debe al efecto protector de la respuesta inmune adaptativa. En este sentido, las células T son el principal mecanismo por el cual se da esta protección, esto por medio de la habilidad de estas células para secretar citoquinas, activar células fagocíticas y ejercer un efecto citotóxico en las células infectadas; además controlan la producción de anticuerpos, regulan la formación del granuloma y limitan la evasión fúngica (247, 270).

Como se mencionó anteriormente, luego del reconocimiento de diferentes PAMPs fúngicos por medio los PRRs, se da la presentación celular de antígenos por medio de las células profesionales presentadoras de antígenos (CPA) que incluyen las células dendríticas, los macrófagos y los linfocitos B quienes presentan los epitopos antigénicos en el contexto del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) clase II (MHC-II). El MHC-II presenta antígenos a los linfocitos T CD4⁺ y propicia su activación (252, 287).

Las citoquinas son fundamentales en este ambiente de presentación antigénica, ya que desencadenan la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ en subtipos específicos de linfocitos T_H activados (258, 288). Por su parte, las células dendríticas pueden liberar IL-12, en este caso la respuesta que se producirá será la diferenciación de los linfocitos CD4⁺ a T_H1. Las citoquinas asociadas a T_H1 y T_H17 inducidas por IFN- γ e IL-17 producen inmunidad protectora (T_H1) e inmunidad protectora inflamatoria (T_H17). Por otro lado, el IFN- γ induce la inmunidad celular estimulando la fagocitosis y la liberación de IL-17 e IL-22 por los T_H17, con esto incrementa la respuesta de los neutrófilos y la liberación de péptidos antimicrobianos como las defensinas en el sitio de infección. Por último, en los últimos pasos de la respuesta inmune, la interacción entre FoxP3⁺/CD4⁺ que regula T_{Reg}

liberan el factor de crecimiento transformador (TGF- β) e IL-10 para disminuir la respuesta inflamatoria (256).

7.2.1. Respuesta humoral por anticuerpos

Si bien es cierto en muchas enfermedades la producción de anticuerpos tiene importancia para el control de microorganismos, en humanos con PCM, la producción de anticuerpos es un marcador de severidad de la enfermedad. De esta manera, pacientes que presentan formas agudas o crónicas diseminadas tienen alto título de anticuerpos, activación policlonal de linfocitos B, y la circulación de complejos inmunes. Se sugiere que estos anticuerpos no tienen una función protectora, ya que pueden persistir inclusive cuando se ha dado un tratamiento efectivo contra esta enfermedad (108,270).

Se ha demostrado que la mayoría de los antígenos de *P. brasiliensis* son T-dependientes, aunque hay excepciones importantes, incluyendo a Gp43, el cual puede activar de forma directa a los linfocitos B sin la colaboración de los linfocitos T CD4⁺. En ratones susceptibles se ha visto la producción de anticuerpos IgG1 e IgG2b que están regulados por la IL-4 y TGF- β (289).

La producción de IgE está asociada con una respuesta mediada por células T alterada en los pacientes con PCM. Se ha observado que los pacientes con la forma juvenil tienen altos niveles de IgE e IgG4 contra el antígeno gp43. Este fenómeno se observa también en pacientes con la forma adulta de la enfermedad. La eosinofilia forma parte de este proceso y se ha descrito que existe una relación inversa entre los niveles de estas células y la función de los linfocitos T (290).

En estudios experimentales se ha observado que la secreción de IgA está asociada con la enfermedad progresiva en ratones susceptibles. Se ha observado que hay mayor cantidad de anticuerpos IgA en la forma juvenil con respecto a la forma crónica de la enfermedad; además se han observado niveles aumentados de TGF- β , la cual es responsable del *switch* a IgA, la inhibición de la proliferación de células T y el deterioro de la activación de los macrófagos. También se ha detectado la presencia de TGF- β en los ganglios linfáticos de pacientes con la forma juvenil de PCM y esto estaría relacionado con una respuesta antiinflamatoria local (270,290).

7.2.2. Respuesta adaptativa celular

La respuesta inmune adaptativa celular está dada por los linfocitos T cooperadores y citotóxicos. Los linfocitos T cooperadores se subdividen en varios subtipos que serán determinantes en la categorización de la PCM como se describió al inicio de este documento. Por su importancia preponderante, un subtipo de linfocitos T cooperadores, los linfocitos T_{Reg} serán descritos en detalle en un apartado exclusivo.

7.2.2.1. Linfocitos T CD4⁺ y los CD8⁺ en la PCM

Se ha descrito ampliamente que la respuesta involucrada en la resistencia contra *P. brasiliensis* es principalmente la T_{H1} y que la susceptibilidad es debido a la respuesta T_{H2} (113,291). A su vez, los pacientes que presentan la forma juvenil aguda tienen una respuesta de tipo T_{H2} con una cantidad importante de citoquinas con actividad supresora de la respuesta celular como lo son la IL-4, IL-5, IL-10 y el TGF- β ; se producen también altas cantidades de anticuerpos tipo IgG4, IgE e IgA esto regulado por las citoquinas de la respuesta T_{H2} con una alta presencia de eosinófilos circulantes e infiltrados en los sitios de lesión (290).

Los individuos con la forma crónica de la enfermedad desarrollan una respuesta mixta, producen citoquinas T_{H1} como IFN- γ , TNF- α e IL-2 y cantidades variables de IL-10 y de IL-4. Además, producen niveles bajos de anticuerpos si se compara con los pacientes de la forma juvenil. Por el contrario, los pacientes con la forma asintomática presentan altos niveles de interleuquinas de tipo T_{H1} como lo son el IFN- γ y TNF- α así como una respuesta linfocitaria CD8⁺ (108,282).

Como se ha mencionado a lo largo del trabajo, el IFN- γ caracteriza a la población inmune T_{H1}. Esta interleuquina es importante para la activación de la respuesta celular. Se ha descrito que entre los pacientes asintomáticos y los crónicos hay un aumento en la expresión del IFN- γ (248,253,292).

La expresión de IL-4 (característica de la respuesta T_{H2}) varía entre los pacientes, observándose una mayor expresión en los pacientes con las formas juveniles. Estos

pacientes tienen una alta expresión del factor de transcripción GATA-3, lo cual se refleja en la producción de IL-4. Esta interleuquina inhibe la respuesta T_H1 e induce la producción de IgG4 e IgE (249).

Con respecto a la respuesta T_H17 se ha observado que los pacientes que presentan la forma crónica de la enfermedad producen una mayor cantidad de IL-17 que otros grupos ya que se ha visto su importancia en la formación del granuloma (293). En las mucosas y en la piel de estos pacientes también se pueden encontrar muchas células produciendo IL-17; las células mononucleares periféricas expresan IL-17 ($CD3^+$, $CD4^+$, $IL-17^+$) (249).

Continuando con los pacientes que presentan la forma crónica de la enfermedad, estos producen grandes cantidades de IL-12p40 y poco IFN- γ . Estos resultados pueden estar explicados por la IL-23 que presenta una subunidad p40 (282). La IL-23 y la IL-12 son producidas por las CPA (macrófagos y células dendríticas) y tienen actividad proinflamatoria y estas interleuquinas son reconocidas por inducir la producción de otras citoquinas proinflamatorias especialmente IL-17 (249, 294).

Además de las reconocidas respuestas T_H1 , T_H2 y T_H17 en la actualidad se han descrito otras subpoblaciones, entre ellas los linfocitos T_H9 . Estos linfocitos producen una gran cantidad de IL-9 y de IL-21. Estas células requieren IL-4 y TGF- β para su diferenciación pero no está claro si su diferenciación se da a partir de linfocitos ingenuos o de T_H2 (295). La IL-9 podría participar en la activación policlonal de linfocitos B lo cual es característico de la forma juvenil de la PCM (249,296).

Por otro lado, tenemos a las células T_H22 que se caracterizan por la producción de IL-22 y son importantes en la respuesta inflamatoria observada en superficies epiteliales. En un inicio esta interleuquina se relacionó con las células T_H17 , pero actualmente se conoce que existen células que producen esta interleuquina sin producir IL-17, las cuales se llaman T_H22 . Esta interleuquina es importante en la respuesta contra bacterias y hongos a nivel de superficies mucosas (249, 297). Luego de este estudio sobre la inmunología de *Paracoccidioides* spp. se presenta la figura 16 que muestra en términos generales las posibles respuestas inducidas frente a este hongo.

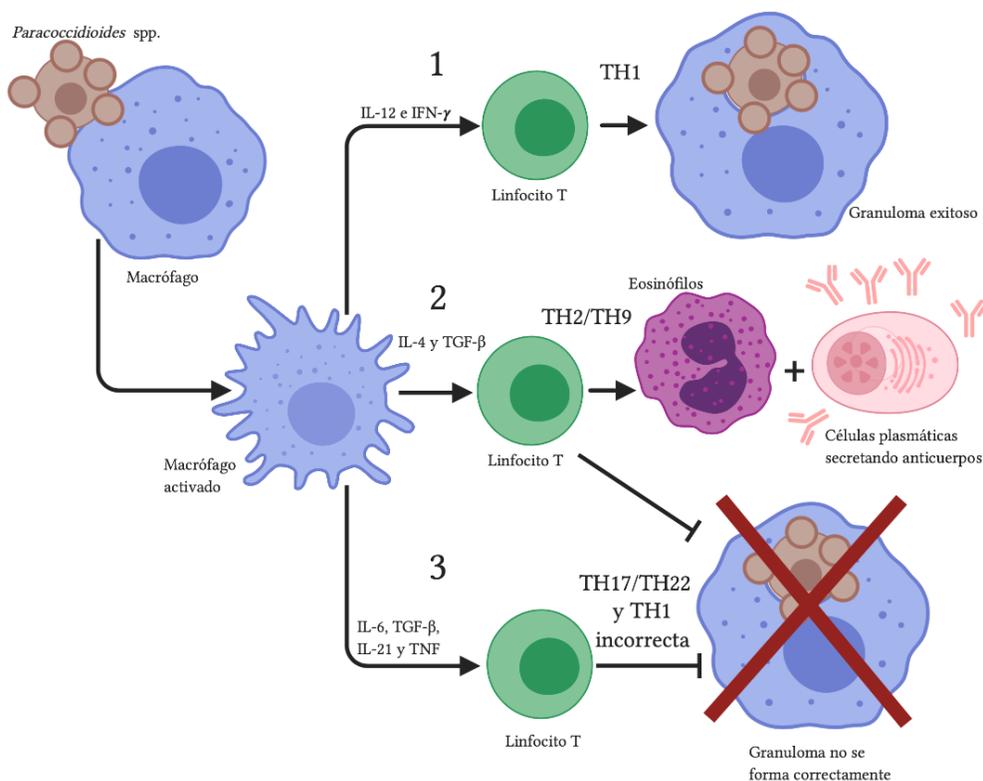


Figura 16. Vías inmunológicas de respuesta ante la interacción entre *Paracoccidioides* spp. y el hospedero.

1) La mayoría de los individuos, no desarrollan la enfermedad debido a la formación de un granuloma y el control de la replicación fúngica, mediante una respuesta T_H1 . 2) Los pacientes con formas graves llamadas PCM juvenil, desarrollan una respuesta mixta T_H2/T_H9 que produce una respuesta humoral y alérgica ineficaz contra el hongo. 3) Los pacientes con PCM crónica producen una respuesta T_H17/T_H22 junto con una respuesta T_H1 deficiente que no permite el control de la infección. Para más detalles, referirse al texto. Elaboración propia según las referencias citadas en el texto.

7.2.2.2. Linfocitos T reguladores y sus funciones en PCM

Los linfocitos T reguladores (T_{Reg}) son muy importantes en la respuesta inmune, ya que controlan tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa y son esenciales para el mantenimiento de la inmunotolerancia, control y respuesta contra tumores, trasplantes y procesos infecciosos. Estas células expresan el factor de transcripción Foxp3 el cual es codificado por el cromosoma X. Se conocen dos poblaciones: T_{Reg} de origen tímico y T_{Reg} inducidos en la periferia. La importancia de la expresión de Foxp3 es la preservación de la tolerancia periférica, lo que se ha demostrado por medio de modelos murinos. La

deficiencia de este factor durante la infancia lleva a una enfermedad autoinmune progresiva ligada al cromosoma X (298).

El fenotipo de esta célula es $CD4^+CD25^+Foxp3^+$. Bajo ciertas condiciones las células T convencionales pueden convertirse en células T_{Reg} , por ejemplo, en presencia de TGF- β . Otras células T supresoras que no expresan Foxp3 pueden diferenciarse como las T reguladoras-1 (TR1) y T_H3 pueden ser inducidas por IL-10 y TGF- β y su actividad regulatoria es mediada por las mismas citoquinas anti inflamatorias (299).

En el caso específico de la PCM, el daño de la respuesta inmune celular está evidenciado en respuesta hacia la prueba de intradermorreacción, con presencia de anergia y disminución de la proliferación linfocitaria en respuesta a los antígenos fúngicos. El mecanismo asociado a esta inmunosupresión no se ha comprendido bien, pero parece estar relacionado con el desbalance en la producción de la supresión de citoquinas como IL-10 y alta expresión de TGF- β , alta expresión de CTLA-4 en linfocitos circulantes; además se ha observado un incremento en la apoptosis vía Fas-Fas L (300).

La presencia de células que expresan Foxp3 en el infiltrado inflamatorio de la lesión por PCM está documentado principalmente en pacientes con las formas crónicas de la enfermedad. Un dato muy interesante es que existe una correlación positiva entre las células que expresan Foxp3 y la densidad de células levaduriformes en la mucosa oral. Además pacientes con PCM presentan una gran cantidad de células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ en circulación periférica, los cuales vuelven a valores normales luego de tratamiento antifúngico, estas células exhiben alta expresión de moléculas como CTLA-4 que es un receptor de membrana de linfocitos T que inhibe la función de linfocitos citotóxicos. Con la expresión de CTLA-4 por los T_{Reg} se da una interacción con ligandos CD80 y CD86 de las CPA, específicamente DCs y macrófagos induciendo la producción de indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO). Esta enzima es un potente inhibidor que actúa induciendo los metabolitos pro-apoptóticos vía metabolismo del triptófano, lo que resulta en la supresión de las células T efectoras. Además, la señalización vía CTLA-4 aumenta la disponibilidad para la asociación entre TGF- β en la región de contacto entre las T_{Reg} y las células efectoras, aumentando su actividad supresora. Las células T_{Reg} pueden inducir la apoptosis de células T efectoras directamente vía CD95-CD95L (301).

La producción de citoquinas supresivas como TGF- β e IL-10 por los linfocitos T_{Reg} puede contribuir con la supresión de la respuesta inmune celular. La TGF- β es una citoquina pleiotrópica con diversidad de funciones, entre las cuales se puede citar la inducción de la activación, la diferenciación, proliferación y supervivencia de linfocitos T_{Reg}. En acción con la IL-10 la TGF- β modula la respuesta inmune por inactivación de macrófagos, se inicia la curación de los tejidos y el proceso de fibrosis al producir componentes de la matriz extracelular por los fibroblastos (301,302).

La modulación de los linfocitos T_{Reg} puede tener tanto efectos beneficiosos como perjudiciales para el hospedero por exacerbación de la respuesta inmune o porque se puede dar la proliferación excesiva del agente infeccioso. Además, la expresión de linfocitos T_{Reg} a nivel pulmonar está asociado con la expresión y la actividad de algunos componentes del sistema inmune innato. Se ha demostrado que los TLRs, CLRs, *NOD-like receptors* y la molécula adaptadora MyD88 participan en el control de la expansión de los linfocitos T_{Reg}. Por ejemplo, se ha demostrado que la expansión y la función de los T_{Reg} es dependiente de TLR2 y MyD88. En la PCM, la ausencia de MyD88 lleva a un aumento en la mortalidad en modelos murinos (257).

El MyD88 es necesario para controlar y promover la respuesta T_{H17} que a su vez estimula una respuesta rica en PMN, con lo cual se restringe el crecimiento y la diseminación fúngica en órganos y tejidos. Por medio de MyD88 se regula la respuesta de linfocitos T_{Reg} con cual se evita la inflamación excesiva. Con la inmunidad balanceada entre las células T_{H1}, T_{H2}, T_{H17} se controla la enfermedad y aumenta la supervivencia en modelos murinos. En ausencia de esta molécula moduladora, se suprime la actividad linfoproliferativa y la activación y migración disminuida de las células fagocíticas y linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ al sitio de infección (257,301,303).

El CLR o receptor dectina 1 se ha visto involucrado en la inducción y la modulación de la inmunidad adaptativa, y su expresión contribuye al desarrollo de la inmunidad celular T eficiente controlando la expansión de los linfocitos T_{Reg} de forma controlada. En ratones con CLR dectina ausente, se observa una mayor diseminación y mortalidad, con reducción de la respuesta T CD4⁺ y T CD8⁺ con aumento de T_{Reg} (304).

El *NOD-like receptor* P3 (NLRP3) inflamasoma es un complejo intracelular multimérico que desencadena la activación de caspasas y la maduración de IL-1 β e IL-18, citoquinas importantes para la respuesta innata contra patógenos. La activación del inflamasoma tiene un rol inmunoprotector contra la PCM ya que promueve la respuesta T_H1/T_H17 y reduce la supresión mediada por los T_{Reg} (301,305). Debido a su importancia primordial en la resolución de la PCM, se asignará un apartado al granuloma y su rol en la PCM. En la figura 17 se resume el papel de los PRRs en la expansión de los linfocitos T_{Reg}.

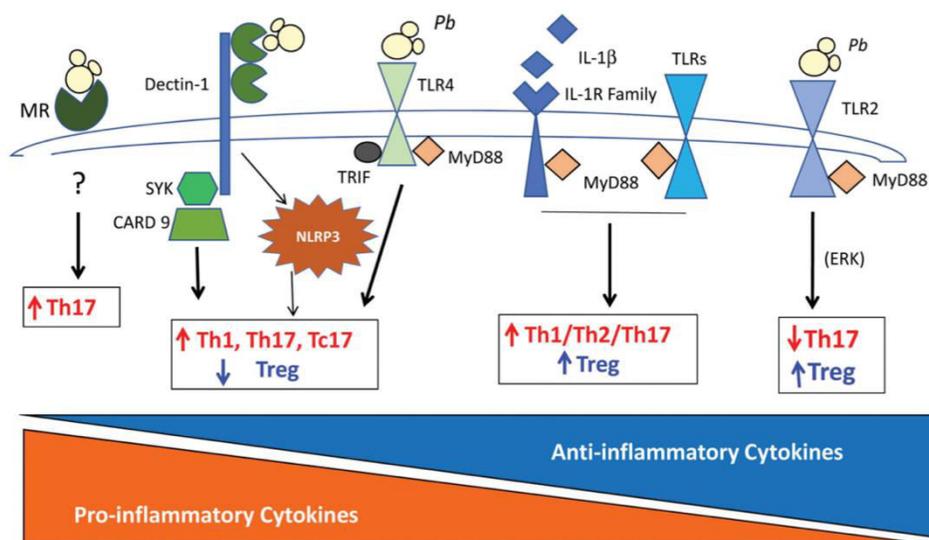


Figura 17. Influencia de los PRRs en la expansión de linfocitos T_{Reg} en la PCM.

Los TLR4 inducen la producción de linfocitos T proinflamatorios y reducen la expansión de los T_{Reg}; mientras los TLR2 estimulan la diferenciación de los linfocitos T_{Reg} y una disminución de la respuesta inmune T_H17. Otros PRRs y sus moléculas de transducción de señales (como MyD88) poseen roles en la activación o represión de la respuesta de linfocitos T_{Reg}. Así, Dectin-1 (vía Syk – CARD9) y MR median la expansión de linfocitos T_H17 y consecuente inhibición de los T_{Reg}. Finalmente, el inflamasoma NLRP3 media la diferenciación de linfocitos T_H1 y T_H17 e inhibe la proliferación de T_{Reg}. Tomado y adaptado de Fujio *et al.* 2016 (301).

7.3. El granuloma en la PCM

Se ha descrito que la organización del granuloma es independiente de la inmunidad adquirida, pero el control de la lesión depende del estado inmune de los pacientes. La respuesta del hospedero a nivel tisular es la típica reacción de inflamación epiteloide

granulomatosa con áreas de supuración y con un número variable de células levaduriformes. El granuloma puede presentar un área central de necrosis, presencia de un número variable de células gigantes, agregados de PMN y células levaduriformes, un halo de linfocitos y fibrosis. Los linfocitos B y las células plasmáticas, usualmente secretan anticuerpos IgG, y también están presentes en diversos estadios de maduración (284).

Se ha observado que los individuos sanos que entran en contacto con *P. brasiliensis* pueden resolver la infección en el sitio de inoculación por medio de una respuesta de tipo T_H1 con formación de un granuloma denso (248). La mayoría de las manifestaciones clínicas ocurren porque el hospedero no puede desarrollar la respuesta T_H1 apropiada y por lo tanto no puede formarse el granuloma. En estos casos, el desarrollo de la respuesta T_H2 es ineficiente para contener la dispersión de la enfermedad (250,306).

Entre las citoquinas involucradas en la formación del granuloma se han descrito el IFN- γ , TNF- α e IL-12 están involucradas en la organización de la lesión granulomatosa en pulmones y la ausencia del mismo guía hacia una reacción inflamatoria desorganizada y pérdida de la estructura pulmonar. A su vez, la ausencia de IL-4 induce la presencia de un granuloma bien organizado y rodeado de leucocitos mononucleares (291,307).

En las formas juveniles y crónicas de la PCM se ha encontrado una alta expresión de IL-10 y de TGF- β . También se han encontrado células con IL-5 e IL-10. Por el contrario, las lesiones bien organizadas y asociadas con formas benignas de la infección presentan muchas células positivas con IL-2 e IFN- γ (306).

En la formación del granuloma, como se mencionó anteriormente la respuesta T_H1 es importante porque contribuye a la formación de esta estructura. Se ha demostrado que si se suprimen la IL-6 y la IL-23 se daña la formación del granuloma y hay mayor susceptibilidad durante la infección; esto se asocia con una disminución del TNF- α e IFN- γ y se induce la expresión de NO sintasa (293).

Para concluir esta sección, en la figura 18 se presenta un resumen de los subtipos de respuestas de linfocitos T cooperadores y su relación con los tipos de cuadros de PCM.

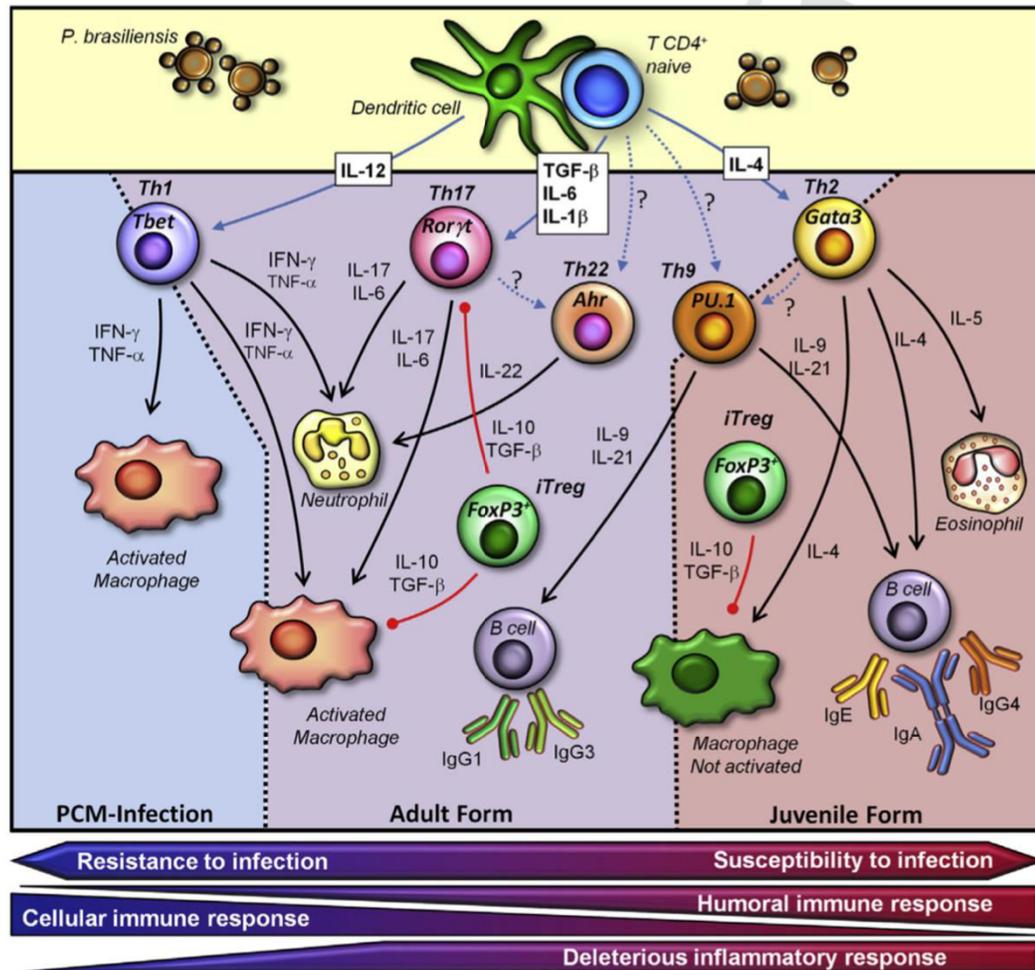


Figura 18. Modelo para explicar las respuestas inmunes observadas durante diferentes formas de PCM.

- 1) En la forma sintomática de PCM, la respuesta predominante es de tipo T_H1 con la producción de $IFN-\gamma$ que activa macrófagos, importantes en la resistencia a la infección.
- 2) La forma aguda o juvenil suele describirse por una susceptibilidad, al presentar una respuesta inmune eminentemente humoral con la activación de linfocitos T_H2 y T_H9 . Las IL-4 e IL-9 inducen de la producción de anticuerpos por los linfocitos B (IgG4 e IgE). La IL-5 induce la producción y activación de eosinófilos. Finalmente, la IL-4 contribuye a la inhibición de los macrófagos, lo que lleva a la susceptibilidad. La forma crónica o adulta presenta una respuesta mixta T_H17/T_H22 , con contribución de T_H1 y T_H2/T_H9 .
- 3) En esta última forma, la presencia de linfocitos T_{Reg} puede correlacionarse con el control de la respuesta inflamatoria e inhibir la activación de macrófagos. Esta respuesta mixta contribuiría a la resistencia parcial a la infección, pero puede también inducir una respuesta inflamatoria exacerbada, con activación de neutrófilos que puede llevar a daño tisular y fibrosis, observados en la mayoría de los pacientes con esta forma de la enfermedad.

Tomado y adaptado de de Castro *et al.* 2013 (249).

7.4. Modulación de la respuesta inmune por *Paracoccidioides* spp.

La interacción de componentes de la pared fúngica con receptores del sistema inmune induce la producción de citoquinas, estimulando los mecanismos celulares de defensa contra el hongo, causando eliminación y regulación de la intensidad de la respuesta granulomatosa, para así prevenir el daño tisular (248). El control de la infección por *Paracoccidioides* spp. depende de la respuesta inmune celular, donde los linfocitos T tienen un papel fundamental en la defensa contra el hongo. La PCM tiene un amplio rango de manifestaciones clínicas, cada una asociada a un patrón de respuesta de los linfocitos T (1).

La mayoría de los individuos infectados viven en áreas endémicas, pero no desarrollan la enfermedad. Estos individuos desarrollan el tipo de respuesta T_H1 , que resulta en la formación de un granuloma y el control de la replicación con formas fúngicas en estado de latencia. Por el contrario, individuos que desarrollan la enfermedad generalmente tienen deficiencia en la respuesta T_H1 (250). Se ha observado que los pacientes que presentan las formas agresivas de PCM desarrollan una respuesta mixta de tipo T_H2/T_H9 que no forma los granulomas y que activa una respuesta humoral con hipergamaglobulinemia con predominio de IgE y eosinofilia; mientras que pacientes con la forma crónica de PCM predomina la respuesta T_H17/T_H22 con una respuesta T_H1 deficiente que no permite la resolución de la infección pese a una inflamación rica en neutrófilos (249). En los pacientes con formas crónicas y severas de PCM, la respuesta T reguladora suprime la inmunidad mediada por las células T produciendo anergia de estas células (175,251). En el cuadro 2 se pueden observar las principales características de las respuestas involucradas en la PCM.

Cuadro 2. Resumen de citoquinas involucradas según respuesta de células T colaboradoras.

Tipo de respuesta inmune	Agente	Factores de diferenciación	Principales citoquinas efectoras
T_H1	Hongos y bacterias intracelulares y virus	IL-12 e IFN- γ	IL-2, IFN- γ , TNF- β , IL-3, GM-CSF y TNF- α
T_H2	Helminthos y hongos	IL-4	IL-4, IL-5, IL-13, IL-6, IL-10, GM-CSF y TNF- α
T_H9	Helminthos y hongos	IL-4 y TGF- β	IL-9 e IL-21
T_H17	Bacterias y hongos extracelulares	IL-6, TGF- β e IL-21	IL-17, IL-6 e IL-22

T _H 22	Desórdenes de la inmunidad	IL-6 y TNF	IL-22
-------------------	----------------------------	------------	-------

Elaboración propia, adaptado de Hernández *et al.* 2009; Roitt *et al.* 1994 y Pagliari *et al.* 2010 (251,252,308).

A continuación, se detallarán brevemente las respuestas inmunes innata y adaptativa en respuesta a la PCM y las estrategias de evasión, y por tanto de virulencia, de *Paracoccidioides spp.*

7.4.1 Modulación de la respuesta innata

Muchos mecanismos de la respuesta innata como la activación de proteínas del complemento, la actividad microbicida de las células NK y las células fagocíticas son importantes para controlar la infección por *Paracoccidioides spp.* La participación de estas células inflamatorias es primordial para la respuesta y la resistencia ante el hongo, y su actividad es inducida por el patógeno y la producción de citoquinas por otras células (309). Mediante el estudio con modelos animales, se ha observado que la actividad citotóxica esta disminuida en la PCM. Lo cual evidencia la importancia de la inmunidad celular durante la infección por *Paracoccidioides spp.* (310).

Las células polimorfonucleares (PMN) tienen función fungicida contra *P. brasiliensis* a través de los ROS y con ayuda de macrófagos (284,292). Los PMN son muy importantes en las primeras etapas de la infección ya que confieren resistencia al hospedero y contribuyen a desarrollar una respuesta efectiva contra *P. brasiliensis*. Los PMN también producen grandes cantidades de prostaglandinas E2 y leucotrienos, perpetuando el edema y la inflamación (108). Sin embargo, *P. brasiliensis* en los PMN desencadena un proceso anti-apoptótico de neutrófilos, favoreciendo la proliferación y sobrevivencia del hongo dentro de las células fagocíticas, por inducción autocrina de IL-8 (311).

Por otro lado, la producción de óxido nítrico (NO) por macrófagos en modelos murinos favorece la formación de granulomas y por ende la resolución de la infección (274). Sin embargo, la producción excesiva de NO inhibe la formación de los granulomas y fomenta la dispersión del hongo, lo que conlleva a la diseminación de la PCM (273).

Además, el TNF- α amplifica la respuesta inmune, promoviendo la formación del granuloma y la actividad fagocítica mediada por los macrófagos. Con respecto al granuloma, se sabe que la expresión de TNF- α esta distribuida de manera difusa y que se

expresa en las células mononucleares alrededor del granuloma, también se expresa en los queratinocitos, lo que indica que esta citoquina es importante en la formación del granuloma pero también en su mantenimiento (284). Adicionalmente, la producción sistemática de TNF- α puede ser responsable de síntomas como fiebre, anorexia, pérdida de peso y daño tisular, comúnmente asociados con formas moderadas y severas de PCM (285,286).

Finalmente, los *Toll-like receptors* (TLR) y los *lecithin C-like receptors* (CLR) son proteínas transmembrana que interactúan con estructuras moleculares del patógeno por activación de las células fagocíticas (113). Los TLR tienen la capacidad de reconocer los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) e inducen señales que desencadenan la expresión de genes de la respuesta innata, a su vez que activan la producción de citoquinas con propiedades inflamatorias y antiinflamatorias que regulan la respuesta adaptativa (108,312). Si bien los TLR promueven la respuesta inmune contra el hongo, experimentos en animales sugieren que las levaduras pueden penetrar los macrófagos del hospedero a través del TLR2 y el TLR4. Se considera que la interacción entre los receptores TLR y *P. brasiliensis* es una vía de escape del hongo para sobrevivir dentro de la célula fagocítica pues esta interacción promueve una secreción exacerbada de NO que no permite controlar la infección (108,257,303,313).

7.4.2 Modulación de la respuesta adaptativa

La inmunorregulación en la PCM está asociada con patrones de respuesta inmune regulada por los linfocitos T colaboradores T_H1 y T_H2, principalmente, además de las células T_{reg} CD4⁺/CD25⁺. Los individuos sanos que entran en contacto con *P. brasiliensis* pueden resolver la infección en el sitio de inoculación por medio de una respuesta de tipo T_H1 con formación de un granuloma denso (248). La mayoría de las manifestaciones clínicas ocurren porque el hospedero no puede desarrollar la respuesta T_H1 apropiada y por lo tanto no puede formarse el granuloma. En estos casos, el desarrollo de la respuesta T_H2 es ineficiente para contener la dispersión de la enfermedad (250,306).

Parte importante de la respuesta ante la presencia del hongo en el organismo es la producción de citoquinas. Sin embargo, durante la interacción entre el hongo y las células fagocíticas, algunas citoquinas pueden promover el crecimiento del hongo en los tejidos,

guiando a la progresión de la enfermedad. Se necesita, por tanto, un balance entre señales pro y anti-inflamatorias para que se dé una interacción que beneficie al hospedero (141).

Por lo tanto, si el hongo induce una respuesta temprana de síntesis de citoquinas con actividad antiinflamatoria como la IL-10 y el TGF- β (T_H2/T_H9) el resultado será la supresión de respuesta de los macrófagos, permitiendo la instauración y la reproducción del hongo en tejidos y su diseminación en varios órganos. La expresión de estas citoquinas en los nódulos linfáticos se asocia por tanto con la evasión de la respuesta inmune y contribuye a la diseminación de la PCM de pacientes con las formas agudas de la enfermedad (284). Adicionalmente, los pacientes con PCM crónica muestran altos niveles de células T_{reg} $CD4^+/CD25^+$ tanto en sangre periférica como en las lesiones. Estas células son importantes para regular la respuesta inmune y su ausencia está asociada con la exacerbación de la respuesta inmune y el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Por otro lado, la activación excesiva puede asociarse con susceptibilidad a patógenos por anergia (175,284).

Por otro lado, pacientes con las formas crónicas de la enfermedad desarrollan una respuesta del tipo T_H17/T_H22 , con alta producción de IL-17 y de IL-22 sumándose una respuesta intermedia entre T_H1/T_H2 (314). Además, los individuos con PCM que viven en áreas endémicas y no desarrollan la enfermedad muestran un patrón tipo T_H1 con supresión de hongo y su replicación y el mantenimiento del balance entre el hospedero y el parásito. Los pacientes con enfermedad aguda o subaguda muestran respuesta tipo T_H2 (280).

Finalmente, a la respuesta humoral (T_H2) no es efectiva contra el hongo y está caracterizada por la producción de altos títulos de anticuerpos IgG₄, IgA e IgE, asociados a la prevalencia de citoquinas que suprimen el granuloma como la IL-4, IL-5 y TGF- β junto con eosinofilia marcada (108). Aunque la respuesta inmune es esencial para la defensa del hospedero, aspectos inmunopatológicos están relacionados con la exacerbación de la respuesta inmune resultando en daño tisular. Citoquinas proinflamatorias como la IL-1, IL-8 y TNF- α pueden estar involucrados en desórdenes metabólicos como fiebre, proteína C-reactiva aumentada, astenia y pérdida de peso en pacientes con enfermedad más severa. Por el contrario, las citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 y el TGF- β probablemente tienen la función de controlar y modular la respuesta inflamatoria en pacientes con enfermedad activa severa (108,284).

7.5. Vacunas contra *Paracoccidioides* spp.

Los intentos de desarrollo de vacunas contra el patógeno *Paracoccidioides* spp. o contra la enfermedad que causa (para evitar el agravamiento de los síntomas), se ha centrado en la adhesina Gp43. Como anteriormente mencionado, la glicoproteína Gp43 induce una respuesta inmune T_H1 que es protectora contra la infección por vía respiratoria de *P. brasiliensis*. Una de las primeras etapas para inducir dicha respuesta es el reconocimiento por linfocitos T cooperadores que reconocen un péptido de Gp43 de 15 aminoácidos denominado P10. Modelizaciones bioinformáticas sugieren que P10 puede ser presentado por varios haplotipos de HLA, lo que sugiere su utilidad para ser utilizado como inmunógeno para una vacuna contra la paracoccidioidomicosis pulmonar (primera etapa y sitio de diseminación sistémica). En 2012, su uso para vacunación ha sido documentado en ratones (315).

En este sentido, se han realizado ensayos en ratones vacunándolos con un plásmido vector que contiene la secuencia codificante por el péptido P10. Luego, los ratones se confrontan a una cepa patogénica de *P. brasiliensis*. La vacunación disminuyó la carga fúngica en pulmón y evitó la formación del granuloma. Se induce también la producción de células T reguladoras las cuales están involucradas en el mantenimiento de la memoria inmunológica (316). Se ha demostrado su efectividad también en ratones inmunosuprimidos donde se produjo inmunidad del tipo T_H1 de forma predominante. En combinación con un adyuvante inmunogénico, se considera que la vacuna anti-P10 podrá utilizarse a futuro en ensayos clínicos (317).

8. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA PCM

Esta enfermedad puede comprometer cualquier órgano o sistema, los hallazgos se pueden encontrar durante la presentación clínica o muchas veces se encuentran en hallazgos patológicos de autopsias. Todo esto dificulta la clasificación de la enfermedad.

El consenso adoptado en el Coloquio Internacional en Paracoccidiodomicosis en febrero 1986, Medellín, Colombia, es la clasificación guía utilizada en la actualidad para esta enfermedad. Se toman en cuenta criterios como las lesiones topográficas, la severidad de la presentación clínica y los resultados serológicos. La siguiente clasificación fue tomada de la Guía Brasileña para el Manejo Clínico de la Paracoccidiodomicosis. Esta guía está basada en el consenso de Medellín, 1986 (173). A su vez, esta guía fue desarrollada bajo el criterio de muchos de los principales investigadores de la enfermedad en Brasil. En términos generales se contemplan las siguientes categorías:

- I. La paracoccidiodomicosis como infección.
- II. La paracoccidiodomicosis (enfermedad).
 - A. Aguda/subaguda o forma juvenil
 - Moderada
 - Severa
 - B. Forma crónica (adulta)
 - Leve
 - Moderada
 - Severa
- III. Forma residual o secuelas

8.1. La paracoccidiodomicosis como infección

Esta manifestación se presenta cuando un individuo considerado sano entra en contacto como *Paracoccidioides* spp. y se infecta, pero no presenta manifestaciones clínicas o, lo que es lo mismo, permanece asintomático. La infección es diagnosticada por una prueba de intradermorreacción positiva para antígenos específicos y en necropsias, donde se encuentran las formas latentes de la enfermedad (173).

8.2. Formas clínicas de la paracoccidioidomicosis

Las formas clínicas de la paracoccidioidomicosis suelen dividirse en dos categorías: las formas juveniles o formas aguda o subaguda y la forma adulta o crónica.

8.2.1. Forma aguda/subaguda (juvenil)

Según la Guía Brasileña para el Manejo de la Paracoccidioidomicosis, la forma juvenil se encuentra en alrededor de 5-25 % de los casos y puede ser más frecuente en ciertas regiones endémicas y en otras regiones nunca ha sido observada. En Brasil, esta forma es común en estados como Maranhão, Minas Gerais, Pará y São Paulo. La incidencia de la PCM parece disminuir en áreas endémicas. Tanto la forma aguda como la subaguda afectan principalmente a niños, adolescentes y adultos jóvenes, ocurre en adultos con edades entre los 30-40 años. Entre la población adolescente la enfermedad tiende a distribuirse de forma uniforme (1).

Esta forma de la enfermedad rápidamente disemina e involucra diversos órganos y sistemas. En términos generales, los pacientes son diagnosticados dentro de las semanas siguientes luego del inicio de los síntomas. La mayoría de los síntomas involucran el sistema retículo endotelial, incluyendo la presencia de linfadenomegalia sea esta local o generalizada; se puede presentar supuración, fistulización y hepatoesplenomegalia. Los síntomas pueden involucrar también formas gástricas, lesiones cutáneas o de mucosas, involucración osteoarticular, y muy rara vez en estos casos hay compromiso pulmonar. Es frecuente que la fiebre, la pérdida de peso y la anorexia acompañen a la forma juvenil (64,99,152,249).

La linfadenopatía intraabdominal puede conglomerarse, lo cual produce masas tumorales que ejercen compresión sobre varios órganos, entre estos el conducto biliar y las asas intestinales. Llama la atención la aparición de eosinofilia dentro de los hallazgos de laboratorio, la cual se presenta entre el 30 al 50 % de los casos. En algunos casos se ha observado una eosinofilia mayor al 70 % en la sangre periférica (1,169,318).

La evolución de la forma juvenil es de corta duración, progresión rápida, debilitamiento, con desarrollo de astenia, anorexia, intensa pérdida de peso con caquexia,

linfadenomegalia difusa con necrosis y supuración, abscesos cutáneos e intraabdominales, fístulas cutáneas con drenaje de material purulento, áreas extensas de destrucción cutánea, osteomielitis, ulceración intestinal, hepatoesplenomegalia e hipo o aplasia medular (318).

La linfadenomegalia abdominal puede formar masas abultadas que comprimen las estructuras y determina varios síndromes clínicos como la obstrucción biliar (colestasis), la pancreatitis, obstrucción del conducto torácico, pielonefritis y nefritis con fallo renal agudo, malabsorción y síndrome de abdomen agudo. Es poco frecuente la afectación de mucosas y pulmones (319).

La figura 19 muestra algunas fotografías de manifestaciones clínicas de la PCM aguda/subaguda o juvenil en niños y adultos.



Figura 19. Manifestaciones clínicas de la PCM juvenil en niños y adultos.

Se muestran fotografías de pacientes con PCM aguda/subaguda o juvenil en niños y adultos. **En niños (arriba):** **A.** Absceso frontal y claviclar. **B.** Abscesos linfáticos. **C.** Linfadenomegalia inguinal. **D.** Ascitis y hepatoesplenomegalia. **En adultos (abajo):** **A.** Masas ganglionares supraclavicular, cervical y submandibular. **B.** Linfadenomegalia en región cervical. **C.** Lesiones ulcerativas verrugosas en la cara y orejas. **D.** Lesiones papulonodulares ulcerativas. Tomado de Shikanai-Yasuda *et al.* 2017(1).

8.2.2. *Forma crónica (adulto)*

Alrededor de 74 al 96 % de los pacientes con PCM presentan la forma crónica. Esta se manifiesta principalmente en adultos entre los 30 a los 60 años (razón 22:1). La PCM crónica inicia de forma lenta y los síntomas persisten entre 4-6 meses a un año. En algunos casos la PCM se desarrolla sin signos y la infección es reconocida cuando la persona acude a un examen médico general. En alrededor de 90 % de los pacientes con PCM, se puede observar daño pulmonar. Después de los pulmones, los órganos más afectados por esta enfermedad son las mucosas y la vía aerodigestiva superior y la piel (1,156,318).

La PCM crónica puede ser clasificada en leve, moderada o severa. Los casos severos son definidos cuando se encuentran tres o más de los siguientes criterios (1):

1. Pérdida de peso que sea mayor al 10 % del peso habitual.
2. Involucración pulmonar intensa.
3. Involucración de otros órganos como glándulas adrenales, sistema nervioso central y hueso.
4. La presencia de nódulos linfáticos en forma de cadenas de forma superficial o profunda, en forma pseudotumoral con > 2,0 cm de diámetro con o sin supuración.
5. Título alto de anticuerpos.

Muchos de los casos graves se presentan en pacientes con formas severas como insuficiencia respiratoria, disfunción adrenal, síndrome neurológico y abdomen agudo. Las formas moderadas de la enfermedad constituyen una pequeña porción de los casos, transcurren con pérdida de peso de alrededor del 5 % del peso habitual e involucran un único órgano o pocos órganos. Se observan tejidos sin disfunción. En algunos casos, los pacientes pueden presentar manifestaciones clínicas de las formas agudas/subagudas y crónicas, haciendo difícil la clasificación de la enfermedad. La mayoría de estos pacientes presentan una supresión intensa de la inmunidad celular. Esta forma clínica suele llamar como forma mixta de la PCM (99,152,156,318).

Entre las principales manifestaciones clínicas se encuentran la linfadenomegalia cervical posterior, submandibular, supraclavicular, axilar, inguinal e intraabdominal. La forma intraabdominal cursa con abdomen agudo, masas tumorales, ictericia por compresión extra hepática, ascitis quilosa (obstrucción del conducto torácico), pérdida de peso, astenia, hipodinamia, palidez mucocutánea, fiebre y tos, disfonía y odinofagia, disfagia, ardor orofaríngeo, obstrucción nasal, epistaxis y úlceras vegetativas en la región de la boca, la nariz y la garganta (1,156,173,318,320).

En cuanto a las lesiones de piel existen formas muy variadas, con lesiones únicas o múltiples, infiltrado, vegetaciones verrucosas las cuales inicialmente se presentan como pápulas, placas, nódulos, vegetaciones o úlceras. La presencia de lesiones vegetativas es frecuente, estas se manifiestan con dolor en la cavidad oral, la lengua, los labios y las mejillas; dolor nasal, dolor faríngeo y laríngeo con adenopatías satélites. La consistencia de estas lesiones es usualmente dura, debido a la fibrosis y al proceso granulomatoso crónico que caracterizan esta forma de la enfermedad (64,318).

En la figura 20 se observan algunas manifestaciones clínicas de la PCM crónica o adulta.

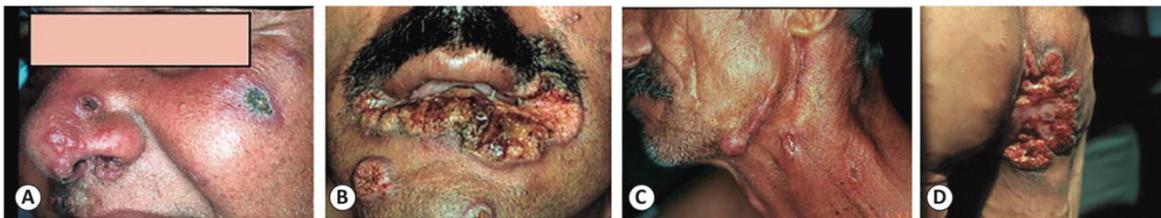


Figura 20. Manifestaciones clínicas de la PCM crónica o adulta.

Se muestran fotografías de pacientes con paracoccidiodomicosis crónica o adulta. **A.** Lesiones papulonodulares ulcerativas en la cara. **B.** Lesiones periorales y en el mentón. **C.** Nódulos linfáticos cervicales y submandibulares con fístulas. **D.** Lesión vegetativa con bordes irregulares en la región perianal. Tomado de Shikanai-Yasuda *et al.* 2017 (1).

8.2.3. Forma residual

Las formas residuales, también conocidas como secuelas, son manifestaciones clínicas tanto anatómica como funcionalmente que se observan después del tratamiento

contra la PCM. Las secuelas son observadas en múltiples órganos, pero tienen una alta incidencia en pulmones, piel, laringe, tráquea, glándulas adrenales, mucosa superior del tracto respiratorio, sistema nervioso central y sistema linfático. De esta manera se explica la heterogeneidad las manifestaciones clínicas (1,320).

9. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LA PCM

Los diagnósticos diferenciales de la PCM son muy variados debido a los signos y síntomas que presenta la enfermedad. Además, histopatológicamente comparte imágenes muy semejantes con otras enfermedades como la tuberculosis y la sarcoidosis que se diagnostican con gran frecuencia alrededor del mundo (321).

Dentro de los diagnósticos a considerar se presentan enfermedades infecciosas causadas por otros hongos causantes de micosis sistémicas como blastomicosis, coccidioidomicosis e histoplasmosis (322). Asimismo, las enfermedades causadas por hongos oportunistas como la criptococosis y micosis subcutáneas como la cromoblastomicosis, la esporotricosis y la lacaziosis deben descartarse (14,152).

Otras enfermedades de origen infeccioso bacteriano también deben ser valoradas, como es el caso de las osteomielitis y las infecciones pulmonares (56,323). Debemos citar la leishmaniasis, uno de los diagnósticos diferenciales más importantes en nuestro medio (324). Adicionalmente, se deben considerar enfermedades no infecciosas, como las enfermedades oncohematológicas y aquellas de origen inmunológico, como el lupus y la enfermedad de Wegener (321,325).

La agrupación de los diferentes diagnósticos diferenciales de la PCM puede realizarse también tomándose en consideración el sitio anatómico donde se encuentran las lesiones, siendo estas mucocutánea, ganglionar o visceral (10).

9.1. Lesiones mucocutáneas

Las lesiones mucocutáneas suelen ser dolorosas, con infiltrado y ulceración. Aparecen en diferentes zonas del cuerpo como la nariz, la lengua, la conjuntiva, los párpados, la laringe y nasofaringe, y suelen ser muy polimórficas (10). Entre los diagnósticos diferenciales de la PCM más importantes en nuestro medio podemos citar la leishmaniasis, el carcinoma epidermoide y la tuberculosis cutánea, además de otras micosis como la esporotricosis y la lacaziosis (321). En la figura 21 se pueden observar lesiones

mucocutáneas diagnosticadas erróneamente como las enfermedades previamente citadas y que corresponden en realidad a lesiones causadas por la PCM.

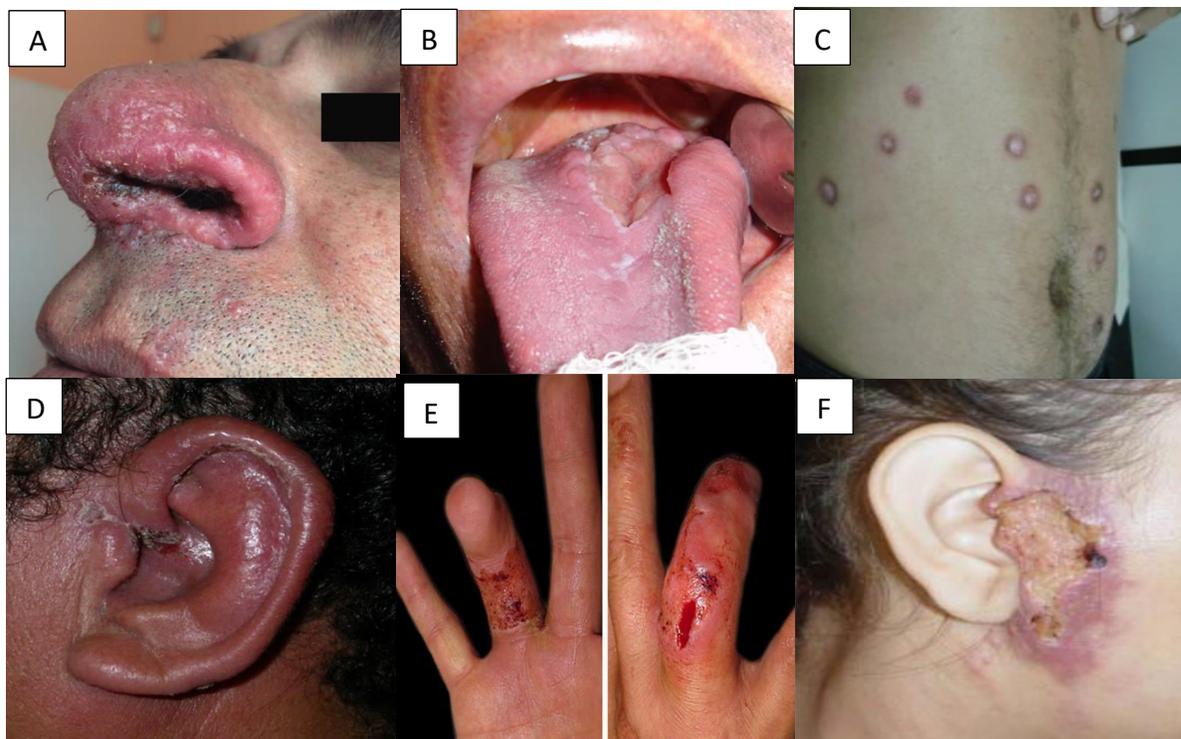


Figura 21. Diagnósticos diferenciales de la PCM mucocutánea.

Se presentan lesiones mucocutáneas y los diagnósticos inicialmente atribuidos, todos diagnósticos diferenciales de la PCM. (A) leishmaniasis (B) carcinoma epidermoide (C) tuberculosis cutánea (D) lacaziosis (E) esporotricosis (F) enfermedad de Hansen. Todos los casos presentados corresponden a lesiones de PCM. Tomado de Pedreira *et al.* 2014; Araújo *et al.* 2012; Sambourg *et al.* 2014; de Macedo *et al.* 2019; Marques *et al.* 2008; y da Costa *et al.* 2002 (326–331).

9.2. Lesiones linfáticas o ganglionares

Las lesiones linfáticas o ganglionares suelen iniciar como un único nódulo cervical y suele diseminarse hacia la zona submaxilar, preauricular y supraclavicular. Cuando los nódulos son excesivamente voluminosos se dice que son de apariencia de cuello de búfalo. Las lesiones a nivel ganglionar pueden ser generalizadas o localizadas. (10). Entre los diagnósticos diferenciales de esta presentación de la PCM, podemos citar la tuberculosis subcutánea o escrofuloderma, la coccidioidomicosis y la bartonelosis, entre otras (321). En la figura 22 se pueden observar lesiones linfáticas o ganglionares diagnosticadas

erróneamente como algunas de las enfermedades previamente citadas y que corresponden en realidad a lesiones causadas por la PCM.



Figura 22. Diagnósticos diferenciales de la PCM linfática o ganglionar.

Las linfadenopatías asociadas a PCM suelen presentarse en conjunto con lesiones a nivel mucocutánea, óseo y en las formas diseminadas. Se presentan linfadenopatías y los diagnósticos inicialmente atribuidos, todos diagnósticos diferenciales de la PCM. (A) Toxoplasmosis (B y C) Bartonelosis. Los casos presentados corresponden a lesiones de PCM. Tomado de Ureta *et al.* 2019 y Peña *et al.* 2018 (332,333).

9.3. Involucración pulmonar

La PCM a nivel pulmonar puede simular otras patologías que son más frecuentes, sean estas o no de origen infeccioso. Esto sumando a su baja prevalencia hacen que la PCM pulmonar no se considere un diagnóstico diferencial primario (334). En términos generales, suelen presentarse síntomas como la tos con expectoración, pérdida de peso, disnea y fiebre. Las bases pulmonares son las que sufren más afectación y es aquí donde forman los granulomas (335). Entre los principales diagnósticos diferenciales podemos citar las infecciones bacterianas, incluida la tuberculosis, y las micosis sistémicas endémicas (321). En las figuras 23 y 24 se pueden observar imágenes de involucramiento pulmonar, lesiones diagnosticadas erróneamente como algunas de las enfermedades previamente citadas y que corresponden en realidad a lesiones causadas por la PCM.

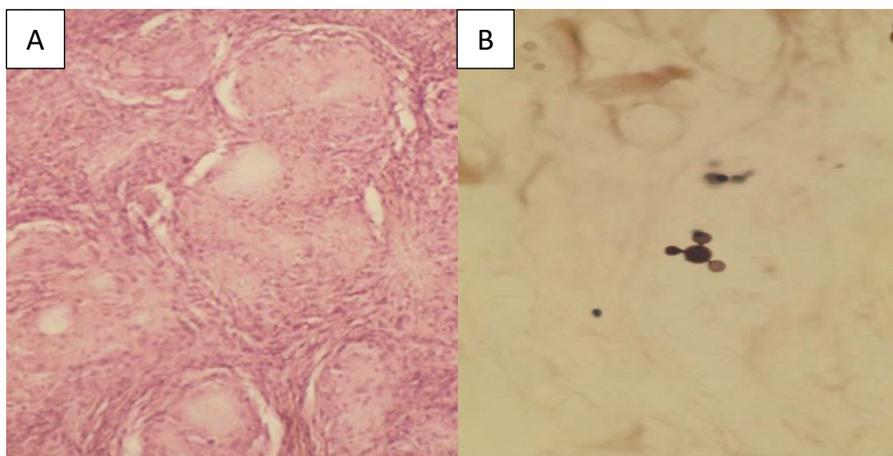


Figura 23. Histopatología de los diagnósticos diferenciales de la PCM pulmonar.

Reporte de casos diagnosticados en primera instancia como sarcoidosis por la reacción granulomatosa observada, posteriormente se rectifica el diagnóstico a PCM. Nótese en (A) los agregados de granulomas no necrotizantes que remplazan el parénquima pulmonar (H&E, 200x). En (B) levadura multigemente característica de *Paracoccidioides* spp. (Grocott, 200x). Tomado de Coelho *et al* 2016 (336).

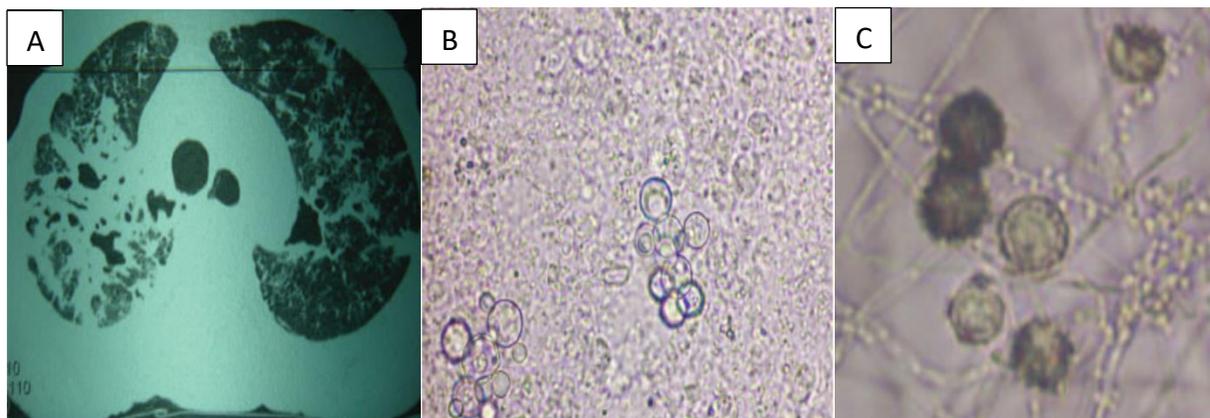


Figura 24. Diagnóstico diferencial de PCM con fibrosis pulmonar y coinfección por histoplasmosis.

El paciente se diagnosticó inicialmente con tuberculosis de manera presuntiva. En (A) TAC torácico, se observa fibrosis y condensación pulmonar bilateral, subpleural y múltiples cavidades. En (B) levaduras multigementes características de *Paracoccidioides* spp. en una muestra de lavado broncoalveolar (BAL), 400x. En (C) cultivo del BAL se observan macroconidias tuberculadas de *H. capsulatum*, 400x. El diagnóstico definitivo correspondió a una coinfección de *Paracoccidioides* spp. con *H. capsulatum*. Adaptado de Torres Esteche *et al.* 2012 (337).

9.4. Involucración ósea y formas viscerales diseminadas

Las lesiones óseas en la PCM se han descrito con menor frecuencia, generalmente son parte de un cuadro clínico multisistémico (338). Por otra parte, las lesiones diseminadas se presentan con fiebre, pérdida de peso, anorexia y presentan la tríada de afección pulmonar, de mucosas y de piel. Las lesiones pueden involucrar sistema nervioso central, huesos, articulaciones, ojos, glándulas suprarrenales y tracto gastrointestinal, entre otros órganos. La secuela más común es la fibrosis de los órganos involucrados, principalmente a nivel pulmonar (10). En las figuras 25, 26, 27 y 28 se pueden observar imágenes de involucración ósea o formas viscerales diseminadas, lesiones diagnosticadas erróneamente y que corresponden en realidad a lesiones causadas por la PCM.

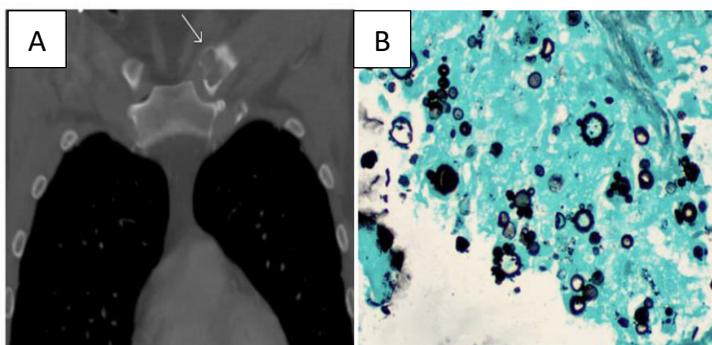


Figura 25. Diagnósticos diferenciales de la PCM con involucramiento óseo.

Paciente con antecedentes de linfoma de Hodgkin. En (A) se observa imagen de tomografía computarizada, donde se evidencia el compromiso óseo a nivel clavicular. Se sospecha inicialmente de recurrencia del linfoma. En (B) biopsia de lesión a nivel clavicular donde se observan las levaduras en “rueda de timón” diagnosticándose así la PCM, 200x. Adaptado de Ghani *et al.* 2018(339).



Figura 26. Diagnóstico diferencial de PCM en una esplenomegalia masiva.

Se diagnostica al paciente con síndrome hipereosinofílico con esplenomegalia. El exudado del bazo se cultiva posteriormente en medio Fava-Neto, se identifica al agente causal por PCR como *P. brasiliensis*. Tomado de Marques de Macedo *et al.* 2016 (340).

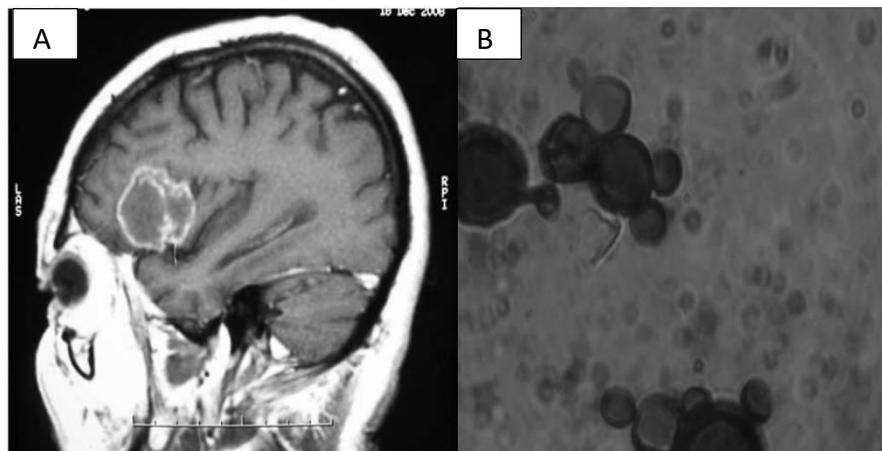


Figura 27. Diagnóstico diferencial de neuroparacoccidioidomycosis.

El paciente fue inicialmente diagnosticado con tuberculosis cerebral. En (A) se observa una resonancia magnética en corte sagital, donde se observa una extensa lesión hipodensa localizada en el lóbulo frontal derecho. (B) Material obtenido de la lesión cerebral donde se observan levaduras compatibles con *Paracoccidioides* spp. Tomado de Corti *et al* 2010 (341).

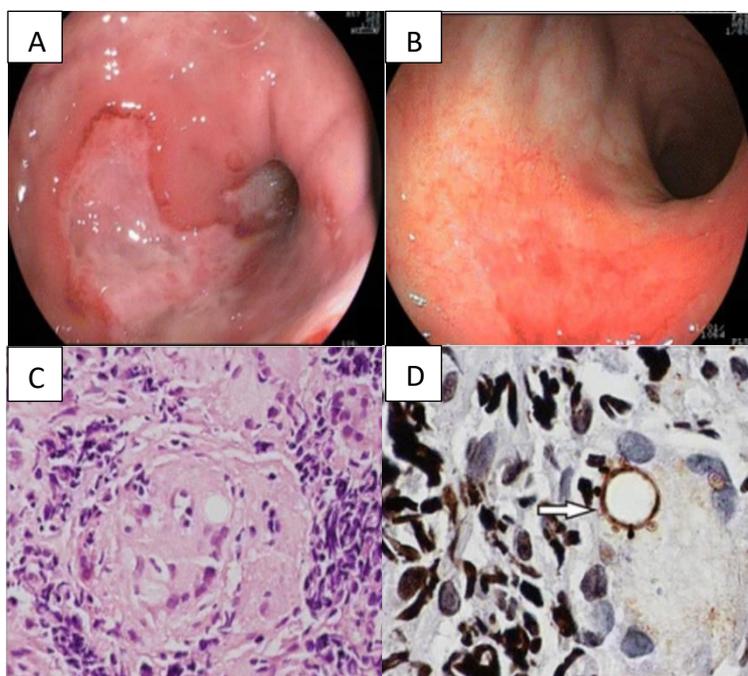


Figura 28. Diagnóstico diferencial de PCM en caso con involucración gastrointestinal.

Paciente inicialmente diagnosticado con enfermedad de Crohn. En (A) Imagen de colonoscopia. Nótese la lesión larga y profunda en la mucosa. (B) Seguimiento de la lesión, luego del tratamiento, mostrando franca mejoría. (C) Biopsia donde se aprecia la inflamación crónica de la mucosa con granulomas no caseosos,

H&E, 400x. (D) Estructuras fúngicas gemantes, compatibles con *Paracoccidioides* spp. Grocott, 1000x. Adaptado de Lomazi *et al.* 2018 (342).

9.5. Resumen de los diagnósticos diferenciales de la PCM

En el cuadro 3, se presentan una serie de casos publicados de los que se recopiló la información correspondiente a la descripción del cuadro clínico de forma breve, el tipo de muestra que se obtuvo y la técnica o las técnicas de laboratorio por la cual se obtuvo el resultado de la PCM. La agrupación de los diagnósticos diferenciales se hizo de acuerdo con el tipo de muestra obtenida para realizar el diagnóstico, comenzando de las lesiones más superficiales y terminando con las más profundas.

Es importante destacar que, en cuanto a la historia clínica de los casos, sobresale información como la incidencia mayor en adultos masculinos y que se dan las relaciones epidemiológicas conocidas: vivir en zona rural, consumo excesivo de alcohol y tabaquismo, trabajo en labores agrícolas, contacto con armadillos o viajes a zonas endémicas. Lo anterior correlaciona con lo descrito en la literatura (1,10,120,321).

Además, es importante destacar el reporte de casos en pacientes con inmunocompromiso por HIV y otras enfermedades inmunosupresoras como los linfomas y las coinfecciones con agentes fúngicos y no fúngicos. Una vez más, destaca la importancia de tener un conocimiento amplio sobre estos diagnósticos diferenciales, para así contar con el conocimiento necesario para sospechar de esta enfermedad micótica e identificar al agente etiológico de la PCM, pero también es importante ser de apoyo al médico para diagnosticar los agentes de otras micosis y en general de las enfermedades que pueden detectarse desde las actividades del laboratorio clínico.

Cuadro 3. Resumen de los diagnósticos diferenciales de la PCM

Diagnóstico diferencial	Presentación	Muestras	Pruebas realizadas (positivas)	Referencia
Coccidiomicosis cutánea	Masculino con lesiones pápulo costrosas de bordes eritematosos. 2 meses evolución	Biopsia de lesión	Examen directo y Grocott	(343)
Esporotricosis	Masculino, presenta lesión en dedo, 1 año de evolución. Fumador, ingiere alcohol, cazador de armadillos.	Biopsia de piel cuarto dedo mano derecha	Examen directo, PAS e ID	(330)

Diagnóstico diferencial	Presentación	Muestras	Pruebas realizadas (positivas)	Referencia
Lacaziosis	Masculino con lesión eritematosa en pabellón de la oreja	Biopsia pabellón oreja	Grocott, H&E, Giemsa	(329)
Cromoblastomicosis	Masculino con pérdida de peso, lesiones exofíticas, verrugosas, algunas ulceradas e indoloras. Nódulos subcutáneos en el pie derecho. Se diagnóstica con HIV al ingresar al centro de salud.	Raspado de lesiones de los codos y biopsia de piel	PAS, Grocott, ID, CIE	(344)
Tuberculosis cutánea	Lesiones ulcerativas y diseminadas, afectación laríngea, faríngea, testicular y miembros inferiores	Muestras de piel	Grocott, H&E	(328)
Leishmaniasis	Masculino con placas eritemato costrosas, asintomáticas en ala nasal izquierda, labio superior, mentón y parte superior del tronco. Lesión localizada en encía superior.	Biopsia piel	PAS y H&E	(326)
HIV	Masculino francés presenta lesiones crónicas nodulares en lengua y linfadenopatía mandibular. Abusa de drogas	Biopsia lingual	Grocott	(345)
Sífilis	Mención de casos pacientes con ulceración oral, tratados erróneamente como sífilis	No se menciona	No se menciona	(13)
Enfermedad de Hansen	Femenina 19 años lesiones en piel compatibles con lepra tuberculosa. Fiebre, pérdida de peso, hipertrofia de nódulos linfáticos	Biopsia de piel	Grocott, H&E	(331)
Nocardiosis	Presentación de casos donde la <i>Nocardia</i> sp. es diagnóstico diferencial de PCM cutánea	Biopsia de piel	No se indica	(346)
Carcinoma de células escamosas	Masculino con lesión ulcerativa del dorso de la lengua.	Biopsia	Grocott	(327)
Carcinoma epidermoide	Masculino, lesión paladar blando y trigono molar	Biopsia	Grocott, H&E	(59)
Carcinoma laríngeo	Disfonía progresiva en agricultor venezolano Infiltrado difuso, edema con ulceración.	Biopsia de lesiones	Grocott. No se observa malignidad	(347)
Lupus vulgaris	Caso ocurre en Italia. Masculino con placas ulcerativas malares	Biopsia de la lesión	Grocott	(348)
Coccidioidomicosis	Niño de 9 años con poli adenopatía y masa retroperitoneal	Biopsia de ganglio cervical	Grocott	(349)
Infecciones bacterianas	Niña con lesión ósea en el calcáneo tratada como osteomielitis bacteriana	Biopsia de lesiones en piel y nódulos linfáticos	H&E	(350)

Diagnóstico diferencial	Presentación	Muestras	Pruebas realizadas (positivas)	Referencia
Cisticercosis	Masculino con vértigo, diplopía, periodontitis crónica generalizada. Lesiones en paladar. Tac de cráneo: imagen nodular hiperdensa	Biopsia de lesiones	Grocott	(351)
Bartonelosis	Masculino que presenta adenopatía, infiltrado alveolointerstitial y lesión palpebral con síndrome oculoglandular de Parinaud.	Biopsia de ganglio y lesión palpebral	Grocott	(332)
Tuberculosis pulmonar	Pacientes sintomáticos respiratorios	Suero	Western blot	(352)
Cáncer de pulmón	Paciente masculino, fumador, anorexia, pérdida de peso, masas pulmonares	Biopsia de las lesiones pulmonares	Grocott	(353)
Fibrosis pulmonar	Masculino fumador. Eritema polimorfo disseminado, fibrosis pulmonar bilateral y extensa	BAL	Giemsa, Grocott	(337)
Criptococosis	Paciente con HIV. Niega actividades rurales. Nódulos cervicales, hepatoesplenomegalia, consolidación pulmonar	Aspiración de absceso de la pleura parietal	Examen directo de absceso y esputo	(354)
Sarcoidosis	Enfermedad pulmonar crónica (granulomas sarcoideos) y formas disseminadas post tratamiento inmunosupresor	Biopsias de pulmón	Grocott, H&E	(336)
Enfermedad granulomatosa de Wegener	Enfermedad pulmonar con ANCA-c positivo, negativo luego de remisión de PCM	Biopsia pulmón	Grocott, FC	(325)
Histoplasmosis disseminada	Fiebre, pérdida peso, osteopenia	Aspirado médula ósea	Grocott, ID	(355)
Blastomicosis	Niño de 10 años con dolor en femoral y rodilla derecha, con masa palpable en la región inguinal. Se observa destrucción de hueso	Biopsia de hueso, nódulo cervical, esputo	Grocott, H&E	(356)
Enfermedad de Hodgkin	Masculino con historial de linfoma de Hodgkin, con masa clavicular	Biopsia	Grocott, H&E	(339)
Toxoplasmosis	Embarazada con HIV. Inflamación granulomatosa ocular del ojo derecho y lesión cerebral. PCR para <i>Toxoplasma gondii</i> positiva	Biopsia del ojo y de orofaringe	Biopsia ocular: PAS, Grocott	(357)
Tuberculosis cerebral	Deterioro cognitivo. Paciente diagnosticado por PCM y TB con anterioridad.	Material del absceso: biopsia cerebral	Examen directo	(341)

Diagnóstico diferencial	Presentación	Muestras	Pruebas realizadas (positivas)	Referencia
Carcinoma hepático	Nódulos de fleo hepático e ictericia	Fluido purulento de fleo hepático	Grocott	(358)
Síndrome de hipereosinofilia con esplenomegalia	Dolor abdominal, fiebre, pérdida de peso. Eosinofilia 72 %.	Biopsia de médula ósea y muestras de bazo	H&E, ID, PCR	(340)
Enfermedad suprarrenal	Masculino con antecedentes de EPOC, presenta disminución del cortisol y aumento de la ACTH, masas suprarrenales	Biopsia	Grocott	(359)
Cáncer de colon	Enterroragia con pérdida de peso, lesiones papulares y nódulos linfáticos, lesión en cavidad oral	Raspado de lesión oral y biopsia del colon	Examen directo, Grocott	(360)
Enfermedad de Crohn	Joven masculino 13 años con náuseas, diarrea y pérdida de peso. Imagen colonoscópica sugiere enfermedad de Crohn	Biopsia de colon	Grocott, H&E	(342)
Cáncer de próstata	Masculino de zona rural. Antecedentes de PCM oral. Aumento de la próstata e induración	Biopsia prostática	Grocott, H&E	(361)

ID: inmunodifusión; CIE: contraelectroforesis; BAL: lavado broncoalveolar; FC: fijación del complemento; H&E: hematoxilina-eosina; PAS: tinción de ácido peryódico de Schiff.

Elaboración propia, adaptado de las referencias citadas en el cuadro.

10. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA PCM

10.1. Diagnóstico micológico

10.1.1. Fase preanalítica

Diversas son las muestras que pueden obtenerse para el estudio de la PCM: piel, exudado, esputo, lavado bronquial, líquido cefalorraquídeo (LCR), médula ósea, hueso, muestras ganglionares y viscerales (14). Puede llevarse a cabo un raspado de la lesión con bisturí con filo o la técnica de cinta (con cinta adhesiva transparente) para el diagnóstico de la PCM cuando se manifiesta de forma cutánea (10).

En el caso de las biopsias, por punción o aspirado con aguja fina, deben de trasladarse al laboratorio en solución salina fisiológica. No deben aceptarse muestras en agua ni tampoco en formalina, si se desea cultivar. El tejido debe manipularse con bisturí o tijeras especiales, en función del tamaño del espécimen. La muestra no debe macerarse ya que puede afectar las estructuras fúngicas, por lo tanto no se recomienda el uso de morteros ni pistilos de ningún tipo (362,363). Si el material es suficiente, las biopsias deben fragmentarse en tres: una parte debe ser preservada en formalina al 10 % para estudios histopatológicos, otra para el cultivo en agar Sabouraud y agar Mycosel y una última porción para el examen directo con KOH al 10-20 % (364).

En el caso de muestras provenientes de un absceso o escamas de piel, no es necesario realizar un tratamiento previo de las mismas, estas pueden examinarse directamente entre porta- y cubreobjetos. Fluidos corporales como esputo, lavado broncoalveolar y líquido cefalorraquídeo (LCR) deben ser centrifugados y analizar posteriormente el sedimento (363).

10.1.2. Examen directo

En términos generales, para el examen directo de las muestras se utiliza hidróxido de potasio del 10 al 20 %, aunque también puede utilizarse hidróxido de sodio al 4 %, para observar la muestra entre lámina y cubreobjetos. Adicionalmente, puede visualizarse la muestra con microscopio de fluorescencia utilizando blanco de calcoflúor (10). También se

menciona el uso de solución de lugol, tinción de Gram, los derivados de Romanowsky como Giemsa, Wright y Leishman para la visualización del examen directo (1,14). Se observan levaduras multigemantes, estructuras que contienen una célula madre de pared gruesa y refringente, de forma esférica, oval o elíptica (61). El diámetro de dicha célula madre oscila entre los 3-30 μm de diámetro e inclusive puede alcanzar los 60 μm ; se observan múltiples levaduras hijas gemando alrededor de la célula madre, el número de las mismas puede variar desde 2 a más de 12 (14). La observación de las levaduras multigemantes es patognómica de la infección por este hongo (1,14,121).

Las levaduras multigemantes pueden presentarse en diferentes conformaciones. Así por ejemplo, si se encuentran múltiples levaduras alrededor de la célula madre estas simulan una “rueda de timón”; cuando se observan 2 o 3 gemas en un polo estas asemejan la “huella de oso”, o pueden observarse solo dos en cuyo caso asemejan según diversos autores las orejas del “ratón Miguelito o Mickey Mouse” (10,14). También pueden observarse levaduras

en cadenas (365). Estas conformaciones pueden observarse en la figura 29.

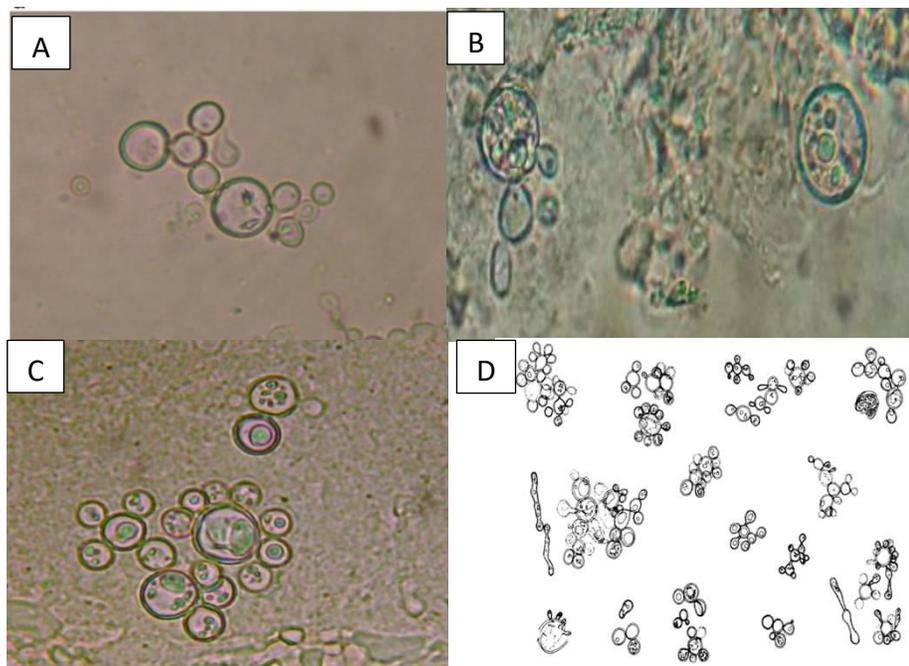


Figura 29. Levaduras multigemantes en examen directo positivo por PCM

(A-C) Diferentes conformaciones que pueden observarse al examen directo. (D) Esquema que ilustra la variedad de formas en las cuales pueden encontrarse las levaduras multigemantes de *Paracoccidioides* spp. Adaptado de Niño-Vega *et al.* 2017; Franco *et al.* 1993; y Araújo López *et al.* 2016 (64,169,366).

10.1.2. Cultivo de *Paracoccidioides* spp.

Los cultivos de este hongo dimórfico son de crecimiento lento, las formas iniciales maduran alrededor de los 21 días. A temperaturas entre 25 y 30 °C la colonia es blanca, plegada, compacta, en ocasiones glabra o puede observarse con una pequeña capa de micelio aéreo blanco que puede tornarse marrón con el tiempo. El reverso puede ser claro o cafezusco-marrón (61,323,363,367). Se observa crecimiento tanto en agar Sabouraud como en agar mycosel (363). A temperatura de 37 °C en agar infusión cerebro corazón u otro agar que sea enriquecido, la colonia se vuelve prominente, levantada, de color crema a tonalidad oscura, húmeda y suave que va tomando un aspecto ceroso semejante a una colonia levaduriforme (61,368). Lo anterior puede visualizarse en la figura 30.

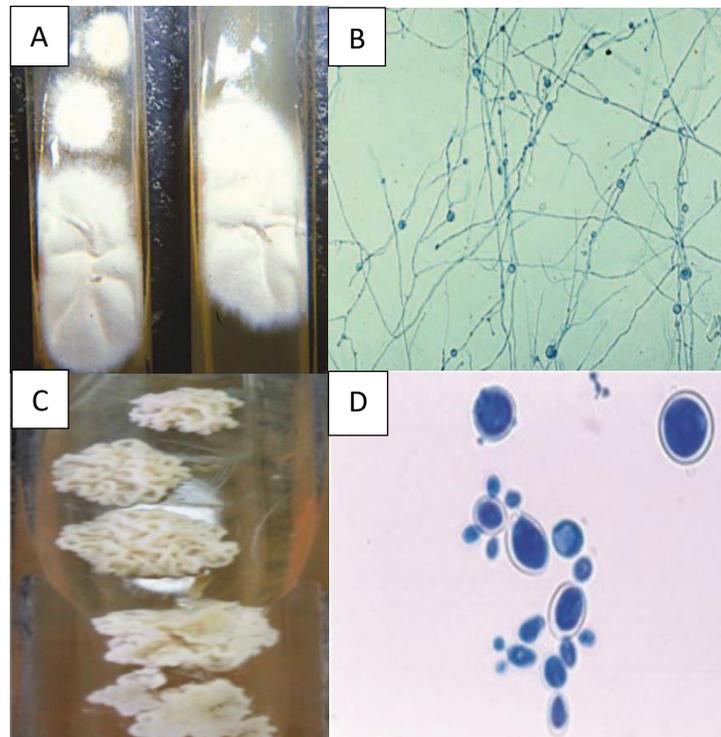


Figura 30. Cultivos en medios sólidos a temperaturas de 25-30 °C y a 37 °C de *Paracoccidioides* spp.

(A-B) Cultivo en forma micelial, a 25-30 °C, y su respectiva observación microscópica. (C-D) Cultivo en forma levaduriforme, a 37 °C, y su respectiva observación microscópica. Tomado y adaptado de Bonifaz 2012 y Araújo López *et al.* 2016 (14,366).

Además del cultivo común en medios generales como agar glucosado de Sabouraud o agar Mycosel, se describe el uso de otros medios enriquecidos. Entre ellos podemos citar el agar Kelley, el agar Pine y el agar Fava-Neto (64,366,369). Con respecto al agar Kelley, está conformado por componentes ricos como el extracto de res, solución de hemoglobina y bactopectona (370). El agar Pine es un medio altamente enriquecido, utilizado también para el cultivo de *H. capsulatum*, y está formado por siete soluciones diferentes que incluyen sales, caseína hidrolizada, 7 vitaminas entre que se pueden citar la riboflavina, biotina y la tiamina; además tiene hemina y coenzima A (371). Por último, el agar Fava-Neto se prepara con proteasa, peptona, dextrosa, y extractos de carne y de levadura (366,372). Este puede ser preparado de forma semisólida para el desarrollo de las células levaduriformes, el crecimiento se observa entre el sexto y el noveno día de incubación (372). En términos generales estos medios tan ricos son utilizados para la inducción del dimorfismo (micelio a levadura) (169). En el cuadro 4 se puede repasar la composición de los medios citados.

Cuadro 4. Composición de los medios Fava Neto, Kelly y Pine.

Tipo de constituyente	Agar Fava Neto	Agar Kelly	Agar Pine
Carbono y energía	Dextrosa	Glucosa Bactopectona	Caseína Ácido cítrico
Fuente de nitrógeno	Proteasa peptona Peptona Extracto de carne Extracto de levadura	Extracto de res	Ácido cetoglutámico Asparagina L- triptófano
Fuentes de minerales	Cloruro de sodio	Cloruro de sodio	Solución sales 1: KH ₂ PO ₄ , (NH ₄) ₂ SO ₄ , MgSO ₄ , CaCl ₂ , ZnSO ₄ Solución de sales 2: FeSO ₄ , MnCl ₂ , Na ₂ MoO ₄ , HCl
Otros		Solución de hemoglobina	Solución 4: Inositol, Hidrocloruro de tiamina, Pantetonato de calcio Riboflavina, Nizonamida, Biotina Solución 5: Hemina Solución 6: Ácido DL- tióctico, Glutación reducido
pH	7,2 -7,4	No se indica	6,5

Tomado de Franco *et al.* 1993; Araújo López *et al.* 2016; Chakrabarti *et al.* 2008 (169,366,371).

Cabe destacar, que por la composición de estos medios los mismos pueden considerarse como medios enriquecidos y no tienen componentes que los hagan diferenciales o selectivos.

Los cultivos más útiles para el diagnóstico son aquellos que se incuban a 37 °C ya que presentan la forma patognomónica de la enfermedad. Como se mencionó anteriormente, a temperaturas de entre 35-37 °C, en medios sólidos enriquecidos, como el agar infusión cerebro corazón, se pueden observar las células levaduriformes de gran tamaño, redondas, de paredes gruesas con uniones simples y estrechas con las células hijas, que se encuentran en número variable alrededor de la célula madre y poseen un diámetro de 2-10 μm (61,363).

De 25 a 30 °C, se forman por lo general solo hifas ramificadas y septadas, con presencia de clamidosporas intercalares y terminales. Ocasionalmente pueden observarse algunas microconidias a lo largo de las hifas (10,365). Adicionalmente, se ha descrito que entre *P. brasiliensis* y *P. lutzii* existe una diferencia en el tamaño de las conidias, siendo más alargada la de *P. lutzii* con respecto a las *P. brasiliensis*. Esta diferencia se observa a nivel de microscopía electrónica (121).

Si se ha observado únicamente la fase micelial de este hongo, debe inducirse el dimorfismo para confirmar el diagnóstico (10,363). Para demostrar el dimorfismo se debe tomar una porción del cultivo micelial y realizar un repique en un tubo con tapa que contenga agar cerebro corazón y adicionalmente un poco de caldo de este mismo medio. Se procede a incubar a temperatura de 35 a 37 °C, de ser posible en atmósfera enriquecida con CO₂. Se debe dejar el tubo lo suficientemente cerrado para mantener la humedad del medio y al mismo tiempo permitir el intercambio gaseoso. Se deben hacer montajes microscópicos de forma periódica. Si después de unos días aparece de nuevo la colonia micelial deben realizarse varios pasajes antes de lograr la inducción de la fase levaduriforme. Este procedimiento de siembra siempre debe llevarse a cabo en cámara de bioseguridad (61). Alternativamente pueden utilizarse métodos moleculares para la identificación de especie o métodos de absorción y desorción atómica como el MALDI-TOF (10). En la figura 31 se pueden repasar las morfologías presentadas por cultivos de *Paracoccidioides* spp. en medios ricos en ambos rangos de temperatura citados previamente.

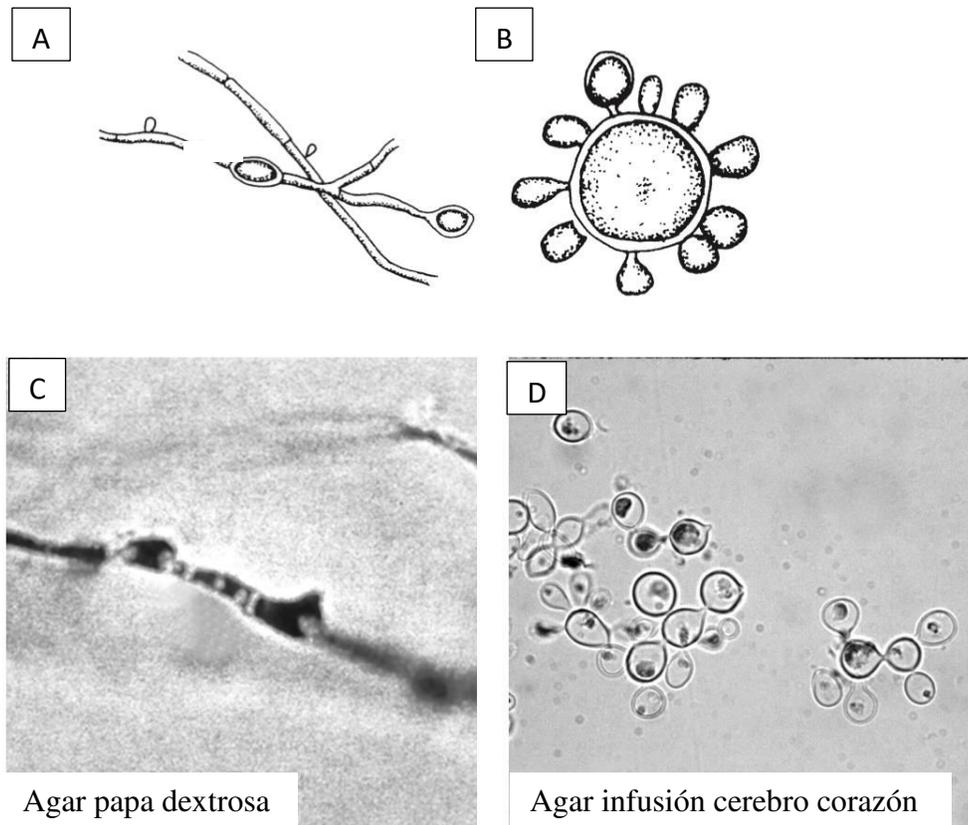


Figura 31. Morfología microscópica de *Paracoccidioides* spp. incubados a diferentes temperaturas. (A y C) corresponden a la forma micelial a temperatura ambiente (25-30 °C). (C y D) A 35-37 °C se observan las formas diagnósticas, las levaduras multigemantes. Adaptado de Walsh *et al.* 2018 (61).

10.2. Diagnóstico histopatológico

La descripción de la morfología de *Paracoccidioides* spp. es la misma que en el caso del examen directo; las diferencias observadas se deben a la naturaleza de cada tinción. Existen al menos tres tinciones para la visualización del hongo en muestras de tejido, las que corresponden a las más ampliamente utilizadas en histopatología para la observación de agentes fúngicos. Entre ellas destacan las tinciones tradicionales como la hematoxilina-eosina (H&E) y las tinciones especiales para la visualización de estructuras fúngicas, como son el Grocott y el PAS.

En la tinción hematoxilina-eosina la pared fúngica se mantiene intacta, el núcleo aparece bien delineado y basófilo (10). En la figura 32 se observan levaduras

multigemantes de *Paracoccidioides* spp. de una misma muestra clínica teñida con hematoxilina-eosina en diferentes aumentos.

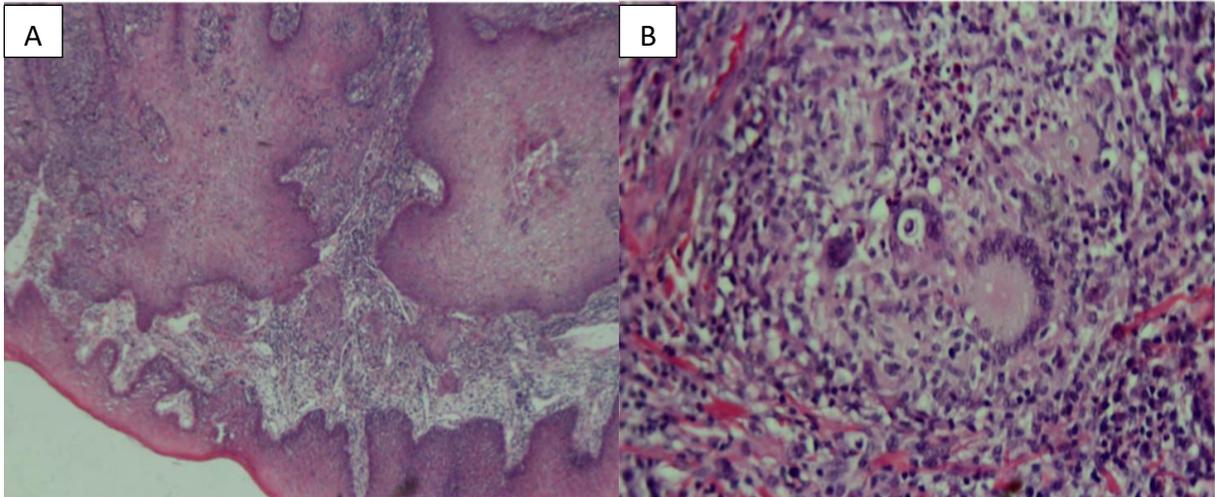


Figura 32. Ulcera de la cavidad oral teñida con hematoxilina-eosina positiva por PCM.

(A) Se observa la hiperplasia pseudoepiteliomatosa de la epidermis (4X). (B) Células gigantes multinucleadas con estructuras sugestivas de levaduras de *Paracoccidioides* spp. (10X). Tomado de Rodríguez & Valverde 2019 (59).

En la tinción de ácido peryódico de Schiff o PAS, el ácido peryódico tiñe estructuras que poseen polisacáridos y mucopolisacáridos que se presentan en la pared de los hongos, y por ende, la pared fúngica se tiñe de rojo (363). Por su parte, en la tinción de Grocott-Gomori, también conocida como tinción de Grocott o tinción de plata de Gomori, los grupos hidroxilo de los polisacáridos son oxidados a aldehídos y se reduce el complejo nitrato de plata-metanamina y por ende la pared fúngica se observa de color café oscuro a negro como resultado de la plata depositada donde se localizan los aldehídos. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de aldehídos presentes en la pared (64, 363). En la figura 33 se pueden observar levaduras multigemantes de *Paracoccidioides* spp. en tinciones histopatológicas teñidas con PAS y Grocott.

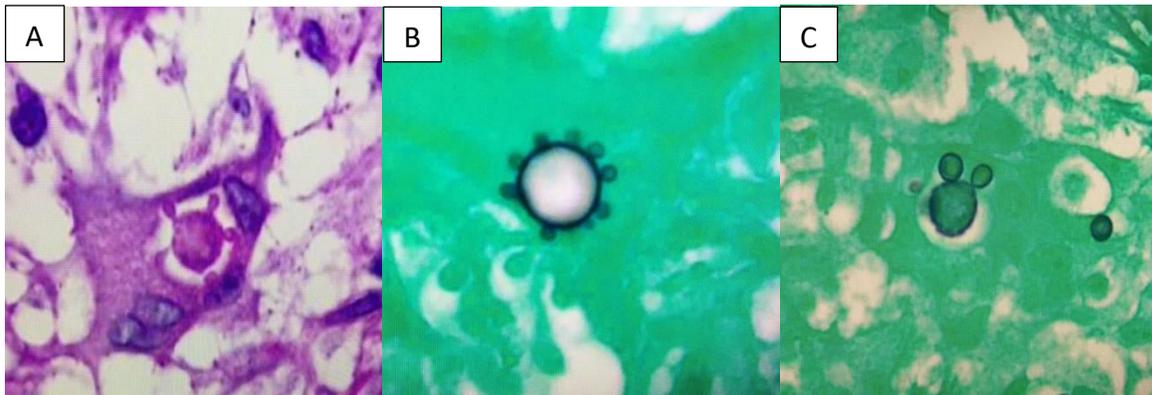


Figura 33. Tinciones especiales para hongos mostrando levaduras multigemantes de *Paracoccidioides* spp. (A) Levadura multigemante observada con una tinción de PAS. (B) Levadura en forma de timón, tinción de Grocott. (C) Levadura multigemante en conformación de orejas de “Mickey Mouse”. Todas las micrografías tienen un aumento de 40X. Fotografías propias de un caso en el Hospital San Juan de Dios, Caja Costarricense del Seguro Social, 2019, sin publicar.

Es importante destacar que, en el caso de la PCM mucocutánea, es común observar de hiperplasia epidérmica con hiperqueratosis, con frecuencia pseudoepiteliomatosa. Hay espongirosis y exocitosis con microabscesos de polimorfonucleares. Se puede visualizar una mezcla de reacción inflamatoria aguda y crónica, con linfocitos, histiocitos células gigantes de cuerpo extraño de tipo Langhans, además se puede observar fibrosis con zonas de necrosis caseosa (373). En los casos de PCM pulmonar se presentan granulomas tuberculoides y en los casos provenientes de la forma aguda, se observa infiltrado linfohistiocitario, sin formación de verdaderos granulomas (14).

10.3. Diagnóstico serológico

En 1916 Moses estudia la fijación de complemento (FC) y se convirtió en un científico pionero al utilizar el inmunodiagnóstico para micosis sistémicas (374). Entre las técnicas de diagnóstico serológico de esta enfermedad, podemos citar la precipitación en tubo, la inmunodifusión en agar, la inmunolectroforesis, la contra electroforesis, la aglutinación en látex, el eritroinmunoensayo, los ensayos de lisis y los ensayos inmunoenzimáticos o ELISAS (365).

En términos generales, los pacientes con PCM no presentan deficiencia en la producción de anticuerpos (375). Alrededor del 90 % de los pacientes los presentan al momento de realizar el diagnóstico (365), además, en los casos de PCM severa diseminada, se da una gran producción de anticuerpos (108). Por esta razón estas pruebas pueden ser utilizadas tanto para el diagnóstico como para el pronóstico y el seguimiento de la evolución del paciente (64, 365, 374).

Es necesario tomar en consideración que en formas severas de la PCM también puede darse una deficiencia en la producción de anticuerpos, tal es el caso, por ejemplo, de los pacientes con HIV en fase SIDA. En este caso el seguimiento de los pacientes con técnicas de detección de anticuerpos no está recomendado (1).

Las pruebas serológicas son de gran importancia tanto para el diagnóstico como para el seguimiento de los pacientes. Pese a la gran utilidad de estos métodos de diagnóstico indirecto, es necesario complementarlos con métodos directos como el examen directo y el cultivo, para así realizar la confirmación del diagnóstico (374). A continuación, se detallan brevemente las pruebas serológicas desarrolladas para el diagnóstico de la PCM.

10.3.1. Intradermorreacción

Pese a haber sido ampliamente empleada hace décadas, en la actualidad, la intradermorreacción tiene un valor limitado para el diagnóstico de la PCM (10, 14), debido al aumento de los pacientes con formas severas de la enfermedad y con problemas de inmunidad o mal estado general de salud, y que por ende, presentan intradermorreacciones negativas (376). Adicionalmente, una prueba positiva indica únicamente el contacto con *Paracoccidioides* spp., y no se puede saber si la infección es activa o pasada (377). Por otro lado, con respecto al antígeno a utilizar, no existe una formulación estándar del mismo, lo cual dificulta la comparación de resultados y su interpretación (10). Además, están descritas reacciones cruzadas con otros hongos causantes de infecciones fúngicas sistémicas como *Histoplasma capsulatum* y *Coccidioides* spp. debido a la presencia de antígenos en común con estos hongos (6,377,378).

Diversos estudios muestran que la intradermorreacción se vuelve positiva durante el tratamiento, lo cual es de buen pronóstico en estos casos. Debido a estas razones se

considera que esta prueba serológica debe utilizarse en los casos en que se haya establecido previamente el diagnóstico de PCM (138). Adicionalmente, se considera que esta prueba es de utilidad en estudios epidemiológicos, para establecer zonas de endemicidad y para detectar casos subclínicos de la enfermedad (378). La intradermorreacción se considera positiva con una zona de induración mayor o igual a 5 mm a las 48 h de inoculación. Si la zona es mayor de 10 mm se considera más específica (378,379).

10.3.2. Fijación del complemento

La fijación del complemento fue la primera técnica indirecta utilizada para el estudio de la PCM. Esta prueba es de gran valor diagnóstico ya que puede ser utilizada de forma cuantitativa. El fundamento básico de esta prueba es sencillo y se basa en que los complejos antígeno-anticuerpo fijan complemento por la vía clásica (252). Una vez que se logra esta interacción, se añade el complemento y un sistema indicador que consiste en eritrocitos de carnero recubiertos de anticuerpos (380).

Para realizar la prueba, se combina una suspensión de antígenos con el suero del paciente. Si en la muestra en estudio existen anticuerpos contra *Paracoccidioides* spp., al añadir el complemento, éste se fijará a los complejos inmunes y por lo tanto, al agregar los eritrocitos sensibilizados, no se producirá la lisis del indicador (381).

En el caso específico del estudio de la PCM, el antígeno de *Paracoccidioides* spp. empleado consiste principalmente en polisacáridos o filtrados del cultivo del hongo, ya sea de la forma micelial o levaduriforme; el antígeno metabólico de la fase levaduriforme es el más utilizado (382).

En la figura 34 se explica brevemente, mediante un esquema, el procedimiento de esta prueba serológica.

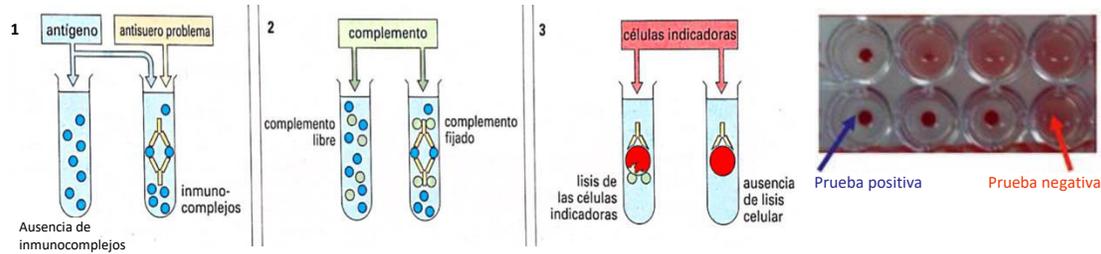


Figura 34. Principio de la prueba serológica de fijación del complemento para el diagnóstico de la PCM.

En presencia de inmunocomplejos, el complemento se fija y se agota. Al agregar las células indicadoras, eritrocitos sensibilizados, si queda complemento libre las células se lisan, y se interpreta como una prueba negativa; si los inmunocomplejos se formaron, el complemento no es suficiente y por tanto los eritrocitos no se lisan y se interpreta como una prueba positiva. Adaptado de Roitt *et al.* 1994 (252).

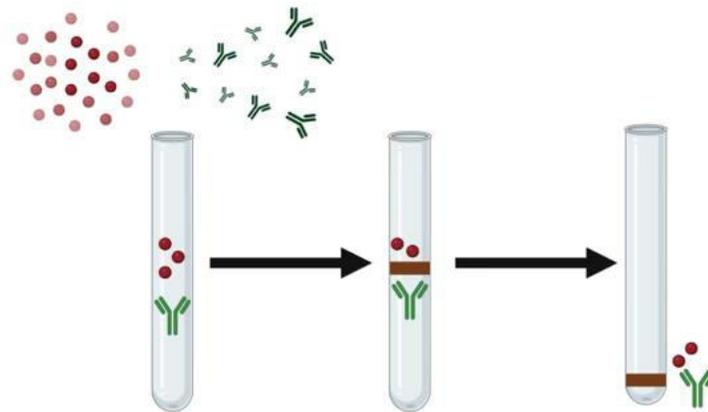
Por su alto valor pronóstico esta prueba puede utilizar para seguimiento de los pacientes, se debe realizar la prueba cada dos meses durante el tratamiento (374). Los títulos de anticuerpos deben estabilizarse en valores bajos o hasta que desaparezcan. Si bien es una técnica con alta sensibilidad su uso es restringido por ser una prueba que conlleva mucho trabajo (374). Por último, debe tomarse en cuenta la reactividad cruzada con los antígenos de *H. capsulatum* (382).

10.3.3. Precipitación en tubo

En esta prueba se utiliza como antígeno un polisacárido de la fase levaduriforme, el anticuerpo que interacciona con el antígeno es de tipo IgM. Esta técnica fue desarrollada por Fava Neto en 1955 (31,383). La técnica de precipitación en tubo fue la primera en desarrollar un antígeno de polisacáridos para una prueba serológica. Para la preparación del antígeno, se obtiene un aislamiento de *Paracoccidioides* spp. en fase levaduriforme, sembrado en botellas de caldo glucosado al 1 %. Este cultivo se trata con perlas estériles y luego se realizan lavados con solución fisiológica. Luego, el sedimento se trata con acetona pura varias veces, finalmente, se adiciona éter sulfúrico. El sedimento se seca durante 1 hora a 37 °C, se suspende en buffer a pH 7,3 ± 0,1 y se autoclava. Finalmente, el antígeno se separa por centrifugación, el sobrenadante se filtra con papel filtro mojado con agua destilada y se adiciona 1/10,000 de mertiolato de sodio como preservante (376).

Ahora bien, para la prueba de precipitación en tubo se emplean tubos perfectamente lavados. Se adiciona la muestra de suero de los pacientes sin diluir, previamente inactivando el complemento incubándola en baño maría a 56 °C por 30 minutos. Luego se adiciona en la misma proporción el antígeno puro preparado como se indicó anteriormente diluido de 1/10 hasta 1/40. Se añade un tubo testigo en el cual el antígeno se reemplaza por medio de cultivo líquido (376).

La lectura se efectúa a los 10 minutos de incubación a 37 °C y se reportan como positivos los tubos en los cuales se forme un anillo en el límite de separación del suero y el antígeno. Luego de la primera lectura se agitan los tubos, y se vuelven a incubar a 37 °C en baño maría, durante 5 días y al final de la incubación se hace la lectura. Se reportan positivos los tubos que presenten la formación un precipitado de complejos inmunes (376).



La figura 35 detalla el fundamento y lectura de esta prueba.

Figura 35. Fundamento de la técnica de precipitación en tubo para el diagnóstico serológico de la PCM.

Suero inactivado del paciente y antígeno de *Paracoccidioides* spp. preparado como indicado, se mezclan en proporciones iguales. Luego de 10 min de incubación, la prueba positiva se determina por la formación de un anillo de complejos inmunes en la interfase de ambos líquidos. Si la prueba es negativa, se mezclan los tubos y se incuban por 5 días a 37 °C, la prueba positiva se determina por la formación de un precipitado de inmunocomplejos. Adaptado de Negroni 1974 (376).

El principal aporte de esta prueba de precipitación en tubo es el diagnosticar la primo infección, en los casos que tienen menos de un año de evolución, ya que detecta

IgM. Esta detección se puede realizar incluso cuando los anticuerpos fijadores del complemento no son detectables (376,384). No es una técnica apropiada para dar seguimiento a la evolución del paciente, sin embargo, en las recaídas esta prueba cobra importancia (385).

10.3.4. Inmunodifusión en agar

La inmunodifusión en agar permite evidenciar el contacto del paciente con *Paracoccidioides* spp., lo cual permite al personal médico tomar decisiones en cuanto las técnicas complementarias que pueden implementarse para confirmar el diagnóstico de la PCM. Esta técnica es útil para el seguimiento de los pacientes con PCM pues no se requieren equipos especializados y su interpretación es sencilla. Se trata de la técnica más utilizada para la detección de anticuerpos antiparacoccidioideos en pacientes con sospecha clínica de la enfermedad (366,374,386).

Se utiliza como antígeno la glicoproteína Gp43 que genera anticuerpos en cerca del 100 % de los pacientes con PCM (387). El fundamento de esta inmunodifusión fue el propuesto por Oudin y Ouchterlony (252). Se enfrentan entonces un suero con anticuerpos y el antígeno soluble que se colocan en pocillos separados en platos con agar, estos van a difundir hacia el exterior del pocillo. En caso de reacción, se forma una línea visible de precipitado en el punto de equivalencia entre los anticuerpos y los antígenos (366).

La figura 36 presenta un esquema de lectura e interpretación de la inmunodifusión en agar.

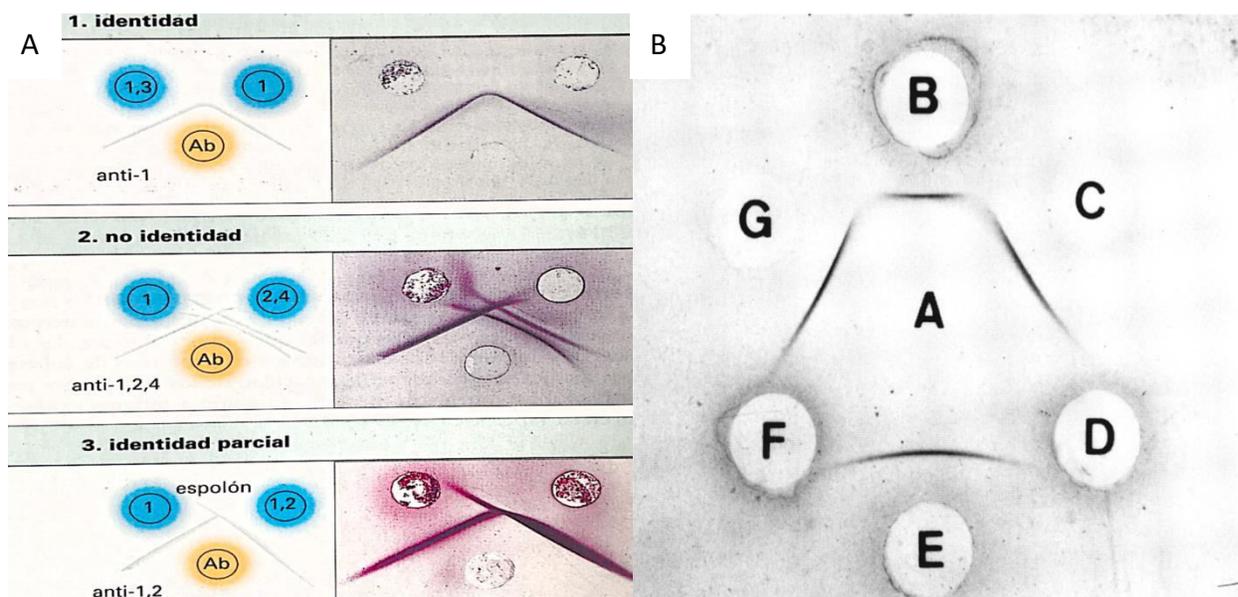


Figura 36. Diagnóstico serológico de la PCM por doble inmunodifusión radial.

(A) Los antígenos y anticuerpos difunden en el agar por gradiente de concentración generando patrones como los que se muestran. (B) Inmunodifusión radial usando antígeno filtrado de cultivo levaduriforme de *P. brasiliensis* en el pocillo A. Los pocillos B y E contienen sueros hiperinmunes anti-Gp43; los pocillos C y G contienen suero de pacientes con PCM; el pocillo D tiene un suero de paciente con histoplasmosis y el pocillo F es un suero de paciente conocido sano, usado control negativo. Tomado de Franco *et al.* 1993 y Roitt *et al.* 1994 (169,252).

En caso de estar disponibles, se recomienda el seguimiento de los pacientes con las pruebas de fijación de complemento y la inmunodifusión, esto con el fin de dar seguimiento al tratamiento a la vez que se pueden detectar recaídas antes de que se presenten síntomas de nuevo (374). Estas pruebas deben realizarse cada seis meses junto con el seguimiento médico del estado general y estudios radiológicos. Si se sospecha de reactivación de la enfermedad o la no respuesta al tratamiento se puede solicitar antes de los seis meses. Se ha observado que la disminución de los niveles de anticuerpos ocurre entre los 6-10 meses, la prueba puede resultar negativa o se pueden mantener títulos bajos del anticuerpo (366).

10.3.5. Técnica de aglutinación en látex

En el 2015, investigadores brasileños desarrollan una técnica de partículas sensibilizadas de látex (SLP) con antígeno Gp43 y otras con el anticuerpo monoclonal mAB17c anti-Gp43. Esta prueba sirve para realizar el diagnóstico de PCM asociada a *P. brasiliensis* en muestras LCR y lavado broncoalveolar. Se determinó que las SLP-Gp43 detectaron anticuerpos en las muestras de pacientes con una sensibilidad de 98,46 %, especificidad 93,94 %, valor predictivo positivo de 91,4 % y valor predictivo negativo 98,9 %. Por otro lado, con respecto a la detección de antígeno por medio del mAB17c-SLP para detectar antígeno circulante se obtuvo una sensibilidad 96,92 %, especificidad 88,89 %, valor predictivo positivo 85,1 % y negativo 97,8 %. La correlación entre ambos métodos también fue satisfactoria. Se destaca también la utilidad de esta técnica en el seguimiento de los pacientes a lo largo del tratamiento (142).

Los autores concluyen que esta es una técnica con amplio potencial diagnóstico, por su rapidez (lectura en 10 min), sensibilidad, especificidad y la posibilidad de implementarse incluso en laboratorios de complejidad baja que se encuentren ubicados en zonas distantes y en zonas endémicas de bajos recursos (142). El fundamento de la prueba puede visualizarse en la figura 37.

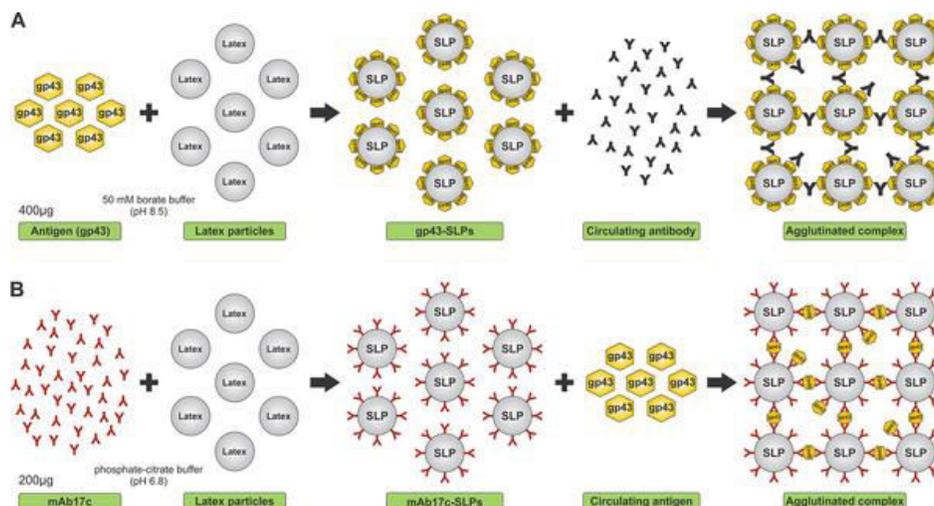


Figura 37. Fundamento de la aglutinación en látex para el diagnóstico de PCM.

(A) Recubrimiento de partículas de látex con Gp43 para la detección de anticuerpos contra este antígeno en diferentes fluidos del paciente con sospecha de PCM. (B) Recubrimiento de partículas de látex con anticuerpos monoclonales anti-Gp43 para la detección de antígeno gp43 en muestras de pacientes con sospecha de PCM. Tomado de dos Santos *et al.* 2015 (142).

10.3.6. Inmunolectroforesis y contrainmunolectroforesis

La inmunolectroforesis ha sido utilizada poco para el diagnóstico de PCM, su uso ha sido principalmente para investigación, y no se han comercializado para uso en laboratorios de forma rutinaria. Además, se ha descrito que dependiendo de la naturaleza del antígeno utilizado estas pruebas pueden dar reacciones cruzadas con otras enfermedades fúngicas (388). Se menciona que estas técnicas pueden tener una sensibilidad del 95 % y una especificidad del 100 %, mientras que otros autores reportan sensibilidades de inclusive el 77 % (10). La técnica se basa en la separación de mezclas complejas de antígenos mediante la aplicación de una corriente eléctrica al antígeno depositado en un gel de agar, luego se excava un pocillo en el que se agrega el suero del paciente y se deja difundir. Se formarán arcos de precipitina si hay reacción antígeno-anticuerpo (252).

Con respecto a la contraimmunoelectroforesis esta se puede utilizar como herramienta diagnóstica de la PCM en etapas tempranas de la enfermedad (385). El principio de esta inmunoelectroforesis es el de la inmunoprecipitación que ocurre cuando el antígeno que se encuentra en el cátodo migra por un campo eléctrico a través de un medio de difusión adecuado, como puede ser un gel de agarosa, y que contra corriente, desde el ánodo, migra el anticuerpo (389). Es decir, esta técnica es una combinación entre la electroforesis tradicional y la inmunodifusión (390). La figura 38 muestra el principio de la contraimmunodifusión.

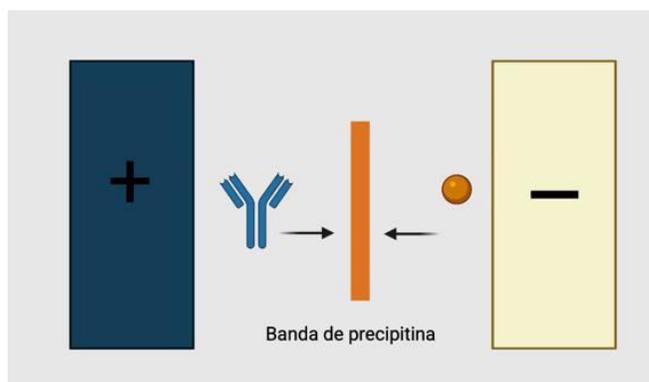


Figura 38. Fundamento de la prueba de contraimmunoelectroforesis.

Esta técnica se lleva a cabo en geles de agar en los que el pH seleccionado confiere una carga positiva a los anticuerpos implicados en la reacción inmune, y una carga negativa a los antígenos. Al aplicar una carga eléctrica, los antígenos y los anticuerpos migran el uno hacia el otro, formando una banda de precipitado, con una sensibilidad de 10 a 20 veces mayor que la inmunodifusión doble y en un tiempo menor. Tomado y adaptado de Roitt *et al.* 1994 (252).

Para la contraimmunoelectroforesis, los antígenos no son estandarizados y pueden variar entre laboratorios, lo que dificulta comparar los resultados entre laboratorios. En general, son extractos de células levaduriformes sometidas a sonicación, aunque también pueden obtenerse antígenos de las formas miceliales y exoantígenos de ambas formas. Algunos investigadores recomiendan el uso de esta técnica como tamizaje, por la rapidez con la que se pueden obtener resultados (391). Sin embargo, presenta el inconveniente de la disponibilidad del equipo para realizarla (385).

10.3.6. Immunobinding y Western blot

Conocida también como técnica de dot-ELISA, el inmunobinding es una prueba de detección de anticuerpos en la cual se utiliza una membrana como fase sólida. Las muestras a ser estudiadas se colocan en un punto en la membrana de nitrocelulosa, que reemplaza a la placa utilizada tradicionalmente en el ELISA. La nitrocelulosa adsorbe muy bien el antígeno por lo cual su sensibilidad y especificidad son comparables al ELISA tradicional (392). La figura 39 muestra el principio del inmunobinding.

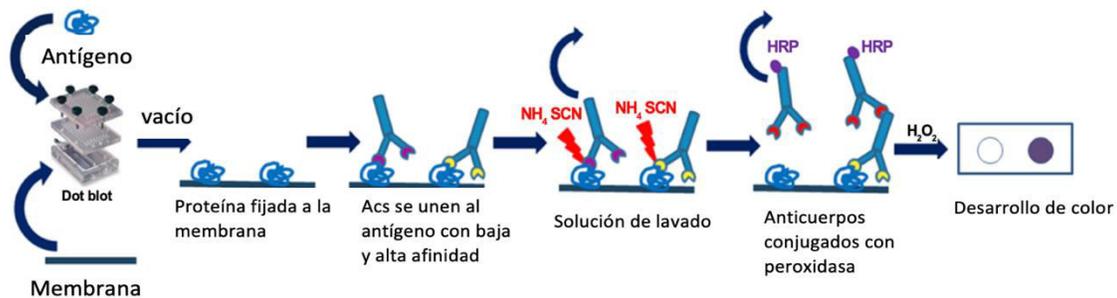


Figura 39. Fundamento de la técnica de diagnóstico serológico Dot-ELISA o inmunobinding.

El antígeno de interés se aplica a la membrana. Luego de la incubación, se coloca la muestra que contendrá los anticuerpos de interés. Los anticuerpos de baja afinidad se lavan y permanecen los de alta afinidad. Los complejos antígeno-anticuerpo son detectados por medio de un anticuerpo conjugado con peroxidasa que permite evidenciar el cambio de color al aplicar el sustrato. Tomado y adaptado de Svobodová *et al.* 2013 (393).

En Brasil se reporta un análisis de muestras utilizando la técnica del inmunobinding. Utilizaron como antígeno la glicoproteína Gp43 de *P. brasiliensis* secretada en el sobrenadante de cultivos. Se enfrentó el antígeno contra el suero de pacientes con PCM que se encontraban en fase activa de la enfermedad y en fase crónica. Se utilizaron sueros control de pacientes con criptococosis, candidiasis, aspergilosis, lacaziosis e histoplasmosis. Todos los sueros de pacientes con PCM fueron positivos para esta prueba; se observó la presencia de positivos débiles con los sueros de los pacientes con lacaziosis. Los resultados de este estudio indican que esta técnica es sensible, específica y rápida para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes, ya que la prueba puede desarrollarse de forma cuantitativa con el reporte de títulos de anticuerpos (394).

Con respecto al western blot este es un sistema de detección y caracterización de proteínas basado en la especificidad de la interacción antígeno-anticuerpo. El primer paso

en esta técnica es la separación por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida del antígeno y la posterior transferencia a una membrana. Los antígenos que se transfirieron a la membrana son reconocidos por los anticuerpos presentes en el suero del paciente y se da la formación de bandas o líneas que se comparan contra una membrana control. La aparición de color esta mediada por la adición de un sustrato cromogénico soluble que precipita en el sitio donde se encuentra el complejo antígeno-anticuerpo (395).

En el caso de *Paracoccidioides* spp., se publicó un estudio en el cual se utiliza esta técnica y como proteína recombinante purificada una proteína de choque térmico, la Hsp60. De 75 muestras utilizadas en este estudio 72 fueron positivas y no se observó reacción cruzada en sueros conocidos de pacientes con aspergilosis, esporotricosis, criptococosis y tuberculosis. La sensibilidad de la técnica fue de 97,3 % y especificidad de 92,5 %. Los autores concluyen que esta proteína puede ser utilizada sola o en combinación con otros antígenos para el diagnóstico de la PCM (396).

10.3.7. Discusión sobre las técnicas serológicas de diagnóstico de PCM

Con respecto a este tipo de diagnóstico indirecto, es importante destacar el meta análisis de las pruebas inmunológicas utilizadas para el diagnóstico de la PCM desde el año 1972 al 2017, realizado por Higuera-Gutiérrez *et al.*, publicado en el 2019 (397). En la recopilación que abarca este estudio, se determinó que para el diagnóstico serológico de la PCM se han utilizado diferentes preparaciones antigénicas dentro de las cuales se encuentran mezclas o “pooles” de antígenos, antígenos purificados o antígenos recombinantes de Gp43, P27, Hsp60 y el antígeno sintético P2. Dentro de esta gama de antígenos este estudio determinó que el uso del Gp43 como antígeno presenta los valores más altos de validez diagnóstica (397).

Esto se debe principalmente a que Gp43 es la proteína más abundante e inmunogénica de *P. brasiliensis*. Esto se evidencia en los altos títulos de anticuerpos anti-gp43 en pacientes con formas severas de la PCM. Cabe destacar que, si esto puede ser de utilidad en el caso de esta especie del género *Paracoccidioides*, también se ha descrito que *P. lutzii* presenta esta glicoproteína en bajas concentraciones, lo que puede dar lugares a resultados falsos negativos. Por esto los autores de este meta análisis sugieren que por

precio y sensibilidad, y comparando los antígenos recombinantes versus las mezclas antigénicas, se recomienda la utilización de mezclas de antígenos (397)

Por último, dicho estudio, demuestra que la técnica serológica más utilizada en el diagnóstico de PCM es la inmunodifusión y que una alternativa puede ser la inmunoelectroforesis y el inmunobinding, tomando en cuenta las ventajas y desventajas ya mencionadas. Surge entonces la técnica del ELISA, ampliamente utilizada en laboratorios inclusive de baja complejidad por la facilidad con la que se pueden realizar, la estabilidad de reactivos y las diferentes variantes de la técnica que permiten un amplio seguimiento serológico de los pacientes (64,397).

Lamentablemente los ELISAS que se desarrollan en la actualidad son “*in house*”, no hay un sistema comercial disponible lo cual no permite contar con técnicas inmunoenzimáticas estandarizadas. Por esta razón si se utilizan estas técnicas el seguimiento debe darse siempre bajo las mismas condiciones del ensayo (1).

10.4. Diagnóstico molecular

Las pruebas moleculares para la identificación de *Paracoccidioides* spp. pueden dividirse en aquellas que detectan los ácidos nucleicos del patógeno fúngico y aquellas que se basan en la espectrometría. Adicionalmente, algunas se emplean para identificación del hongo a partir de un cultivo, mientras que otras pueden emplearse a partir de la muestra clínica directamente. Finalmente, algunas se emplean para detección del hongo, mientras que otras se abocan a la clasificación del aislamiento en una especie específica del hongo y por ende son más aptas para investigación que para el diagnóstico de rutina en el laboratorio de micología (398).

Existen pocas técnicas estandarizadas para el uso clínico de rutina o para detectar e identificar al hongo en muestras clínicas, adicionalmente, algunas de las técnicas son de desarrollo previo a la descripción *P. lutzii* y de las especies crípticas de *P. brasiliensis sensu lato* (64). La mayoría de las técnicas moleculares de detección de los ácidos nucleicos se basan en la metodología de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR y sus diferentes variantes (399), e incluyen también la hibridación *in situ* (400) y la amplificación isotérmica mediada por bucle (401). Todas las metodologías descritas a continuación

pueden realizarse para la detección del patógeno fúngico en una muestra clínica o ambiental, así como a partir de una colonia aislada. En el primer caso se tratará de un diagnóstico molecular de la enfermedad, mientras que, en el segundo caso, la intención es más de confirmar el diagnóstico micológico tradicional y de clasificar el aislamiento, por lo que solo en laboratorios grandes y bien equipados suele realizarse, con fines de investigación epidemiológica molecular. Por su parte, las técnicas que no se basan exclusivamente en detección de ácidos nucleicos incluyen la espectrometría de masas (402) y la espectrometría infrarroja (403).

10.4.1. PCR convencional

El PCR convencional para la detección de *Paracoccidioides* spp. se basa, principalmente, en la amplificación de dos secuencias genómicas del hongo: la región ITS (ITS1 e ITS2, más el gen del ARNr 5,8S) y el gen que codifica por la Gp43 (398, 404). Ambas amplificaciones pueden realizarse desde una muestra clínica (biopsia o fluido corporal) o ambiental; además pueden realizarse a partir de un cultivo. En el caso de la región ITS, los productos de PCR pueden secuenciarse para clasificar el aislamiento como perteneciente a una de las dos especies de *Paracoccidioides* spp. (405). Recientemente, se desarrolló también un PCR dúplex (amplificación del exón 2 del gen *GP43* con dos sets de primers, un par para cada especie de *Paracoccidioides* spp., en un único tubo) para el diagnóstico de la PCM (406).

10.4.2. PCR anidado y PCR cuantitativo

El PCR anidado consiste en la amplificación del material genético con dos pares de cebadores o primers. El primer par generará un amplicón de mayor tamaño que servirá de molde para el segundo set de ciclos de amplificación, que generará productos de PCR más pequeños y específicos del patógeno que se busca detectar (407). En el caso de la PCM, se ha empleado la amplificación mediante PCR anidado tanto de la región ITS como del gen *GP43* para diagnóstico molecular directo a partir de biopsias parafinadas o no, y a partir de esputos (408, 409).

En el caso del PCR cuantitativo también llamado qPCR, se emplean fluorocromos que tienen afinidad por moléculas de ADN de doble banda y que emiten señal de manera proporcional a la cantidad de ADN doble banda o se emplean sondas que se hibridan en la hebra de ADN recién sintetizada y que emiten señal igualmente proporcional a la cantidad de ADN amplificado. De este modo, es posible seguir, ciclo a ciclo, la cantidad de ADN presente en el tubo de reacción, por lo que la técnica también recibe el nombre de PCR en tiempo real o “real-time PCR”, a veces escrito como RT-PCR, a no confundir con el PCR precedido de una retrotranscripción (RT) en el cual una molécula de ARN se retrotranscribe a ADN para iniciar el proceso de amplificación de este (407). En cuanto a la PCM, se ha empleado la técnica de qPCR para detectar y cuantificar el gen de GP43, la región ITS y la proteína Pb27 (410–412).

10.4.3. Técnicas basadas en PCR para el tipaje de *Paracoccidioides* spp.

Por su naturaleza, costo e implementación, estas técnicas se emplean principalmente para la clasificación de los aislamientos clínicos o ambientales de *Paracoccidioides* spp. Las metodologías incluyen el análisis de secuencias multilocus (“*Multilocus Sequence Analysis*” o MLSA), el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (“*Restriction Fragment Length Polymorphism*” o RFLP), el polimorfismo de ADN aleatoriamente amplificado (“*Random Amplified Polymorphic DNA*” o RAPD) y la amplificación por PCR y posterior secuenciación de microsatélites y de elementos transponibles (362,398).

En el caso de la clasificación de *Paracoccidioides* spp. por MLSA, en uno de los esquemas, se amplifican por PCR cinco genes nucleares del hongo, como se mencionó previamente en la sección de clasificación taxonómica y aspectos genéticos (40). Con la inclusión de otros genes, hasta llegar a amplificar 13 regiones distintas (43), se pueden clasificar los aislamientos en todas las especies descritas, incluyendo las especies crípticas, a excepción de *P. venezuelensis* descrita luego de la publicación de la metodología (398).

La metodología de RFLP consiste en digerir el ADN del aislamiento con enzimas de restricción (endonucleasas) que realizan cortes en el ADN en secuencias conocidas, lo que genera bandas de ADN de longitud distinta. El digerido genera un patrón de bandas que puede determinarse con una electroforesis y compararse contra un control conocido (413).

En el caso de la PCM, previo a la digestión se emplean distintos primers de PCR para amplificar el material, tener mejor resolución y aumentar la señal; el amplicón corresponde al gen de la α -tubulina (TUB1) que posee suficientes polimorfismos para poder diferenciar *P. lutzii* de las especies crípticas de *P. brasiliensis sensu lato*: *P. brasiliensis sensu stricto*, *P. americana* y *P. restrepiensis* (414,415).

La metodología de RAPD consiste en amplificar, con primers aleatorios, el ADN de un aislamiento y detectar así la variabilidad genética de un grupo de aislamientos emparentados (416). En *Paracoccidioides*, esta técnica se ha empleado para explorar la diversidad de aislamientos clínicos (417).

Los microsatélites son secuencias cortas de repeticiones (“*Short Sequence Repeats*” o SSR) que se encuentran en tándem y cuya longitud es variable según el número de repeticiones (418). Se emplean para caracterizar los alelos según el tamaño o longitud del amplicón, o mediante la secuenciación de este. En la PCM, esta metodología se ha empleado para distinguir las especies crípticas del complejo *P. brasiliensis* (419,420).

Finalmente, la amplificación de elementos transponibles se ha empleado en *Paracoccidioides* para separar las especies crípticas del complejo *P. brasiliensis* (421). Esta metodología ha confirmado los hallazgos hechos con otras técnicas moleculares, como la amplificación de microsatélites o los PCR convencionales; sin embargo, la amplificación de elementos transponibles no es capaz por sí sola de clasificar satisfactoriamente todos los aislamientos (398).

10.4.4. Amplificación isotérmica

En la metodología conocida como amplificación isotérmica mediada por bucle (“*Loop-Mediated Isothermal Amplification*” o LAMP), la amplificación del ADN ocurre a una única temperatura (isotérmicamente), por lo que no es necesario un termociclador. El LAMP emplea una ADN polimerasa distinta, generalmente la polimerasa Bst de *Geobacillus stearothermophilus*, para la amplificación del ADN. Esta polimerasa es capaz de romper los puentes de hidrógeno entre las cadenas de ADN y de sintetizar las hebras complementarias sin que su actividad se vea inhibida por la estructura secundaria del ADN (422). Se ha empleado esta técnica para amplificar el gen *GP43* de *Paracoccidioides* spp. a

partir del ADN extraído de muestras clínicas (biopsias parafinadas y esputos), por lo que es una metodología apta para el diagnóstico de la PCM (401).

10.4.5. Hibridación *in situ*

La hibridación *in situ* hace uso de sondas de ADN que pueden unirse a secuencias complementarias de manera precisa, ya sea en un corte histológico o en células intactas, lo que permite la localización y detección de hongos de interés (423). La hibridación fluorescente *in situ* (“*Fluorescence in situ hybridization*” o FISH) es un tipo de hibridación *in situ* que emplea sondas con fluorescencia que se unen a secuencias genómicas del patógeno que se busca (424). Existen al menos dos ensayos de FISH para detectar *Paracoccidioides* spp. en biopsias que se fijan a secuencias específicas del gen que codifica el ARN ribosomal 28S de este hongo. Se reportaron una especificidad y una sensibilidad similares a las de los PCR anidados, con la ventaja de requerir únicamente de un microscopio de fluorescencia con filtros adaptados a los fluorocromos empleados (398).

10.4.6. Espectrometría de masas y espectrometría infrarroja

La espectrometría de masas se emplea hace más de 100 años. Sin embargo es hasta hace poco que esta técnica ha cobrado importancia en la microbiología ya que permite la identificación de bacterias, levaduras y hongos filamentosos cultivados previamente por métodos tradicionales (425). El término MALDI se refiere al nombre de la técnica en inglés que corresponde a “*Matrix-assisted laser desorption/ionization*” o desorción/ionización por láser asistida por matriz (426). Es una técnica de ionización suave que permite el análisis de proteínas de elevado peso molecular y al mismo tiempo hace posible el estudio de mezclas ya que por medio de ionización se producen fragmentaciones que facilitan el espectro de masas. Esta técnica se combinó con un analizador de masas tipo TOF, por sus siglas en inglés, “*Time-of-flight*” o tiempo de vuelo, refiriéndose a la obtención de espectros de masas que dependen del tiempo que tardan las proteínas en viajar por la columna al vacío hasta el detector (427).

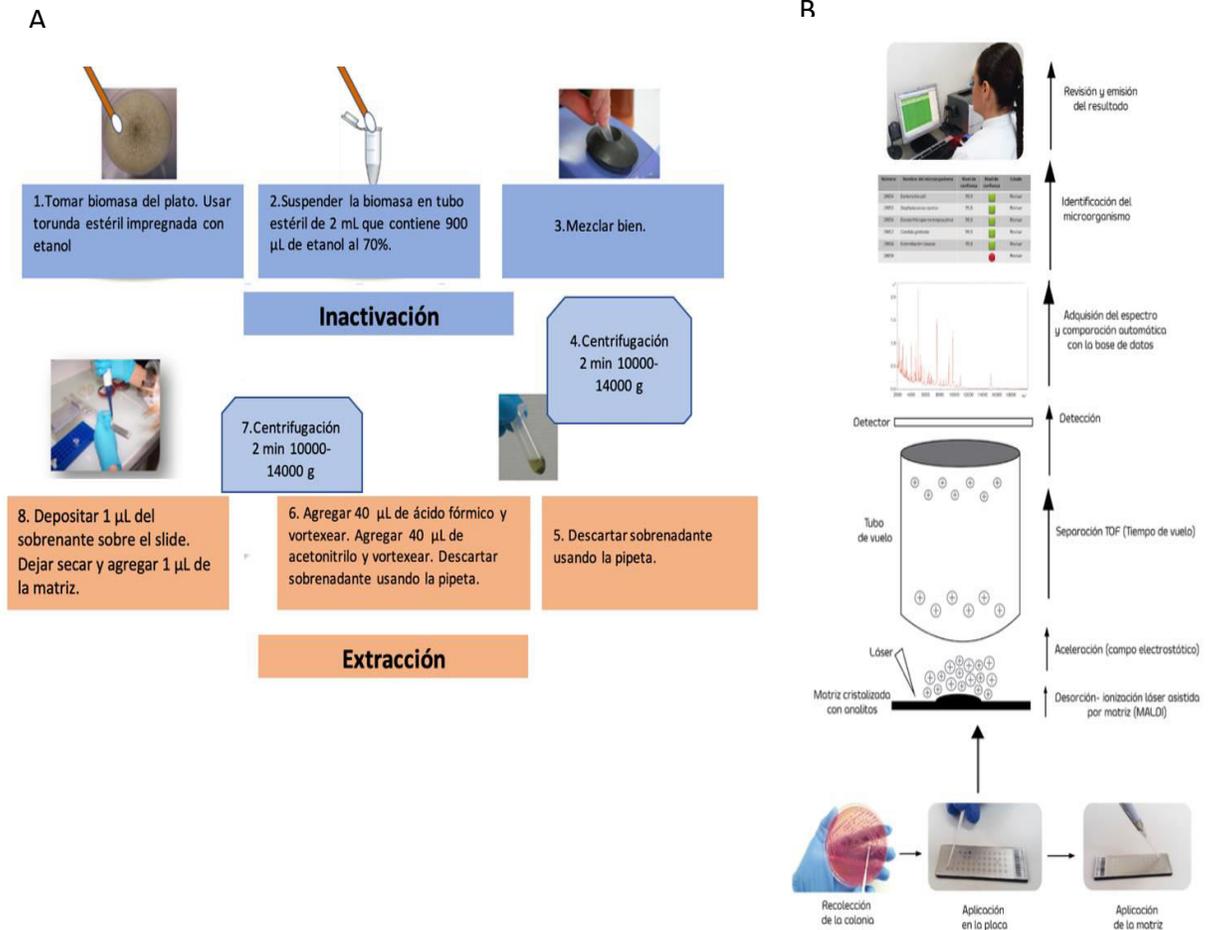
El espectrómetro de masas cuenta con una fuente de ionización, un analizador y un detector. A la muestra se le agrega una matriz orgánica que cristaliza, esta mezcla es irradiada por un láser que incide sobre la muestra en placas de material conductor. La energía del láser provoca una nube de partículas (428). Los iones son extraídos al ser sometidos a un campo eléctrico a través del cual estos son acelerados debido a su carga. Los iones son dirigidos al analizador de masas y posteriormente al detector. El perfil proteico obtenido es comparado con una base de datos, la identificación depende entonces de la calidad del espectro y el tamaño de la base de datos (429).

Los patrones de masa de hongos se derivan de proteínas estructurales abundantes y característicos de cada especie, por lo que se emplean para reconocer la especie (398). Como ejemplo de utilización de esta técnica, se puede citar un estudio realizado en Brasil en el 2015 con cepas de *P. brasiliensis* y *P. lutzii* que demostró resultados reproducibles y comparables con las técnicas moleculares que se emplearon para realizar la identificación y que incluyeron el tipaje de secuencia multilocus, el PCR del gen *HSP 70*, la secuenciación de ITS. Luego de la depuración de los espectros obtenidos se obtuvieron dos diferentes perfiles de proteínas uno para *P. brasiliensis* y otro para *P. lutzii* (402).

La figura 40 muestra un diagrama de preparación de la muestra para su identificación por espectrometría de masas y el flujo de análisis en el equipo.

Figura 40. Identificación de hongos miceliales por espectrometría de masas.

(A) Preparación de hongos miceliales para la identificación por MALDI-TOF MS de Biomérieux. (B) Diagrama del flujo de la muestra en el espectrómetro de masas. Adaptado de Maldonado *et al.* 2017 (429).



Una segunda técnica, mucho menos empleada y aún bajo investigación, es la espectrometría infrarroja con transformación de Fourier (“*Fourier-transform infrared spectroscopy*” o FT-IR) que emplea luz infrarroja para escanear una muestra (células enteras o un extracto) para generar un patrón espectral específico de cada hongo (430). Se obtuvieron buenos resultados al emplear esta metodología para diferenciar *P. brasiliensis* de *P. lutzii*, al generarse espectros de luz infrarroja con patrones de proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos (403).

10.4.7. Discusión sobre las técnicas moleculares de diagnóstico de PCM

De las técnicas moleculares para el diagnóstico de la PCM, solamente unas pocas son útiles para la detección de *Paracoccidioides* spp. en muestras clínicas y ninguna es capaz de distinguir entre todas las especies crípticas del hongo. La mayoría de pruebas fueron desarrolladas para emplear cultivos puros del hongo y sirven entonces para

confirmar el diagnóstico y para clasificar el aislamiento, con fines epidemiológicos principalmente (398).

Adicionalmente, es destacable que el tiempo promedio entre la descripción de una técnica molecular y su aplicación al diagnóstico molecular de la PCM es de aproximadamente 15 años, lo que muestra bien la lentitud con la que se incorporan nuevas tecnologías al diagnóstico de esta micosis desatendida (398). Es de esperar que con la introducción de las tecnologías de secuenciación masiva de genomas completos, nuevos métodos de diagnóstico sean desarrollados como una alternativa viable en el laboratorio (87, 398).

10.5. Algoritmo propuesto para el diagnóstico de la PCM

Al terminar este capítulo podemos visualizar todo el proceso del diagnóstico de la PCM, desde el laboratorio. Se debe reconocer la importancia de la fase preanalítica, con la adecuada obtención y conservación de la muestra, la separación para realizar tanto los estudios micológicos, histopatológicos, serológicos, moleculares y de espectrometría, en caso de contar con ellos. Importante destacar la importancia del examen directo ya que, de todos los métodos de diagnóstico descritos, el examen directo permite identificar al agente causal de forma inmediata y esto se traduce en brindar al personal médico las herramientas para iniciar la terapia antifúngica de manera oportuna.

La figura 41 presenta un algoritmo propuesto para el diagnóstico de la PCM y que resume lo descrito en este apartado.

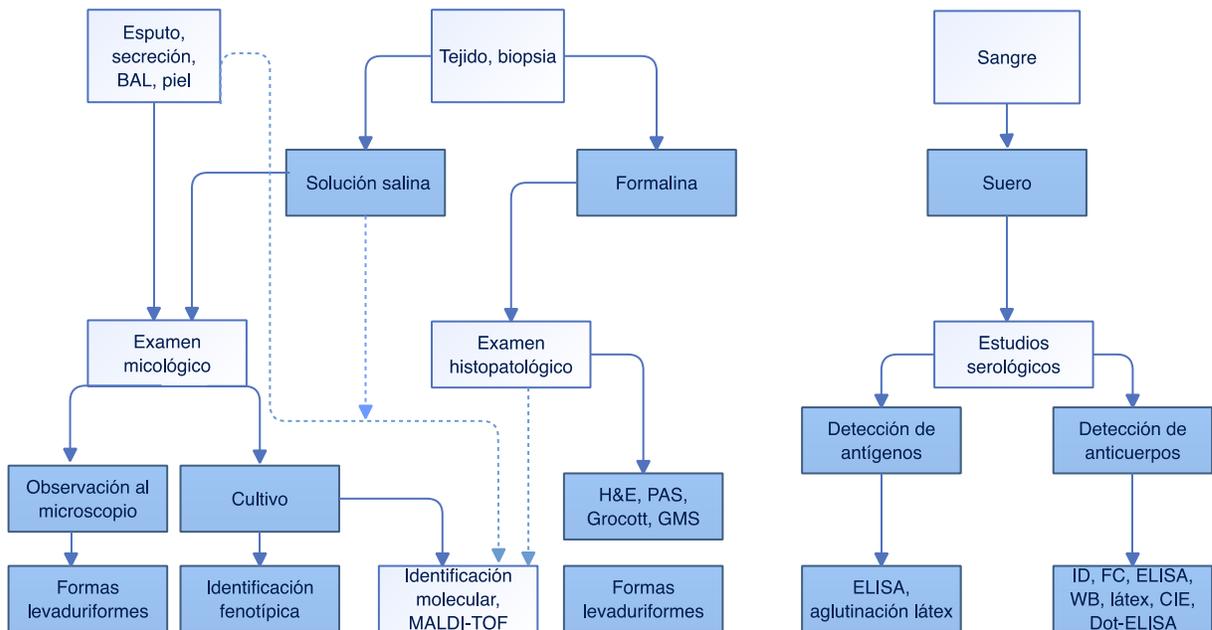


Figura 41. Algoritmo de diagnóstico de la PCM, según el tipo de muestra para análisis.

Según el tipo de muestra, se pueden realizar estudios micológicos y/o histopatológicos. Luego del cultivo, los aislamientos se pueden identificar de manera fenotípica o por métodos moleculares o por espectrometría de masas. En caso de realizar un diagnóstico en sangre, se emplean métodos serológicos para detección de anticuerpos o de antígeno por diversas técnicas. ID: inmunodifusión; FC: fijación complemento, CIE: contraelectroforesis. Adaptado de Pinheiro *et al.* 2020 (398).

11. TRATAMIENTO DE LA PCM

Los medicamentos utilizados para el tratamiento de la PCM actúan principalmente a nivel de la membrana plasmática y sobre la síntesis de ácido fólico (431). Podemos citar tres grupos de antifúngicos que actúan sobre estas estructuras o vías metabólicas: i) los polienos como la anfotericina B, ii) las sulfonamidas como el sulfametoxazol, el cual combinado con el trimetoprim se conoce como trimetoprim sulfametoxazol (TMX-SMX) también llamado cotrimoxazol, y iii) los azoles dentro de los cuales se pueden citar los imidazoles como el ketoconazol y los triazoles como el fluconazol y el itraconazol (432). Otros azoles de nueva generación como el posaconazol y el voriconazol se han empezado a utilizar en el tratamiento de la PCM. Los resultados observados son alentadores (433,434).

El primer grupo de medicamentos utilizados para el tratamiento de esta enfermedad fue el grupo de las sulfonamidas, utilizadas por primera vez por Oliveira Ribeiro en 1940. Se utilizó la sulfapiridina como tratamiento de la PCM (32). El mecanismo de acción de estos medicamentos se basa en la inhibición competitiva que realiza el ácido amino benzoico (PABA) sobre la enzima dihidropteroato sintasa, la cual es importante en la vía de síntesis del ácido fólico y este a su vez es necesario para realizar la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas (435).

Tiempo después, en 1958, Lacaz y Sampaio dan a conocer el primer caso donde se utilizó la anfotericina B para tratar esta enfermedad. (60). Es conocido que este polieno si bien es efectivo, interacciona no solo con el ergosterol de la membrana fúngica sino que también afecta la membrana con colesterol, lo cual resulta en un daño severo para el hospedero, produciendo inicialmente síntomas como náuseas, vómitos hiper- e hipotensión, hipoxia y nefrotoxicidad (436). Las nuevas formas, como la anfotericina B liposomal, pretenden reducir la toxicidad de este medicamento (437).

Luego, en 1973, se introduce el uso de otras sulfonamidas como el cotrimoxazol. Esta droga ejerce una acción sinérgica entre sus dos fármacos constituyentes, el sulfametoxazol y el trimetoprim, y se indica su uso en casos de PCM leve a moderada y en la neuroparacoccidiodomycosis (438). El cotrimoxazol actúa por inhibición de la enzima

involucrada en la síntesis de ácido tetrahidrofólico el cual es necesario para la posterior formación de folato intracelular, que es esencial para el crecimiento del hongo (431).

Años más tarde, en 1981, la FDA aprueba el uso de un nuevo imidazol de amplio espectro, el ketoconazol (439). Al igual que los otros azoles, el ketoconazol actúa como droga fungistática inhibiendo la acción del citocromo P450, necesario para la síntesis del ergosterol presente en la membrana fúngica. Esto conlleva a la acumulación de esteroides 14- α -metilados que alteran la función y estructura normales de la célula fúngica (432). Pese a que este azol mostró efectividad en las formas leves y moderadas de la enfermedad, la FDA suspendió su uso en la presentación oral debido a su hepatotoxicidad y la insuficiencia adrenal reportada en diversos estudios alrededor del mundo (440, 441).

En el año 2000 se documentó el uso de terbinafina en un caso donde el trimetoprim sulfametoxazol no fue efectivo. En este caso, un paciente masculino presentaba las lesiones a nivel anal, perianal y escrotal (442). La terbinafina, perteneciente al grupo de las alilaminas, actúa a nivel de la enzima escualeno epoxidasa, involucrada también en la síntesis de ergosterol, pero en etapas más tempranas de su desarrollo, razón por la cual se ha visto que su efecto es fungicida inclusive en concentraciones bajas (434).

11.1. Manejo terapéutico de la PCM leve y moderada

En estos casos se utiliza el itraconazol con altos niveles de eficacia y seguridad. Este fármaco se considera el tratamiento de elección en cuadros de PCM leve o moderada. Es importante recordar que el itraconazol se absorbe mejor cuando se ingiere con bebidas ácidas y se debe consumir la cápsula completa, sin abrirla, de lo contrario disminuye la absorción gastrointestinal (440). En términos generales, se ha observado que el itraconazol es más efectivo que el trimetoprim sulfametoxazol (443). Sin embargo, este se considera la segunda alternativa terapéutica en casos en los cuales el itraconazol está contraindicado, cuando hay falla terapéutica o existe coinfección con tuberculosis (1).

El tratamiento en las formas leves y moderadas tiene una duración entre los 9 y 18 meses, con un promedio de 12 meses. Se ha observado que las lesiones a nivel cutáneo mejoran 30 días después de iniciado el tratamiento, las linfadenopatías mejoran entre los 45

a 90 días. Las imágenes radiológicas empiezan a cambiar luego de seis meses de tratamiento con itraconazol (1). Durante el transcurso de la terapia, se debe dar seguimiento al paciente con valoraciones médicas periódicas, y seguimiento serológico y radiológico (435).

11.2. Manejo terapéutico de la PCM severa

En estos casos se recomienda el uso de anfotericina B, ya sea en forma desoxicolato o liposomal. La duración del tratamiento depende de la clínica del paciente, con la recomendación de administrar la anfotericina B por un periodo de tiempo que oscila las 2 a 4 semanas. En los casos en los cuales no puede administrarse la anfotericina B liposomal, se recomienda el TMX-SMX. Se ha descrito también el uso de fluconazol intravenoso de forma alternativa (1).

Cabe destacar que en los casos de PCM severa el manejo a largo plazo de los pacientes es muy importante, ya que necesitan tratamientos antifúngicos extendidos por reaparición de la enfermedad y secuelas principalmente a nivel de tracto respiratorio. Al igual que los pacientes con PCM leve y moderada se debe incluir el seguimiento clínico, microbiológico y radiológico (435).

11.3. Alternativas terapéuticas en poblaciones especiales

11.3.1. Embarazo

Durante el embarazo, la PCM puede presentarse como manifestación inicial o como reactivación de la enfermedad que fue previamente controlada (1). Se considera que cuando se presenta durante el embarazo es a causa de la disminución de la respuesta inmune (4). En esta población, la enfermedad puede controlarse con los antifúngicos habituales, principalmente con anfotericina B, la cual puede utilizarse durante todo el embarazo (444). Con respecto a los azoles y el trimetoprim sulfametoxazol debe de considerarse su efecto teratogénico (444) y el riesgo de aborto espontáneo respectivamente, por lo tanto deben evitarse (445).

La terapia antifúngica deberá mantenerse durante todo el embarazo para evitar las recaídas y la interrupción post parto debe evaluarse según cada caso. Después del nacimiento, se debe administrar la terapia antifúngica hasta que el paciente se considere en remisión (1).

11.3.2. PCM infantil

En la población pediátrica, se ha optado por el uso de TMX-SMX (446). Esto se debe a su efectividad, a que es bien tolerado por los pacientes y tiene presentaciones en jarabe que facilitan su administración. La dosis se ajusta de acuerdo con el peso del paciente. De forma alternativa se puede administrar de forma intravenosa en casos en los cuales se presente oclusión intestinal (1).

También se puede utilizar el itraconazol (447) y se debe considerar el uso de anfotericina B solo en casos de PCM severos (448). Concomitantemente, pueden administrarse esteroides si los pacientes presentan adenopatías, fistulización, fiebre o pérdida de peso (1, 449).

11.3.3. Pacientes en fase SIDA

Estos pacientes presentan formas severas y diseminadas de la PCM (450). Por esta razón, deben ser tratados con anfotericina B o, si se considera apropiado, con altas dosis de itraconazol (451). Con especial cuidado se deben considerar las interacciones que se puedan presentar con la terapia antiretroviral y el Síndrome de Reconstitución Inmune (SIRI) (1, 452). Puede administrarse también TMX-SMX y fluconazol en forma intravenosa. Para prevenir la interacción entre medicamentos, la PCM debe ser tratada primero con antifúngicos de tres a cinco semanas previo al inicio de la terapia antiretroviral. Cuando el paciente mejore, debe administrarse una profilaxis secundaria con TMX-SMX o itraconazol (1). Cabe destacar que algunos autores consideran que la rara aparición de PCM en pacientes con HIV puede deberse en parte a la administración de TMX-SMX como profilaxis contra *Pneumocystis jirovecii* (434).

El tratamiento de estos pacientes debe continuar hasta que los linfocitos CD4⁺ alcancen alguno de las dos siguientes conteos: i) un mínimo de 100 células/ μ L, además de una carga viral indetectable o ii) un mínimo de 200 células/ μ L, independientemente de la carga viral; durante los tres meses de tratamiento (1). Es importante recordar que, en pacientes con inmunosupresión, no debe utilizarse el seguimiento del estado de los pacientes por medio de la detección de anticuerpos, y que deben utilizarse métodos de diagnóstico directo como la biopsia y las pruebas microbiológicas (450).

11.3.4. Pacientes con patología renal

En pacientes con PCM y patología renal, debe ajustarse la dosis de los fármacos correspondientes al grupo de los azoles, debido a que la excreción de estos medicamentos se da por vía renal. Así, para el fluconazol, el itraconazol, el voriconazol e incluso la terbinafina se deben realizar ajustes a la dosis de acuerdo a la función renal del paciente, esto incluye a pacientes en hemodiálisis y diálisis peritoneal (453).

Estos compuestos citados anteriormente presentan excreción renal y sus metabolitos pueden causar toxicidad debido a que presentan poca solubilidad en pH ácido. Por esta razón, se puede dar la formación de cristales a nivel renal. Se recomienda por lo tanto evitar estos compuestos en caso de daño renal (454).

11.3.5. Pacientes con patología hepática

Con respecto a los azoles se ha descrito que alteran de forma significativa la función hepática (1). Si se observan cambios en la función hepática, el tratamiento con itraconazol debe ser suspendido, ya que la metabolización hepática del itraconazol es elevada; por lo tanto, es necesario ajustar la dosis en casos de insuficiencia hepática. Lo mismo ocurre en el caso del voriconazol. Dentro de los azoles, el fluconazol es el que produce un menor efecto negativo en el hígado (455).

En el caso de los derivados de sulfas, como el cotrimoxazol, no se ha observado hepatotoxicidad durante su uso. Si el paciente con PCM muestra otras patologías hepáticas, como cirrosis o enfermedad hepática asociada al alcoholismo, se recomienda el uso de

anfotericina B ya que es menos hepatotóxico si se compara con el fluconazol (1). En términos generales, se dice que la anfotericina B liposomal no requiere ajuste de dosis en pacientes con PCM y patología hepática (456).

En el cuadro 5, se resume un esquema terapéutico para la PCM según la forma clínica de la enfermedad.

Cuadro 5. Esquema terapéutico para el manejo de la PCM.

Forma clínica	Medicamento	Dosis
Benigna Moderada, lesión unifocal. Se excluye SNC	Sulfadiazina TMX-SMX Ketoconazol Itraconazol	Itraconazol: 200 mg diarios en un período de 9 a 18 meses. En niños ajustar la dosis de acuerdo con el peso. No abrir la cápsula. Cotrimoxazol: período de 18-24 meses. TMX 160 mg + SMX 800 mg (VO 8/8 horas o 12/12 horas).
Moderada Aguda Crónica multifocal	Sulfadiazina TMX-SMX Itraconazol	Niños: TMX 8 a 10 mg/Kg + SMX 40 a 50 mg/kg, Vía oral 12/12 horas.
Severa Aguda Crónica multifocal Crónica-SNC	Anfotericina B Sulfadiazina, TMX-SMX Anfotericina B	Anfotericina B 0.5 a 0.7 mg/kg/día, máximo 50 mg/día Cotrimoxazol (si no puede administrarse la anfotericina) 800mg/160 mg cada 8 horas.
Inmunosupresión por HIV	Anfotericina B	Segunda opción itraconazol 600mg/día o TMX-SMX intravenoso 2 ampollas cada 8 horas. Fluconazol: 600-800 mg/día Profilaxis: TMX-SMX 800*160 mg cada 12 horas.

Adaptado de Shikanai-Yasuda *et al.* 2017 y Shikanai-Yasuda 2015 (1, 457).

11.4. Resistencia a los tratamientos contra la PCM

En términos generales se considera que *Paracoccidioides* spp. no presenta resistencia a los antifúngicos ya sea por mecanismos de resistencia primarios o secundarios (431). Se estima que la falta de adherencia al tratamientos es la causa más común del fracaso de la terapia (435). Por lo tanto, para el tratamiento de la PCM se utilizan desde los derivados azólicos utilizados tradicionalmente y que incluyen el itraconazol o el fluconazol, hasta los últimos azoles en ser desarrollados entre lo que se pueden citar el voriconazol, el posaconazol y el isavuconazol (1,367,458,459).

Cabe destacar que se han realizado estudios de perfiles de resistencia por método de microdilución y que se observó que la mayoría de los aislamientos de *Paracoccidioides* spp. fueron sensibles al ketoconazol, seguido del voriconazol, itraconazol, anfotericina B, fluconazol, 5 fluorocitosina y caspofungina. Sin embargo, se requieren más estudios para poder concluir sobre los perfiles de resistencia las especies de *Paracoccidioides* spp. (460).

11.5. Uso de esteroides en el tratamiento contra la PCM

Los corticosteroides han sido utilizados ampliamente como tratamiento complementario en enfermedades infecciosas (461). Esto se debe a que, en ciertos cuadros, la respuesta inflamatoria es exacerbada y puede generar daño tisular que podría culminar en disfunción orgánica (462).

En el caso de la PCM, la respuesta inflamatoria es tan severa que puede exacerbarse aún más en presencia del tratamiento antifúngico. Esto puede causar daños irreversibles e inclusive llevar a la muerte del paciente, por ejemplo en los casos de PCM laríngea y la PCM cerebral (1). Se ha estudiado entonces la utilización de corticosteroides (prednisolona) en pacientes con granuloma cerebral paracoccidioideo, estenosis laríngea, masa abdominal compresiva y con respuesta inflamatoria severa con necrosis tisular. Al combinarse con la terapia antifúngica, se observó mejoría clínica y se previnieron las complicaciones asociadas a esta enfermedad, y se reportó una disminución en la inflamación durante la terapia antifúngica (463). Cabe destacar que este es el único artículo en el cual se discute formalmente el uso de esteroides para PCM. Este estudio de casos ha sido citado por diversos autores (1, 435), pero no se pudo encontrar otras fuentes más de documentación al respecto.

11.6. Moléculas antifúngicas en estudio

Si bien se ha mencionado que los antifúngicos disponibles en la actualidad se pueden considerar efectivos en el tratamiento de la PCM, las terapias requieren de periodos de tratamiento prolongados, se presentan muchos casos de relapso y se presentan efectos secundarios y toxicidad. Todos estos factores disminuyen la calidad de vida de los

pacientes que sufren esta enfermedad y dificultan el apego a la terapia antifúngica (464). La búsqueda de nuevas moléculas antifúngicas se ha dirigido al desarrollo de moléculas sintéticas, así como también a derivados de plantas y compuestos de microorganismos. Se busca que estos compuestos sean una alternativa terapéutica con menos efectos secundarios que los antifúngicos tradicionales (431). A continuación, se citan algunos ejemplos.

11.6.1. Galato de decilo

Se ha observado la inhibición del crecimiento de *Paracoccidioides* spp. en presencia de galato de decilo (G14). Este se extrae de las hojas de una planta llamada *Alchornea glandulosa*; la adición de cadenas de carbono da como resultado la formación de galatos de alquilo. Se ha descrito que estos compuestos tienen actividad contra patógenos fúngicos oportunistas (465).

Los ensayos con G14 muestran una reducción entre 42 y 65 % de la actividad mitocondrial fúngica entre las 24 y 48 horas de tratamiento, comparada con controles. Se observa también una disminución en la capacidad de gemación. Por estas razones se considera que el G14 induce daños en el mantenimiento de la pared celular, reduciendo la viabilidad de las células fúngicas. Adicionalmente, se ha visto que reduce la adhesión de *P. lutzii* y una disminución de la internalización en células, en modelos *in vitro* (464).

11.6.2. Lectina ArtinM

Esta lectina se extrae de semillas de yaca (*Artocarpus heterophyllus*) y exhibe actividad inmunomoduladora contra patógenos intracelulares como *P. brasiliensis*, ya que induce el desarrollo de una respuesta de tipo T_H1. Se confrontó este extracto contra células de sangre periférica de pacientes con PCM y en células infectadas *in vitro*. El ArtinM indujo la activación de los neutrófilos humanos *in vitro*, lo que estimuló la producción de citoquinas y la expresión de CD54. Esta activación se dio tanto en neutrófilos de pacientes sanos y de pacientes con PCM, como de células mononucleares de sangre periférica humana y por tanto la producción de citoquinas proinflamatorias asociadas a la respuesta de tipo T_H1, la cual se considera como la respuesta protectora en la PCM. Estos estudios se

consideran pioneros, y a futuro se espera realizar más estudios utilizando esta lectina como inmunoterapia en pacientes con PCM (466).

Por otro lado, también se ha experimentado con la lectina ArtinM, tanto en su forma natural como en su forma recombinante. En ratones BALB/c se administró la lectina 3 y 100 días antes de confrontar a los ratones con *P. brasiliensis*. Se observó una menor carga fúngica y una menor incidencia de granulomas, además, de un aumento de IL-12, IFN- γ y NO, favoreciendo la respuesta T_H1. Se puede concluir que la administración del ArtinM promueve la producción de IL-12 favoreciendo la inmunidad de tipo T_H1 (467).

11.6.3. Péptidos antibacterianos: el mastoparán

Se ha estudiado también el uso de péptidos antibacterianos los cuales son importantes como primera línea de defensa para combatir patógenos, tienen actividades antiinflamatorias y tienen un amplio espectro de acción contra bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos, virus y células tumorales (468,469). El mastoparán es un péptido antimicrobiano que se ha aislado del veneno de avispa; algunos de los péptidos de este compuesto han sido estudiados por su actividad antifúngica contra *C. neoformans* y *Paracoccidioides* spp. (468).

Este péptido antibacteriano, nombrado también Mk58911, actúa por alteración de la permeabilidad de la membrana o por la formación directa de poros en la membrana. Los estudios realizados han demostrado actividad *in vitro* contra *P. brasiliensis* más que para *P. lutzii*. Al mismo tiempo no se observó toxicidad en los fibroblastos pulmonares. Se sugiere a futuro el uso de modelos murinos para continuar evaluando la efectividad de este péptido como tratamiento para la PCM (468).

11.6.4. Derivados fúngicos: el farnesol y la citocalasina E

El farnesol es un alcohol sesquiterpeno que es producido por muchos microorganismos, este se encuentra también en diversos aceites esenciales. Está ampliamente descrito su papel como factor de virulencia en el modelo patogénico de *C. albicans* ya que se conoce de la importancia de esta molécula en el *quorum sensing*

(470,471). El farnesol afecta el crecimiento de varias bacterias y hongos, por lo cual se considera como posible agente antimicrobiano (372). En ese sentido, se ha descrito el efecto del farnesol de *C. albicans* sobre el crecimiento y el dimorfismo de *P. brasiliensis*. Al utilizar concentraciones de farnesol que no comprometen la viabilidad celular, se ha observado su efecto sobre la morfogénesis del hongo con inhibición del desarrollo de las hifas y acortamiento de las mismas (372,472)

Por otro lado, como parte de la búsqueda de nuevos compuestos antifúngicos con menores efectos secundarios, se han realizado estudios con metabolitos de hongos como *Aspergillus felis*. A partir de aislamientos fúngicos se obtuvieron extractos etanólicos, uno de los cuales presentó bajos valores de concentración inhibitoria mínima y fue denominado citocalasina E. El tratamiento de las levaduras con este compuesto inhibió la gemación, se generaron especies reactivas del oxígeno y se produjo daño tanto a la membrana como a la pared fúngica de *P. brasiliensis* Pb 18 (473).

11.7. Tratamientos utilizados en Costa Rica para la PCM

A continuación, se mencionan los casos de PCM en Costa Rica, documentados en la literatura científica. Estos casos fueron mencionados en el capítulo de historia de la PCM, comentaremos brevemente sobre los tratamientos en cada caso.

Es importante destacar que, en reportes de casos principalmente antiguos, el tratamiento no es consignado en la publicación. En los casos reportados en 1933 (45, 46), en 1949 (46, 53) y en 1986 (55, 56) no se reporta el tratamiento de la PCM. En el resto de los casos se reporta de manera resumida los tratamientos aplicados (ver Cuadro 6). En todos estos casos, el cuadro resolvió, excepto en el caso publicado en 1953 (46). Una vez más es necesario recalcar que no se debe olvidar que el subregistro de casos en Costa Rica puede ser importante.

Cuadro 6. Lesiones asociadas a PCM en Costa Rica y el tratamiento reportado.

Año de publicación	Ubicación de la lesión por PCM	Tratamiento	Referencia
--------------------	--------------------------------	-------------	------------

Año de publicación	Ubicación de la lesión por PCM	Tratamiento	Referencia
1953	Encías y surco nasogeniano	Sulfamidas y estreptomina; paciente fallece	(46)
1963	Pulmones, tejido linfoide, mucosa oral y pulpa dentaria	4,5 g de sulfadiazina y solución saturada de KI (10 gotas/día con aumento 1 gota/día, hasta 100 gotas), disuelta en leche.	(54)
1986	Dorso de la lengua y a nivel pulmonar	400 mg/día de ketoconazol con vitamina B12 y fumarato ferroso. Luego de 9 meses, la dosis se redujo a 200 mg/día.	(55)
2008	Mucosa labial	Itraconazol 100 mg intradérmica	(57)
2008	Ganglio cervical	Anfotericina intravenosa Itraconazol 200 mg	(57)
2008	Mucosa labial	Anfotericina Ketoconazol 400 mg	(57)
2008	Pulmonar y ganglio submandibular	Ketoconazol y TMX-SMX	(57)
2008	Hueso, fémur izquierdo	Fluconazol TMX Ácido fólico	(57)
2008	Pulmonar	Ketoconazol	(57)
2008	Pulmonar	Fluconazol TMX	(57)
2011	Cavidad oral (lengua)	Ketoconazol 400 mg/día por un mes	(58)
2013	Piel, músculo y tejido óseo	Itraconazol y TMX-SMX por un año	(56)
2019	Paladar blando y trígono molar	Itraconazol	(59)

Elaboración propia según las referencias citadas en el cuadro.

12. MODELOS DE INFECCIÓN

Los modelos de infección son modelos *in vivo* en los que se estudia la interacción hospedero-parásito. Desde el descubrimiento de la enfermedad, Splendore en 1910 intentó establecer un modelo animal, inoculando material recuperado de las lesiones humanas en cobayos, perros, gatos y monos. Sin embargo, no fue hasta 1927, cuando Montenegro reportó la primera paracoccidioidomicosis experimental al inocular intratesticularmente cobayos con una suspensión del material de una lesión de PCM (474). Así, los primeros estudios de infección causante de PCM, se realizaron en cobayos, hámsteres y conejos, pese a desarrollar difícilmente la enfermedad (113,365,475); también se han empleado ratas (112,474,476).

Sin embargo, el modelo murino se considera actualmente el estándar de oro para la infección por *Paracoccidioides* spp. y es el más empleado, principalmente para la PCM pulmonar mediante la inoculación por la ruta intratraqueal (112,113). Es un modelo que además es muy útil para estudiar los tratamientos contra la PCM y para el entendimiento de los aspectos inmunológicos de la enfermedad, como las respuestas humorales y celulares, tanto innatas como adaptativas (112,113). De este modo, en el contexto de la infección por *Paracoccidioides* spp. se han estudiado mecanismos como la activación de las proteínas del complemento, la actividad microbicida de las células NK y de los fagocitos, y la producción de mediadores de la inflamación como citoquinas (112). Además, se observó una mayor susceptibilidad de los machos a la PCM, atribuida a la protección conferida por la hormona femenina 17- β -estradiol, como fue mencionado previamente en este documento. Esto llevó a la confirmación experimental en el modelo murino y a recabar información epidemiológica en humanos, que confirmaron dicha observación y se pudo confirmar la hipótesis planteada sobre la protección hormonal (112).

Adicionalmente, otros modelos animales menos frecuentes, empleados al principio de la investigación con *Paracoccidioides* spp. incluyen los bovinos (por inoculación intratesticular), en los que se pretendió estudiar la evolución de la PCM, pero resultó en una infección autolimitada, sin tendencia a diseminación, en el periodo de hasta cinco meses de observación. Sin embargo, los bovinos fueron empleados para estandarizar las suspensiones empleadas para el diagnóstico por intradermorreacción (474, 477). Adicionalmente, se

emplearon murciélagos (*Artibeus lituratus*) como modelos, ya que se detectaron levaduras de *Paracoccidioides* spp. en sus deyecciones y se pensó que podrían tener importancia en la epidemiología de este hongo, como la tienen en la epidemiología y transmisión de *H. capsulatum*. Sin embargo, al inocular los murciélagos de manera intraperitoneal o intranasal con una carga de 10^6 levaduras viables, no hubo mortalidad y a las 12 semanas, no se detectó más el hongo en los órganos de los murciélagos. Se descartó entonces la importancia de dichos mamíferos en la epidemiología de la PCM (474,478). Finalmente, se puede citar un estudio histopatológico y serológico en perros, en los cuales se da un cuadro autolimitado con una duración inferior a los dos meses (474).

Actualmente, existe un movimiento mundial sobre el uso de animales de experimentación en trabajos científicos, conocido como la teoría de las tres R, la reducción del número de animales empleados en los experimentos, el refinamiento de la metodología experimental en aras del bienestar animal y el remplazo de animales al emplear métodos alternativos (479). Por ende se trata de emplear modelos alternativos como tejidos y cultivos celulares, así como análisis computacionales y matemáticos (pruebas *in silico*) previo a los ensayos *in vivo* para refinar la metodología y reducir el número de animales de experimentación (113).

En ese sentido, para reemplazar los modelos animales empleando mamíferos, es posible emplear invertebrados, cuyo corto ciclo de vida, tamaño pequeño, bajo costo y presencia de un sistema inmune innato representan ventajas para su uso (113). En este sentido, se han hecho ensayos de infección en al menos dos hospederos invertebrados: *Galleria mellonella* y *Caenorhabditis elegans*. En el primer caso, se determinó que *Paracoccidioides* spp. es capaz de producir enfermedad significativa en *G. mellonella* y que por ende sería un buen modelo de infección (480). Sin embargo, en el caso de *C. elegans*, ni *P. brasiliensis* ni *P. lutzii* fueron capaces de infectar el nematodo, por lo que no se considera un buen modelo a explorarse en el futuro (481).

CONCLUSIONES

La PCM es una micosis endémica de América Latina, descrita por primera vez en Brasil en 1908, Adolfo Lutz aísla y cultiva al agente causal de esta enfermedad. En Costa Rica se reporta por primera vez un caso de PCM en 1933. Llama la atención el hecho de que este caso se reportó casi 20 años antes que en otros países de alta endemicidad como Venezuela y Colombia.

P. brasiliensis se consideró por mucho tiempo la única especie causante de esta enfermedad. Fue hasta el 2006 cuando se sugirió la presencia de especies crípticas de la especie *P. brasiliensis* y en el 2009 se da a conocer una especie distinta: *P. lutzii*. De este modo, *P. brasiliensis sensu lato* es un complejo de especies crípticas compuesto por al menos cuatro especies: *P. brasiliensis sensu stricto*, *P. americana*, *P. restrepiensis* y *P. venezuelensis*. Adicionalmente, se ha descrito la existencia de una nueva variedad de *P. brasiliensis*, *P. brasiliensis var. ceti*, y se propuso la inclusión de *Lacazia loboi* dentro del género *Paracoccidioides* spp. Sin embargo, se requieren nuevos estudios con mayor cantidad de muestras clínicas para corroborar dicho hallazgo.

Estudios moleculares demostraron la presencia de *MAT1-1* y *MAT1-2* en el género *Paracoccidioides* spp. Se ha descrito que la mayoría de los aislamientos presentan el locus *MAT-1* y un tercio el locus *MAT-2* y algunos presentan ambos locus lo que le conferiría a *Paracoccidioides* spp. la capacidad de autofecundación sin necesitar otro individuo (homotalismo). Trabajos posteriores han evidenciado los cambios morfológicos que permiten el apareamiento de las hifas y el desarrollo de cuerpos fructíferos de reproducción sexual, llamados cleistotecios, estructuras en las cuales se producen las esporas sexuales o ascosporas. Hasta el momento estas ascosporas no han podido ser cultivadas en el laboratorio.

La zona de distribución de *Paracoccidioides* spp. está limitada a las regiones tropicales de América, en la zona conocida como “reservárea” de la PCM. Se considera que el hongo habitaría el suelo rico en sustancias orgánicas y de pH ácido. En la actualidad, debido a factores como el cambio climático, la deforestación, la urbanización y el aumento de las zonas de agricultura, se espera una extensión de zonas endémicas. Con respecto al reservorio, clásicamente se ha reconocido la importancia del armadillo de nueve y de siete

bandas en la perpetuación del hongo en la naturaleza. Experimentalmente se ha logrado infectar a otros animales como ratones, hámsteres, perros y ganado. En zonas endémicas los perros presentan seroprevalencias hasta el 80 %, tanto para *P. brasiliensis* como para *P. lutzii* en Brasil.

La mayoría de los casos de PCM ocurren en adultos masculinos. En el caso de las mujeres, observaciones realizadas en estudios de laboratorio indican que en presencia de estradiol se da la inhibición del dimorfismo. Esta inhibición se da a nivel transcripcional por modulación de los genes que regulan proteínas de choque térmico, el metabolismo energético y el mantenimiento de la pared celular, entre otras. El período de incubación no se conoce con certeza. Sin embargo, se presume que los síntomas aparecen muchos años después de la primoinfección, siendo este período de 15 años o más. El principal factor de riesgo de esta enfermedad es la ocupación en actividades agrícolas; asociados se encuentran otros factores como el tabaquismo, la malnutrición y la inmunosupresión iatrogénica.

Con respecto a la historia natural de la enfermedad, al igual que con las otras micosis sistémicas, el foco primario del patógeno es pulmonar. A partir de aquí puede darse la eliminación del hongo, o por el contrario este puede diseminarse a ganglios linfáticos y producir lesiones satélites. La diseminación hematogena es posible y puede darse la involucración de múltiples órganos. Puede cursar de forma leve, con síntomas respiratorios, puede evolucionar hacia la destrucción de los tejidos con cicatrización y se puede dar la persistencia de formas fúngicas viables con formación de granuloma y por último pueden progresar y desarrollar los signos y síntomas propios de la enfermedad.

Diversos son los factores de virulencias descritos para las especies del género *Paracoccidioides* spp. los cuales le permiten adaptarse y sobrevivir dentro del hospedero. Antes de lograr instaurarse dentro del hospedero es necesario pasar por las etapas de adherencia, invasión celular y la posterior colonización de los nichos dentro del hospedero. Entre los factores de virulencia más importantes podemos citar las adhesinas, dentro de ellas destaca la glicoproteína Gp43 ya que media la adhesión y la internalización del hongo en las células epiteliales y los macrófagos, esto utilizando elementos de la matriz extracelular como la fibronectina y la laminina. Esta glicoproteína es la diana principal para

el desarrollo de antígenos en pruebas serológicas y moleculares, y para el desarrollo de vacunas.

Al hablar de los factores de virulencia llama la atención el término de “moonlighting protein” el cual se refiere a proteínas que evolucionaron y desarrollaron más funciones que las de su ancestro. Ejemplo de esto son enzimas como la malato sintasa, la triosa fosfato isomerasa y el gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; todas enzimas cumplen una doble función en la adherencia y en vías metabólicas para el mantenimiento de la homeostasis fúngica. Otros factores de virulencia son la producción de melanina, la formación de biopelículas y las vesículas extracelulares, entre otros. Con respecto al dimorfismo del hongo, el cambio de β -1,3-glucano a α -1,3-glucanos favorece la transición de la forma micelial a levaduriforme, además le confiere una ventaja evolutiva como defensa contra el reconocimiento de patrones moleculares por parte del hospedero.

En lo referente a la respuesta inmune contra la PCM se han propuesto tres posibles vías inmunológicas de respuesta ante la interacción entre *Paracoccidioides* spp. y el hospedero. La primera corresponde al hecho de que la mayoría de individuos, no desarrollan la enfermedad debido a la formación de un granuloma y el control de la replicación fúngica, mediante una respuesta T_H1 . Por otro lado, los pacientes con formas graves como la PCM juvenil, desarrollan una respuesta mixta T_H2/T_H9 que produce una respuesta humoral y alérgica ineficaz contra el hongo. Y, por último, los pacientes con PCM crónica producen una respuesta T_H17/T_H22 junto con una respuesta T_H1 deficiente que no permite el control de la infección. La inmunidad humoral no se considera efectiva, de hecho, en individuos con formas severas de la enfermedad se detectan altos títulos de anticuerpos. Múltiples son las manifestaciones de la PCM, siendo estas de un espectro amplio, desde la forma mucocutánea, subcutánea, pulmonar hasta las formas diseminadas con compromiso visceral y óseo. De aquí radica la importancia de reconocer los diferentes diagnósticos diferenciales asociados a cada una de las formas de la PCM, lo que permitirá el diagnóstico oportuno de la enfermedad.

Existe una amplia diversidad de muestras que pueden obtenerse para identificar esta micosis sistémica. Desde una muestra de lesiones de piel, hasta las más invasivas como la aspiración de ganglios, biopsias de órganos internos y médula ósea. Amplia es la variedad de herramientas diagnósticas, desde las técnicas moleculares, la espectrometría de masas,

las técnicas serológicas clásicas como la fijación de complemento y la inmunodifusión; hasta los procedimientos básicos de la micología: el cultivo, el examen directo y la histopatología. Con respecto a este último, este sigue siendo el estándar de oro para establecer el diagnóstico de la enfermedad, sus características morfológicas son patognomónicas, lo cual permite su identificación de forma rápida y con bajo costo económico. Se requiere de un microscopio, KOH al 10 %, solución salina o inclusive, dependiendo del origen de la muestra y su consistencia, una gota de la misma entre porta- y cubreobjetos.

Lo que se necesita es el conocimiento, personal médico que sospeche de PCM y solicite exámenes que orienten el diagnóstico y se requiere también de personal de laboratorio que tenga el criterio para realizar el análisis. Es donde surge de nuevo, como al inicio del presente trabajo, el término de enfermedad olvidada o desatendida. Con respecto a la realidad en la que vivimos actualmente, en presencia del virus SARS-CoV2, es importante estar atentos a los casos de PCM que se puedan presentar debido a la posible reactivación de focos quiescentes y el agravamiento de los síntomas por la coinfección de estas enfermedades con síntomas a nivel respiratorio pueden confundirse o ser subdiagnosticados (482,483).

Por la historia natural de la enfermedad, la cronicidad de los casos, sus secuelas, la tardía instauración del tratamiento y la falta de pruebas diagnósticas estandarizadas, es que podemos considerar que efectivamente la PCM es una enfermedad olvidada o desatendida. Al ser una enfermedad que se presenta mayoritariamente entre pacientes de escasos recursos, la falta de interés económico en establecer pruebas de laboratorio comerciales queda evidenciada, esto si la comparamos por ejemplo con la gran cantidad de medios de diagnóstico comerciales que se ofrecen para otras micosis, que si bien presentan un mayor impacto para los sistemas de salud, se presentan en países desarrollados, donde si existe una mayor oferta comercial para el desarrollo de estas pruebas y que las personas afectadas tienen el recurso económico para acceder a ellas.

Por último, la no obligatoriedad de reportar estos casos hace que la PCM sea aún más invisibilizada, favoreciendo el subregistro. Es importante que el microbiólogo y químico clínico contribuya a la generación de conocimiento, a la publicación de estos casos

y que siempre, ante lesiones que puedan ser características, y tomando en cuenta el historial del paciente, se sospeche y se lleven a cabo los procedimientos para establecer el diagnóstico y de esta manera mejorar la calidad de vida del paciente. Este es el fin de nuestro quehacer como profesionales en salud.

REFERENCIAS

1. Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL, de Queiroz-Telles F, Kono ASG, Paniago AMM, et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017;50(5):715–40.
2. Greer DL, Restrepo M A. La epidemiología de la Paracoccidioidomycosis. *Bol La Of Sanit Panam.* 1977;mayo:(428-445).
3. Canteros CE. Paracoccidioidomycosis: crónica de una enfermedad olvidada. *Rev Med.* 2018;78(3).
4. Martinez R. Epidemiology of paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2015;57(Suppl. 19):11–20.
5. Queiroz-Telles F, Fahal AH, Falci DR, Caceres DH, Chiller T, Pasqualotto AC. Neglected endemic mycoses. *Lancet Infect Dis [Internet].* 2017;17(11):e367–77.
6. Mota J, Pavillard A, Pérez R, Pérez-Ybarra L, León JL. Prevalencia de la infección por Paracoccidioides brasiliensis e Histoplasma capsulatum en agricultores del Caserío La Entrada. Estado Aragua-Venezuela. *Salud trab (Maracay).* 2009;17(1):33–47.
7. Molyneux D. Neglected tropical diseases. *Community eye Heal [Internet].* 2013;26(82):21–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24023397>
8. Guide AT, Workers FORFH. Recognizing neglected tropical diseases through changes on the skin: a training guide for front-line health workers [Internet]. World Health Organization. 2018. 56 p.
9. World Health Organization (WHO). Neglected tropical disease. Mycetoma, chromoblastomycosis and other deep mycoses. [Internet]. who.int. 2021.
10. Chander J. Paracoccidioidomycosis. In: *Textbook of medical mycology.* 4th ed. New Delhi, India: Jaypee Brothers Medical Publishers Ltd.; 2018. p. 379–97.
11. Negróni R. Paracoccidioidomycosis. In: *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases.* Elsevier; 2020. p. 674–7.
12. Wanke B, Aidê MA. Paracoccidioidomycosis. *J Bras Pneumol.* 2009;35(12):1245–9.
13. Ajello L, Polonelli L. Imported paracoccidioidomycosis : A public health problem in non-endemic areas. *Eur J Epidemiol.* 1985;1(3):160–5.
14. Bonifaz A. Paracoccidioidomycosis. In: *Micología Médica Básica [Internet].* 4ta ed. Ciudad de México; 2012. p. 297–309.
15. Lacaz C. South American blastomycosis. *An Fac Med S Paulo.* 1956;39.
16. de Almeida OP, Jorge J, Scully C, Bozzo L. Oral manifestations of paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis). *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol.* 1991;72(4):430–5.
17. De Almeida F, Lacaz CDS. Studies on “Brazilian blastomycosis”. *An Paul Med Cir.* 1943;45(6).
18. Miguel D, Farina A, Espinola CF, Yamanaka W, Bernal M, Villalba J. Paracoccidioidomycosis en la glándula suprarrenal . Reporte de un caso. 2007;l.
19. Madeira JA, Lacaz CDS, Forattini OP. Reflections on a case of generalized blastomycosis (paracoccidioid granuloma), with the isolation of Paracoccidioides brasiliensis from the blood stream. *Hospital (Rio J).* 1947;
20. Del Negro G, Melo E, De Campos EP. Nervous localization of South American blastomycosis.(Review of the literature and report of two cases.). *Rev Hosp Clin, S Paulo.* 1954;9(1).
21. Padilha-Goncalves A. Lutz's mycosis (South American blastomycosis). *Lutz's mycosis (South Am blastomycosis).* 1969;261–76.
22. Fernández E. South American blastomycosis (Lutz Splendore-De Almeida disease). Report of the first case in Honduras. *Dermatologia, Mex.* 1963;7(1):36–45.
23. Lutz A. Uma micose pseudococcídica localizada na boca e observada no Brasil: contribuição ao conhecimento das hifoblastomicoses americanas. *Bras Med.* 1908;22:121–4.
24. De Almeida Soares CM, Mendes-Giannini MJS, Felipe MSS, Chaturvedi V. A centennial: Discovery of Paracoccidioides brasiliensis. *Mycopathologia.* 2008;165(4–5):179–81.
25. Splendore A. Un'affezione micotica con localizzazione nella mucosa della bocca, osservata in Brasile, determinata da funghi appartenenti alla tribudegli Exoascei (Zymonema brasiliense n. sp.). *Angelo Celli nel.* 1912;25:421.
26. de Almeida FP. Differences between the Etiological Agents of Coccidioidal Granuloma in the United States and in Brazil. *New Genus for the Brazilian Fungus. Compte rendu des seances la Soc Biol.* 1930;105(29).
27. Negróni P. Estudio micológico sobre cincuenta casos de micosis observados en Buenos Aires. *Imprenta de la Universidad de Buenos Aires;* 1931.
28. Moses A. Complement-Fixation in Blastomycosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1916;8(2):68–70 pp.
29. da Fonseca Filho O, de Area Leão AE. Diagnóstico diferencial entre as formas brasileiras de blastomycose. *Sci Med.* 1927;5:615.
30. Fava-Neto C. Estudos quantitativos sobre a fixacao do complemento na blastomicose sulamericana com antígenos polissacarídicos. *Arq Cir Clin Exp.* 1955;18:197–254.
31. Fava-Neto C. Contribuição para o estudo imunológico da blastomicose de Lutz (blastomicose sul-americana). *Rev Inst Adolfo Lutz.* 1961;21(1–2):99–194.
32. Ribeiro D de O. Nova terapêutica para a blastomicose. *Publ Med.* 1940;12:36–40.
33. Lacaz CS, Ulson CM, Sampaio SAP. Ação in vitro da anfotericina B sobre o P. brasiliensis. *Rev Paul Med.* 1959;54:357–60.
34. Lacaz C da S, Sampaio S de AP. Tratamento da blastomicose sul-americana com anfotericina B. Resultados preliminares. *Rev Paul Med.* 1958;52:443–50.
35. Gonzalez-Ochoa A. Clasificación clínica de las micosis. *Rev Inst Salubr Enf Trop.* 1956;16:1–8.
36. Mackinnon JE. Pathogenesis of South American blastomycosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1959;53(6).
37. Negróni P. The Paracoccidioides brasiliensis lives saprophytically in the soil of Argentina. *Prensa Med Argent.* 1966;53(39):2381.
38. de Albornoz MB. Isolation of Paracoccidioides brasiliensis from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia.* 1971;9(3):248–53.
39. Naiff RD. Paracoccidioidomycose enzoótica em tatus (Dasypus novemcinctus) no estado do Pará. *Rev Inst Med trop S Paulo.* 1986;19–27.
40. Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus Paracoccidioides brasiliensis as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol.* 2006;23(1):65–73.
41. Desjardins CA, Champion MD, Holder JW, Muszewska A, Goldberg J, Bailão AM, et al. Comparative genomic analysis of human fungal pathogens causing paracoccidioidomycosis. *PLoS Genet.* 2011;7(10):e1002345.

42. De Melo Teixeira M, Theodoro RC, De Oliveira FFM, Machado GC, Hahn RC, Bagagli E, et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. *Med Mycol*. 2014;52(1):19–28.
43. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJA, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol*. 2009;52(2):273–83.
44. Marini MM, Zanforlin T, Santos PC, Barros RRM, Guerra ACP, Puccia R, et al. Identification and characterization of Tc1/mariner-like DNA transposons in genomes of the pathogenic fungi of the *Paracoccidioides* species complex. *BMC Genomics*. 2010;11(1):130.
45. Rotter W, Peña-Chavarría A. Untersuchungen über Blastomykosen in Costa Rica. *Arch f Schiffs-It Trop Hyg*. 1933;37(1):1–10.
46. Trejos A, Romero A. Contribución al estudio de las blastomicosis en Costa Rica. *Rev Biol Trop*. 1953;63–81.
47. O'Daly JA. Las blastomicosis en Venezuela. *Bol Hosp Caracas*. 1937;36:127.
48. Tejos L, Pérez Alfonso R, Cavallera E, Oliver M. *Paracoccidioidomycosis*: Presentación inusual. *Dermatología Venez*. 2003;41(3):19–22.
49. Lemaitre M. Blastomicosis suramericana y otras micosis en Colombia. *Rev del Hosp La Samaritana*. 1950;1:3–13.
50. Torrado E, Castañeda E, de la Hoz F, Restrepo A. *Paracoccidioidomycosis*: definición de las áreas endémicas de Colombia. *Biomédica*. 2000;20(4):327–34.
51. González-Ochoa A, Esquivel-Medina E. Primer caso de granuloma paracoccidioidico (blastomicosis sudamericana) en México. *Rev Med Hosp Gen*. 1950;13:158–9.
52. López-Martínez R, Hernández-Hernández F, Méndez-Tovar LJ, Manzano-Gayosso P, Bonifaz A, Arenas R, et al. *Paracoccidioidomycosis* in Mexico: Clinical and epidemiological data from 93 new cases (1972–2012). *Mycoses*. 2014;57(9):525–30.
53. Peña-Chavarría A, Aguilar M, Fallas M, Castro A. Apuntes sobre un nuevo caso de granuloma paracoccidioides en Costa Rica. *Rev Med Costa Rica*. 1949;8(179):369–75.
54. Saenz Jimenez L, Morera P. Sobre un caso de blastomicosis suramericana asociada a cromomicosis. 1963;
55. Astorga E, Mora W, Rodríguez A. Tratamiento de la paracoccidioidomycosis con ketoconazol (Primer caso en Costa Rica). *Rev Med Costa Rica*. 1986;43(494):1–3.
56. Cordero RB, Zúñiga MAV, Montero EJ. Masculino 49 años con osteomielitis crónica por *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev Clínica Esc Med UCR-HSJD*. 2013;3(9).
57. Fernández K, Quirós Alpízar JL. *Paracoccidioidomycosis* (Reporte de siete casos). 2008;
58. Wigoda AK, Rodríguez LM, Castro FM. *Paracoccidioidomycosis* en la lengua. *Rev Médica Costa Rica y Centroamérica*. 2011;68(599):505–8.
59. Rodríguez-Rojas G, Valverde-Vindas AL. *Paracoccidioidomycosis*: micosis que mimetiza neoplasias Reporte de un caso *Paracoccidioidomycosis*: Mycosis that mimics neoplasms A case report. *Rev Col Microb Quim Clin Costa Rica [Internet]*. 2019;25(2):73–9.
60. Mendes RP, de Souza Cavalcante R, Marques SA, Marques MEA, Venturini J, Sylvestre TF, et al. *Paracoccidioidomycosis*: current perspectives from Brazil. *Open Microbiol J*. 2017;11:224.
61. Walsh TH, Hayden RT, Larone DH. *Larone's Medically Important Fungi: A Guide to Identification*. 6th ed. ASM Press.; 2018. 523pp.
62. Tavares AH, Fernandes L, Bocca AL, Silva-Pereira I, Felipe MS. Transcriptomic reprogramming of genus *Paracoccidioides* in dimorphism and host niches. *Fungal Genet Biol*. 2015;81:98–109.
63. Carbonell LM. Ultrastructure of dimorphic transformation in *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol*. 1969;100(2):1076–82.
64. Niño-Vega GA, Camacho E, Moreno ÁR, Tobón AM, Gómez BL, Teixeira MM, et al. *Paracoccidioides* spp. and *Paracoccidioidomycosis*. In: Mora-Montes HM, Lopes-Bezerra LM, editors. *Current Progress in Medical Mycology [Internet]*. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 281–308.
65. de Camargo ZP, Rodrigues AM. *Paracoccidioides* Complex. *Pocket Guid to Mycol Diagnosis*. 2019;125–34.
66. Queiroz-Telles F. *Paracoccidioides brasiliensis* ultrastructural findings. In: *Paracoccidioidomycosis*. 1994. p. 27–47.
67. da Costa MM, da Silva SHM. Epidemiology, clinical, and therapeutic aspects of paracoccidioidomycosis. *Curr Trop Med Reports*. 2014;1(2):138–44.
68. Bustamante-Simon B, McEwen JG, Tabares AM, Arango M, Restrepo-Moreno A. Characteristics of the conidia produced by the mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia J Med Vet Mycol*. 1985;23(6):407–14.
69. 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*. 1986;24(3):247–50.
70. Theodoro RC, Teixeira M de M, Felipe MSS, Paduan K dos S, Ribolla PM, San-Blas G, et al. Genus *Paracoccidioides*: Species recognition and biogeographic aspects. *PLoS One*. 2012;7(5).
71. Kollath DR, de Melo Teixeira M, Barker BM. Advances in Genomics of Human Fungal Pathogens. In: *Population Genomics: Microorganisms*. Springer; 2018. p. 159–206.
72. Carrero LL, Nino-Vega G, Teixeira MM, Carvalho MJA, Soares CMA, Pereira M, et al. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal Genet Biol*. 2008;45(5):605–12.
73. Salgado-Salazar C, Jones LR, Restrepo A, McEwen JG. The human fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: phylogenetic evidence from five mitochondrial markers. *Cladistics*. 2010;26(6):613–24.
74. Teixeira MM, Theodoro RC, Nino-Vega G, Bagagli E, Felipe MSS. *Paracoccidioides* Species Complex: Ecology, Phylogeny, Sexual Reproduction, and Virulence. *PLoS Pathog*. 2014;10(10):4–7.
75. Harrington TC, Rizzo DM. Defining Species in the Fungi. In: Worrall JJ, editor. *Structure and Dynamics of Fungal Populations*. Dordrecht: Springer Netherlands; 1999. p. 43–71.
76. De Queiroz K. Species concepts and species delimitation. *Syst Biol*. 2007;56(6):879–86.
77. Giraud T, Gladieux P, Hood M. The origin of species in Fungi. *Fungi*. 2010;3(4):23–7.
78. de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. *Atlas of clinical fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS); 2000.

79. Teixeira M de M, Theodoro RC, Derengowski L da S, Nicola AM, Bagagli E, Felipe MS. Molecular and morphological data support the existence of a sexual cycle in species of the genus *Paracoccidioides*. *Eukaryot Cell*. 2013;12(3):380–9.
80. Bell G. The Sexual Nature of the Eukaryote Genome. *J Hered*. 1993 Sep;84(5):351–9.
81. Torres I, García AM, Hernández O, González A, McEwen JG, Restrepo A, et al. Presence and expression of the mating type locus in *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *Fungal Genet Biol*. 2010 Apr;47(4):373–80.
82. Wilson AM, Wilken PM, van der Nest MA, Steenkamp ET, Wingfield MJ, Wingfield BD. Homothallism: an umbrella term for describing diverse sexual behaviours. *IMA Fungus*. 2015;6(1):207–14.
83. Gomes-Rezende JA. Functional and genetic analysis of sexual reproduction in the thermodimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides* spp. Universidade do Minho; 2017.
84. Bayram Ö, Braus GH. Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol Rev*. 2012 Jan;36(1):1–24.
85. Laskowski-Peak MC, Calvo AM, Rohrsen J, George Smulian A. VEA1 is required for cleistothecial formation and virulence in *Histoplasma capsulatum*. *Fungal Genet Biol*. 2012 Oct;49(10):838–46.
86. Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K, et al. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol Evol*. 2007;22(3):148–55.
87. Teixeira M de M, Cattana ME, Matute DR, Muñoz JF, Arechavala A, Isbell K, et al. Genomic diversity of the human pathogen *Paracoccidioides* across the South American continent. *Fungal Genet Biol*. 2020 Jul;140:103395.
88. Cano MIN, Cisalpino PS, Galindo I, Ramírez JL, Mortara RA, da Silveira JF. Electrophoretic karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol*. 1998;36(3):742–7.
89. Montoya AE, Alvarez AL, Moreno MN, Restrepo A, McEwen JG. Electrophoretic karyotype of environmental isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*. 1999;37(3):219–22.
90. Feitosa L dos S, Cisalpino PS, dos Santos MRM, Mortara RA, Barros TF, Moraes F V, et al. Chromosomal polymorphism, syntenic relationships, and ploidy in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol*. 2003;39(1):60–9.
91. Muñoz JF, Farrer RA, Desjardins CA, Gallo JE, Sykes S, Sakthikumar S, et al. Genome diversity, recombination, and virulence across the major lineages of *Paracoccidioides*. *MSphere*. 2016;1(5):e00213-16.
92. Vilela R, Bossart GD, Leger JAS, Dalton LM, Reif JS, Schaefer AM, et al. Cutaneous granulomas in dolphins caused by novel uncultivated *Paracoccidioides brasiliensis*. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(12):2063.
93. Vilela R, Mendoza L. *Paracoccidioidomycosis ceti* (lacaziosis/lobomycosis) in dolphins. In: *Emerging and Epizootic Fungal Infections in Animals*. Springer; 2018. p. 177–96.
94. Furtado JS, de Brito T, Freymuller E. The structure and reproduction of *paracoccidioides brasiliensis* in human tissue. *Med Mycol*. 1967;5(3):226–9.
95. Filler SG, Sheppard DC. Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. *PLoS Pathog*. 2006;2(12):1099–105.
96. de Brito T, Furtado JS, Castro RM, Manini M. Intraepithelial parasitism as an infection mechanism in human *paracoccidioidomycosis* (South American blastomycosis). *Virchows Arch A Pathol Anat*. 1973;361(2):129–38.
97. McEwen JG, Bedoya V, Patiño MM, Salazar ME, Restrepo AM. Experimental murine *paracoccidioidomycosis* induced by the inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol [Internet]*. 1987 May 1;25(3):165–75.
98. Bonifaz A. *Levaduras*. In: *Micología Médica Básica*. 4ta ed. Ciudad de México; 2012. p. 61–79.
99. Chander J. *Fungal Morphology*. In: *Textbook of medical mycology*. 4th ed. New Delhi, India: JP Medical Ltd; 2018. p. 24–38.
100. Rappleye CA, Goldman WE. Defining Virulence Genes in the Dimorphic Fungi. *Annu Rev Microbiol*. 2006;60(1):281–303.
101. Li Z, Nielsen K. Morphology changes in human fungal pathogens upon interaction with the host. *J Fungi*. 2017;3(4):66.
102. Camacho E, Niño-Vega GA. *Paracoccidioides* Spp.: Virulence Factors and Immune-Evasion Strategies. *Mediators Inflamm*. 2017;2017.
103. Chaves AF, Navarro M V., Castilho DG, Calado JCPP, Conceição PM, Batista WL. A conserved dimorphism-regulating histidine kinase controls the dimorphic switching in *Paracoccidioides brasiliensis*. *FEMS Yeast Res [Internet]*. 2016 Jun 5;16(5):1–10.
104. Fernandes L, Paes HC, Tavares AH, Silva SS, Dantas A, Soares CMA, et al. Transcriptional profile of *ras1* and *ras2* and the potential role of farnesylation in the dimorphism of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. *FEMS Yeast Res [Internet]*. 2008 Mar 1;8(2):300–10.
105. Matos TGF, Moraes F V., Campos CBL. Hsp90 regulates *Paracoccidioides brasiliensis* proliferation and ROS levels under thermal stress and cooperates with calcineurin to control yeast to mycelium dimorphism. *Med Mycol*. 2013;51(4):413–21.
106. Campos CBL, Di Benedette JPT, Moraes F V., Ovalle R, Nobrega MP. Evidence for the role of calcineurin in morphogenesis and calcium homeostasis during mycelium-to-yeast dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Eukaryot Cell*. 2008;7(10):1856–64.
107. Nunes LR, Oliveira RC De, Batista D, Schmidt V, Marques R, Eliana M, et al. Transcriptome Analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* Cells Undergoing Mycelium-to-Yeast Transition. *Eukaryot Cell*. 2005;4(12):2115–28.
108. Parise-Fortes MR, Kurokawa CS, Marques SA, Amante Miot H, Alencar Marques ME. Immunology of *paracoccidioidomycosis*. *An Bras Dermatol*. 2011;86(3):516–25.
109. Lima P de S, Casaletti L, Bailão AM, Vasconcelos ATR de, Fernandes G da R, Soares CM de A. Transcriptional and Proteomic Responses to Carbon Starvation in *Paracoccidioides*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(5).
110. Tamayo D, Muñoz JF, Almeida AJ, Puerta JD, Restrepo Á, Cuomo CA, et al. *Paracoccidioides* spp. catalases and their role in antioxidant defense against host defense responses. *Fungal Genet Biol*. 2017;100:22–32.
111. Menino JF, Saraiva M, Gomes-Rezende J, Sturme M, Pedrosa J, Castro AG, et al. P. *brasiliensis* Virulence Is Affected by SconC, the Negative Regulator of Inorganic Sulfur Assimilation. *PLoS One*. 2013;8(9):1–14.
112. Gonzalez A, Hernandez O. New insights into a complex fungal pathogen: The case of *Paracoccidioides* spp.

- Vol. 33, *Yeast*. 2016. p. 113–28.
113. De Oliveira HC, Assato PA, Marcos CM, Scorzoni L, De Paula E Silva ACA, Da Silva J de F, et al. Paracoccidioides-host interaction: An overview on recent advances in the paracoccidioidomycosis. *Front Microbiol*. 2015;6(NOV):1–20.
 114. Santos LA, Grisolia JC, Burger E, de Araujo Paula FB, Dias ALT, Malaquias LCC. Virulence factors of Paracoccidioides brasiliensis as therapeutic targets: a review. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol*. 2020;5.
 115. San-Blas G, San-Blas F, Sorais F, Moreno B, Ruiz-Herrera J. Polyamines in growth and dimorphism of Paracoccidioides brasiliensis. *Arch Microbiol [Internet]*. 1996;166(6):411–3.
 116. San-Blas G, Sorais F, San-Blas F, Ruiz-Herrera J. Ornithine decarboxylase in Paracoccidioides brasiliensis. *Arch Microbiol [Internet]*. 1996;165(5):311–6.
 117. Vieira G de D, Alves T da C, Lima SMD de, Camargo LMA, Sousa CM de. Paracoccidioidomycosis in a western Brazilian Amazon State: clinical-epidemiologic profile and spatial distribution of the disease. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014;47(1):63–8.
 118. Barrozo LV, Benard G, Silva MES, Bagagli E, Marques SA, Mendes RP. First description of a cluster of acute/subacute paracoccidioidomycosis cases and its association with a climatic anomaly. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(3):e643.
 119. Bosco SDMG, Bagagli E. Paracoccidioidomycosis in animals and humans. *Emerg Epizoot Fungal Infect Anim*. 2018;129–45.
 120. Richini-Pereira V, Bosco S, Theodoro R, Barrozo L, Pedrini S, Rosa P, et al. Role of the armadillo Dasypus novemcinctus in the epidemiology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. 1998;144(3):225–8.
 121. Bocca AL, Amaral AC, Teixeira MM, Sato P, Shikanai-Yasuda MA, Soares Felipe MS. Paracoccidioidomycosis: Eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. *Future Microbiol*. 2013;8(9):1177–91.
 122. de Oliveira GG, Belitardo DR, Balarin MRS, Freire RL, de Camargo ZP, Ono MA. Serological survey of paracoccidioidomycosis in cats. *Mycopathologia*. 2013;176(3–4):299–302.
 123. Oliveira GG, Silveira LH, Itano EN, Soares RM, Freire RL, Watanabe MAE, et al. Serological evidence of Paracoccidioides brasiliensis infection in chickens from Paraná and Mato Grosso do Sul States, Brazil. *Mycopathologia*. 2011;171(3):197–202.
 124. Silveira LH, Paes RCS, Medeiros E V, Itano EN, Camargo ZP, Ono MA. Occurrence of antibodies to Paracoccidioides brasiliensis in dairy cattle from Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mycopathologia*. 2008;165(6):367–71.
 125. Belitardo DR, Calefi AS, Borges IK, de Oliveira GG, Sbeghen MR, Itano EN, et al. Detection of antibodies against Paracoccidioides brasiliensis in free-range domestic pigs (Sus scrofa). *Mycopathologia*. 2014;177(1–2):91–5.
 126. Ferreira JB, Navarro IT, Freire RL, Oliveira GG, Omori AM, Belitardo DR, et al. Evaluation of Paracoccidioides brasiliensis infection in dairy goats. *Mycopathologia*. 2013;176(1–2):95–9.
 127. Belitardo DR, Calefi AS, Sbeghen MR, de Oliveira GG, Watanabe MAE, de Camargo ZP, et al. Paracoccidioides brasiliensis infection in domestic rabbits (Oryctolagus cuniculus). *Mycoses*. 2014;57(4):222–7.
 128. Oliveira GG, Navarro IT, Freire RL, Belitardo DR, Silveira LH, Camargo ZP, et al. Serological survey of Paracoccidioidomycosis in sheep. *Mycopathologia*. 2012;173(1):63–8.
 129. Mendes JF, Klafke GB, Albano APN, Cabana ÂL, Teles AJ, de Camargo ZP, et al. Paracoccidioidomycosis infection in domestic and wild mammals by Paracoccidioides lutzii. *Mycoses*. 2017;60(6):402–6.
 130. Bagagli E, Bosco SMG. Armadillos and dimorphic pathogenic fungi: ecological and evolutionary aspects. *Biol Xenarthra*. 2008;103–10.
 131. Trejo-Chávez A, Ramírez-Romero R, Ancer-Rodríguez J, Nevárez-Garza AM, Rodríguez-Tovar LE. Disseminated paracoccidioidomycosis in a Southern two-toed sloth (Choloepus didactylus). *J Comp Pathol*. 2011;144(2–3):231–4.
 132. Ricci G, Mota FT, Wakamatsu A, Serafim RC, Borra RC, Franco M. Canine paracoccidioidomycosis. *Sabouraudia*. 2004;42(4):379–83.
 133. De Farias MR, Condas LAZ, Ribeiro MG, Bosco S de MG, Muro MD, Werner J, et al. Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly. *Mycopathologia*. 2011;172(2):147–52.
 134. Headley SA, Pretto-Giordano LG, Di Santis GW, Gomes LA, Macagnan R, Da Nóbrega DF, et al. Paracoccidioides brasiliensis-associated dermatitis and lymphadenitis in a dog. *Mycopathologia*. 2017;182(3–4):425–34.
 135. Van Dyke MCC, Teixeira MM, Barker BM. Fantastic yeasts and where to find them: the hidden diversity of dimorphic fungal pathogens. *Curr Opin Microbiol*. 2019;52:55–63.
 136. Restrepo A, McEwen JG, Castañeda E. The habitat of Paracoccidioides brasiliensis: how far from solving the riddle?. *Med Mycol*. 2001;39(3):233–41.
 137. Gonçalves AJR, Londero AT, Terra GMF, Rozenbaum R, Abreu TF, Nogueira SA. Paracoccidioidomycosis in children in the state of Rio de Janeiro (Brazil): Geographic distribution and the study of a "reservarea". *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1998;40(1):11–4.
 138. Acar MR, García CL, Santa Cruz FJ. Intradermorreacciones en dermatología. *Dermatologia Rev Mex*. 2008;52(4):160–74.
 139. Kalmar EMN, Alencar FEC, Alves FP, Pang LW, Del Negro GMB, Camargo ZP, et al. Paracoccidioidomycosis: An epidemiologic survey in a pediatric population from the Brazilian Amazon using skin tests. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;71(1):82–6.
 140. Tuder RM, Ibrahim R El, Godoy CE, De Brito T. Pathology of the human pulmonary paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia [Internet]*. 1985;92(3):179–88. Available from: <https://doi.org/10.1007/BF00437631>
 141. Mendes-Giannini MJS, Monteiro Da Silva JL, De Fátima Da Silva J, Donofrio FC, Miranda ET, Andreotti PF, et al. Interactions of Paracoccidioides brasiliensis with host cells: Recent advances. *Mycopathologia [Internet]*. 2008;165(4–5):237–48. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11046-007-9074-z>
 142. dos Santos PO, Rodrigues AM, Fernandes GF, da Silva SHM, Burger E, de Camargo ZP. Immunodiagnosis of Paracoccidioidomycosis due to Paracoccidioides brasiliensis Using a Latex Test: Detection of Specific Antibody Anti-gp43 and Specific Antigen gp43. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(2):1–17.
 143. Lupi O, Tyring SK, McGinnis MR. Tropical dermatology: Fungal tropical diseases. *J Am Acad Dermatol*.

- 2005;53(6):931–51.
144. Rodríguez Molina LM, Tobón Orozco AM. Paracoccidiodomycosis: Global Vision of a Forgotten Endemic Mycosis. *Curr Trop Med Reports*. 2018;5(3):138–43.
 145. Colombo AL, Tobn A, Restrepo A, Queiroz-Telles F, Nucci M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med Mycol*. 2011;49(8):785–98.
 146. Shankar J, Restrepo A, Clemons K V., Stevens DA. Hormones and the resistance of women to paracoccidiodomycosis. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24(2):296–313.
 147. Clemons K V, Shankar J, Stevens DA. Mycologic endocrinology. In: *Microbial Endocrinology: Interkingdom Signaling in Infectious Disease and Health*. Springer; 2016. p. 337–63.
 148. Shankar J, Wu TD, Clemons K V., Monteiro JP, Mirels LF, Stevens DA. Influence of 17 β -estradiol on gene expression of paracoccidiodomycosis during mycelia-to-yeast transition. *PLoS One*. 2011;6(12).
 149. Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidiodomycosis brasiliensis*: Implications for resistance of females to *Paracoccidiodomycosis*. *Infect Immun*. 1984;46(2):346–53.
 150. Derengowski LS, Tavares AH, Silva S, Procópio LS, Felipe MSS, Silva-Pereira I. Upregulation of glyoxylate cycle genes upon *Paracoccidiodomycosis brasiliensis* internalization by murine macrophages and in vitro nutritional stress condition. *Med Mycol*. 2008;46(2):125–34.
 151. Pereira LA, Bão SN, Barbosa MS, Da Silva JLM, Felipe MSS, De Santana JM, et al. Analysis of the *Paracoccidiodomycosis brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. *FEMS Yeast Res*. 2007;7(8):1381–8.
 152. Fernández R, Arenas R. *Paracoccidiodomycosis*. actualización. *Dermatologia Rev Mex*. 2009;53(1):12–21.
 153. Buccheri R, Khoury Z, Barata LCB, Benard G. Incubation Period and Early Natural History Events of the Acute Form of *Paracoccidiodomycosis*: Lessons from Patients with a Single *Paracoccidiodomycosis* spp. Exposure. *Mycopathologia*. 2016;181(5–6):435–9.
 154. Santos WA dos, Silva BM da, Passos ED, Zandonade E, Falqueto A. Association between smoking and paracoccidiodomycosis: a case-control study in the State of Espírito Santo, Brazil. *Cad Saude Publica*. 2003;19(1):245–53.
 155. Costa AN, Benard G, Pereira Albuquerque AL, Fujita CL, Kono Magri AS, Salge JM, et al. The lung in paracoccidiodomycosis: New insights into old problems. *Clinics*. 2013;68(4):441–8.
 156. Marques SA. *Paracoccidiodomycosis*. *Clin Dermatol*. 2012;30(6):610–5.
 157. de Restrepo FM, Restrepo M, Restrepo A. Blood groups and HLA antigens in paracoccidiodomycosis. *Sabouraudia*. 1983 Jan;21(1):35–9.
 158. González NM, Albomoz MB, Rios R, Prado L. *Paracoccidiodomycosis* y su relación con el sistema HLA. In: *2 Encontro sobre Paracoccidiodomycose*. 1983.
 159. Lacerda GB, Arce-Gomez B, Queiroz Telles Filho F. Increased frequency of HLA-B40 in patients with paracoccidiodomycosis. *J Med Vet Mycol*. 1988 Jan;26(4):253–6.
 160. Goldani LZ, Monteiro CMC, Donadi EA, Martinez R, Voltarelli JC. HLA antigens in Brazilian patients with paracoccidiodomycosis. *Mycopathologia*. 1991;114(2):89–91.
 161. Rebelatto CLK. Estudo da associação entre os antígenos HLA-A, B, C, DR e DQ e a paracoccidiodomycose infecção e a forma crônica da paracoccidiodomycose doença. Universidade Federal do Paraná; 1996.
 162. Reis Gavazzoni Dias MF, Carlos Pereira A, Pereira A, Alves MSR. The role of HLA antigens in the development of paracoccidiodomycosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2000 May;14(3):166–71.
 163. Sadahiro A, Roque ACM, Shikanai-Yasuda MA. Generic human leukocyte antigen class II (DRB1 and DQB1) alleles in patients with paracoccidiodomycosis. *Med Mycol*. 2007 Jan;45(1):35–40.
 164. Thorsby E. A short history of HLA. *Tissue Antigens*. 2009 Aug;74(2):101–16.
 165. Blackwell JM, Jamieson SE, Burgner D. HLA and Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2009 Apr;22(2):370–85.
 166. Dendrou CA, Petersen J, Rossjohn J, Fugger L. HLA variation and disease. *Nat Rev Immunol*. 2018 May;18(5):325–39.
 167. Darke C. The HLA-B12 and -B40 cross-reactive groups and their serological relationships. *Tissue Antigens*. 2008 Dec;21(4):281–95.
 168. Nordhagen R. Cross-Reactions in the HLA System Revealed by Red Blood Cells Expressing HLA Determinants, with Particular Reference to Cross-Reaction between HLA-A2 and B17. *Vox Sang*. 1983 Apr;44(4):218–24.
 169. Franco MF, Del Negro G, da Silva Lacaz C, Restrepo-Moreno A. *Paracoccidiodomycosis*. CRC press; 1993.
 170. Barreto MM, Marchiori E, Amorim VB, Zanetti G, Takayassu TC, Escuissato DL, et al. Thoracic paracoccidiodomycosis: radiographic and CT findings. *Radiographics*. 2012;32(1):71–84.
 171. Del Negro G, Lacaz CS, Zamith VA, Siqueira AM. General clinical aspects: polar forms of paracoccidiodomycosis, the disease in childhood. *Paracoccidiodomycosis*. 1994;1:225–32.
 172. López CR, Restrepo MA. Spontaneous regression of pulmonary paracoccidiodomycosis. *Mycopathologia*. 1983;83(3):187–9.
 173. Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NG. *Paracoccidiodomycosis*: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1987;20(2):129–32.
 174. Tronchin G, Pihet M, Lopes-Bezerra L, Bouchara JP. Adherence mechanisms in human pathogenic fungi. *Med Mycol*. 2008;46(8):749–72.
 175. Ferreira MC, Dias De Oliveira RT, Da Silva RM, Lima Blotta MHS, Mamoni RL. Involvement of regulatory T cells in the immunosuppression characteristic of patients with paracoccidiodomycosis. *Infect Immun*. 2010;78(10):4392–401.
 176. de Oliveira HC, da Silva J de F, Scorzoni L, Marcos CM, Rossi SA, de Paula e Silva ACA, et al. Importance of adhesins in virulence of *Paracoccidiodomycosis* spp. *Front Microbiol*. 2015;6(MAR):1–14.
 177. Matute DR, Quesada-Ocampo LM, Rauscher JT, McEwen JG. Evidence for positive selection in putative virulence factors within the *Paracoccidiodomycosis brasiliensis* species complex. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2(9).
 178. Marcos CM, de Oliveira HC, da Silva J de F, Assato PA, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJS. The multifaceted roles of metabolic enzymes in the *Paracoccidiodomycosis* species complex. *Front Microbiol*. 2014;5(DEC):1–10.

179. Niño-Vega GA, Camacho E, Restrepo AM. Current progress in medical mycology. *Curr Prog Med Mycol.* 2017;1–425.
180. de Cássia Orlandi Sardi J, de Souza Pitangui N, Voltan AR, Braz JD, Machado MP, Fusco Almeida AM, et al. In vitro *Paracoccidioides brasiliensis* biofilm and gene expression of adhesins and hydrolytic enzymes. *Virulence.* 2015;6(6):642–51.
181. Vicentini A, Gesztesi J, Franco M. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 *Infect Immun* [Internet]. 1994;62(4):1465–9. Available from: <http://iai.highwire.org/cgi/content/abstract/62/4/1465>
182. Soares Mendes-Giannini MJ, Hanna SA, Monteiro Da Silva JL, Andreotti PF, Vincenzi LR, Benard G, et al. Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. *Microbes Infect.* 2004;6(10):882–91.
183. Puccia R, Travassos LR. The 43-kDa glycoprotein from the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* and its deglycosylated form: Excretion and susceptibility to proteolysis. *Arch Biochem Biophys.* 1991;289(1):298–302.
184. Torres I, Hernandez O, Tamayo D, Muñoz JF, Leitão NP, García AM, et al. Inhibition of PbGP43 Expression May Suggest that gp43 is a Virulence Factor in *Paracoccidioides brasiliensis*. *PLoS One.* 2013;8(7).
185. Vigna AF, Almeida SR, Xander P, Freymüller E, Mariano M, Lopes JD. Granuloma formation in vitro requires B-1 cells and is modulated by *Paracoccidioides brasiliensis* gp43 antigen. *Microbes Infect.* 2006;8(3):589–97.
186. Gardizani TP, Della Coletta AM, Romagnoli GG, Puccia R, Serezani APM, De Campos Soares ÁMV, et al. 43 kDa glycoprotein (gp43) from *paracoccidioides brasiliensis* induced IL-17A and PGE2 production by human polymorphonuclear neutrophils: Involvement of TLR2 and TLR4. *J Immunol Res.* 2019;2019.
187. Mendes-Giannini MJS, Soares CP, Da Silva JLM, Andreotti PF. Interaction of pathogenic fungi with host cells: Molecular and cellular approaches. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005;45(3):383–94.
188. Mendes-Giannini MJ, Moraes RA, Ricci TA. Proteolytic activity of the 43,000 molecular weight antigen secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*. Vol. 32, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.* 1990. p. 384–5.
189. Leitão NP, Vallejo MC, Conceição PM, Camargo ZP, Hahn R, Puccia R. *Paracoccidioides lutzii* Plp43 Is an Active Glucanase with Partial Antigenic Identity with *P. brasiliensis* gp43. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(8):1–9.
190. Hernández O, Almeida AJ, Tamayo D, Torres I, Garcia AM, López A, et al. The hydrolase PbHAD32 participates in the adherence of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to epithelial lung cells. *Med Mycol.* 2012;50(5):533–7.
191. Sluchanko NN, Gusev NB. Moonlighting chaperone-like activity of the universal regulatory 14-3-3 proteins. *FEBS J.* 2017;284(9):1279–95.
192. Marcos CM, da Silva J de F, de Oliveira HC, Assato PA, Singulani J de L, Lopez AM, et al. Decreased expression of 14-3-3 in *Paracoccidioides brasiliensis* confirms its involvement in fungal pathogenesis. *Virulence.* 2016;7(2):72–84.
193. Donofrio FC, Calil ACA, Miranda ET, Almeida AMF, Benard G, Soares CP, et al. Enolase from *Paracoccidioides brasiliensis*: Isolation and identification as a fibronectin-binding protein. *J Med Microbiol.* 2009;58(6):706–13.
194. Hernández O, Almeida AJ, Gonzalez A, Garcia AM, Tamayo D, Cano LE, et al. A 32-kilodalton hydrolase plays an important role in *Paracoccidioides brasiliensis* adherence to host cells and influences pathogenicity. *Infect Immun.* 2010;78(12):5280–6.
195. Nogueira SV, Fonseca FL, Rodrigues ML, Mundodi V, Abi-Chacra EA, Winters MS, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* enolase is a surface protein that binds plasminogen and mediates interaction of yeast forms with host cells. *Infect Immun.* 2010;78(9):4040–50.
196. Dunn MF, Ramírez-Trujillo JA, Hernández-Lucas I. Major roles of isocitrate lyase and malate synthase in bacterial and fungal pathogenesis. *Microbiology.* 2009;155(10):3166–75.
197. de Oliveira KM, da Silva Neto BR, Parente JA, da Silva RA, Quintino GO, Voltan AR, et al. Intermolecular interactions of the malate synthase of *Paracoccidioides* spp. *BMC Microbiol* [Internet]. 2013;13(1):107. Available from: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-107>
198. Bastos KP, Bailão AM, Borges CL, Faria FP, Felipe MSS, Silva MG, et al. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. *BMC Microbiol.* 2007;7(1):29.
199. Tunio SA, Oldfield NJ, Ala'Aldeen DAA, Wooldridge KG, Turner DPJ. The role of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GapA-1) in *Neisseria meningitidis* adherence to human cells. *BMC Microbiol* [Internet]. 2010;10(1):280.
200. Longo LVG, da Cunha JPC, Sobreira TJP, Puccia R. Proteome of cell wall-extracts from pathogenic *Paracoccidioides brasiliensis*: Comparison among morphological phases, isolates, and reported fungal extracellular vesicle proteins. *EuPA Open Proteomics* [Internet]. 2014;3:216–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.euprot.2014.03.003>
201. Barbosa MS, Bão SN, Andreotti PF, De Faria FP, Felipe MSS, Feitosa LDS, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect Immun.* 2006;74(1):382–9.
202. Bailão AM, Schrank A, Borges CL, Dutra V, Molinari-Madlum EEWI, Felipe MSS, et al. Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. *Microbes Infect.* 2006;8(12–13):2686–97.
203. Marsh JJ, Leberherz HG. Fructose-bisphosphate aldolases: an evolutionary history. *Trends Biochem Sci.* 1992;17(3):110–3.
204. Carneiro LC, De Faria FP, Felipe MSS, Pereira M, De Almeida Soares CM. *Paracoccidioides brasiliensis* presents two different cDNAs encoding homologues of the fructose 1,6-bisphosphate aldolase: Protein isolation, cloning of the cDNAs and genes, structural, phylogenetic, and expression analysis. *Fungal Genet Biol.* 2005;42(1):51–60.
205. Tatusov RL, Koonin E V., Lipman DJ. A genomic perspective on protein families. *Science (80-).* 1997;278(5338):631–7.
206. Da Fonseca CA, Jesuino RSA, Felipe MSS, Cunha DA, Brito WA, Soares CMA. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from

- Paracoccidioides brasiliensis. *Microbes Infect.* 2001;3(7):535–42.
207. Chaves EGA. Identificação e Análise de Proteínas Ligantes de Plasminogênio de Paracoccidioides [Internet]. Universidade Federal de Goiás; 2013.
 208. Da Silva Cruz AH, Brock M, Zambuzzi-Carvalho PF, Santos-Silva LK, Troian RF, Gôes AM, et al. Phosphorylation is the major mechanism regulating isocitrate lyase activity in Paracoccidioides brasiliensis yeast cells. *FEBS J.* 2011;278(13):2318–32.
 209. Felipe MSS, Andrade R V., Arraes FBM, Nicola AM, Maranhão AQ, Torres FAG, et al. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus Paracoccidioides brasiliensis in mycelium and yeast cells. *J Biol Chem.* 2005;280(26):24706–14.
 210. Dallo SF, Kannan TR, Blaylock MW, Baseman JB. Elongation factor Tu and E1 β subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in Mycoplasma pneumoniae. *Mol Microbiol.* 2002;46(4):1041–51.
 211. Marcos C, Oliveira H, Silva J, Akemi P, Yamazaki D, Silva R, et al. Identification and characterization of elongation factor Tu (EF-Tu), a novel protein involved in Paracoccidioides brasiliensis -host interaction. *FEMS Yeast Res.* 2016 Sep 14;16:fow079.
 212. Marcos CM, Tamer G, de Oliveira HC, Assato PA, Scorzoni L, Santos CT, et al. Down-regulation of TUFM impairs host cell interaction and virulence by Paracoccidioides brasiliensis. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–15.
 213. Brito W de A, Rezende TC V., Parente AF, Ricart CAO, de Sousa M V.D., Bão SN, et al. Identification, characterization and regulation studies of the aconitase of Paracoccidioides brasiliensis. *Fungal Biol.* 2011;115(8):697–707.
 214. Grossklaus DDA, Melo A, Vieira TC, Borges CL, Adriano M, Oliveira P De, et al. Response to oxidative stress in Paracoccidioides yeast cells as determined by proteomic analysis. *Microbes Infect.* 2012 May;15(5):347–64.
 215. De Assis CM, Gambale W, Paula CR. Production of proteinase and phospholipase by Paracoccidioides brasiliensis. *Mycopathologia.* 1999;146(1):13–7.
 216. Soares DA, De Andrade RV, Silva SS, Bocca AL, Soares Felipe SM, Petrofeza S. Extracellular Paracoccidioides brasiliensis phospholipase B involvement in alveolar macrophage interaction. *BMC Microbiol.* 2010;10.
 217. Puccia R, Vallejo MC, Matsuo AL, Longo LVG. The Paracoccidioides cell wall: Past and present layers toward understanding interaction with the host. *Front Microbiol.* 2011;2(DEC):1–7.
 218. Camacho E, Sepulveda VE, Goldman WE, San-Blas G, Niño-Vega GA. Expression of Paracoccidioides brasiliensis AMY1 in a Histoplasma capsulatum amy1 Mutant, Relates an α -(1,4)-Amylase to Cell Wall α -(1,3)-Glucan Synthesis. *PLoS One.* 2012;7(11):1–13.
 219. Marion CL, Rappleye CA, Engle JT, Goldman WE. An α -(1,4)-amylase is essential for α -(1,3)-glucan production and virulence in Histoplasma capsulatum. *Mol Microbiol.* 2006;62(4):970–83.
 220. Tabora CP, Da Silva MB, Nosanchuk JD, Travassos LR. Melanin as a virulence factor of Paracoccidioides brasiliensis and other dimorphic pathogenic fungi: A minireview. *Mycopathologia.* 2008;165(4–5):331–9.
 221. Gómez BL, Nosanchuk JD, Díez S, Youngchim S, Aisen P, Cano LE, et al. Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal pathogen Paracoccidioides brasiliensis in vitro and during infection. *Infect Immun* [Internet]. 2001 Sep 6;69(9):5760–7.
 222. Urán ME, Nosanchuk JD, Restrepo A, Hamilton AJ, Gómez BL, Cano LE. Detection of antibodies against Paracoccidioides brasiliensis melanin in in vitro and in vivo studies during infection. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18(10):1680–8.
 223. Eisenman HC, Frases S, Nicola AM, Rodrigues ML, Casadevall A. Vesicle-associated melanization in Cryptococcus neoformans. *Microbiology.* 2009;155(12):3860–7.
 224. da Silva MB, Thomaz L, Marques AF, Svidzinski AE, Nosanchuk JD, Casadevall A, et al. Resistance of melanized yeast cells of Paracoccidioides brasiliensis to antimicrobial oxidants and inhibition of phagocytosis using carbohydrates and monoclonal antibody to CD18. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(4):644–8.
 225. Da Silva MB, Marques AF, Nosanchuk JD, Casadevall A, Travassos LR, Tabora CP. Melanin in the dimorphic fungal pathogen Paracoccidioides brasiliensis: Effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes Infect.* 2006;8(1):197–205.
 226. Baltazar LM, Werneck SMC, Soares BM, Ferreira MVL, Souza DG, Pinotti M, et al. Melanin protects Paracoccidioides brasiliensis from the effects of antimicrobial photodynamic inhibition and antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(7):4003–11.
 227. Rodrigues ML, Nosanchuk JD, Schrank A, Vainstein MH, Casadevall A, Nimrichter L. Vesicular transport systems in fungi. *Future Microbiol.* 2011;6(11):1371–81.
 228. Vallejo MC, Matsuo AL, Ganiko L, Medeiros LCS, Miranda K, Silva LS, et al. The pathogenic fungus Paracoccidioides brasiliensis exports extracellular vesicles containing highly immunogenic α -galactosyl epitopes. *Eukaryot Cell.* 2011;10(3):343–51.
 229. Vallejo MC, Nakayasu ES, Matsuo AL, Sobreira TJP, Longo LVG, Ganiko L, et al. Vesicle and Vesicle-Free Extracellular Proteome of Paracoccidioides brasiliensis: Comparative Analysis with other Pathogenic Fungi Milene. *J Proteome Res.* 2013;11(3):1676–85.
 230. Nimrichter L, De Souza MM, Del Poeta M, Nosanchuk JD, Joffe L, Tavares PDM, et al. Extracellular vesicle-associated transitory cell wall components and their impact on the interaction of fungi with host cells. *Front Microbiol.* 2016;7(JUL):1–11.
 231. Da Silva TA, Roque-Barreira MC, Casadevall A, Almeida F. Extracellular vesicles from Paracoccidioides brasiliensis induced M1 polarization in vitro. *Sci Rep.* 2016;6(October):1–10.
 232. Gonzalez A, De Gregori W, Velez D, Restrepo A, Cano LE. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against Paracoccidioides brasiliensis conidia. *Infect Immun.* 2000;68(5):2546–52.
 233. Bocca AL, Hayashi EE, Pinheiro AG, Furlanetto AB, Campanelli AP, Cunha FQ, et al. Treatment of Paracoccidioides brasiliensis-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. *J Immunol* [Internet]. 1998;161(6):3056–63.
 234. Tavares AHFP, Silva SS, Dantas A, Campos ÉG, Andrade R V., Maranhão AQ, et al. Early

- transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. *Microbes Infect.* 2007;9(5):583–90.
235. Kroegel C, Costabel U. Immune functions of constitutive pulmonary cells: the salt in the soup. *Eur Respir J* [Internet]. 1994 Dec 1;7(12):2106 LP – 2107.
 236. Mendes-Giannini MJS, Ricci LC, Uemura MA, Toscano E, Arns CW. Infection and apparent invasion of vero cells by *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* [Internet]. 1994 May 1;32(3):189–97.
 237. Bayles KW, Wesson CA, Liou LE, Fox LK, Bohach GA, Trumble WR. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect Immun.* 1998;66(1):336–42.
 238. Lewis K. Programmed Death in Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64(3):503–14.
 239. Cacere CR, Romano CC, Mendes Giannini MJS, Duarte AJS, Benard G. The role of apoptosis in the antigen-specific T cell hyporesponsiveness of paracoccidioidomycosis patients. *Clin Immunol.* 2002;105(2):215–22.
 240. Lengeler KB, Davidson RC, D'souza C, Harashima T, Shen W-C, Wang P, et al. Signal Transduction Cascades Regulating Fungal Development and Virulence. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64(4):746–85.
 241. Marques ER, Ferreira MES, Drummond RD, Felix JM, Menossi M, Savoldi M, et al. Identification of genes preferentially expressed in the pathogenic yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*, using suppression subtraction hybridization and differential macroarray analysis. *Mol Genet Genomics.* 2004;271(6):667–77.
 242. De Carvalho MJA, Jesuino RSA, Daher BS, Silva-Pereira I, De Freitas SM, Soares CMA, et al. Functional and genetic characterization of calmodulin from the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol.* 2003;39(3):204–10.
 243. Monteiro da Silva JL, Andreotti PF, Benard G, Soares CP, Miranda ET, Mendes-Giannini MJS. Epithelial cells treated with genistein inhibit adhesion and endocytosis of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol.* 2007;92(1):129–35.
 244. Popi AF, Lopes JD, Mariano M. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. *Cell Immunol.* 2002;218(1–2):87–94.
 245. Dias-Melicio LA, Fernandes RK, Rodrigues DR, Golim MA, Soares AMVC. Interleukin-18 increases TLR4 and mannose receptor expression and modulates cytokine production in human monocytes. *Mediators Inflamm.* 2015;2015.
 246. Brito VN, Souto PCS, Cruz-Höfling MA, Ricci LC, Verinaud L. Thymus invasion and atrophy induced by *Paracoccidioides brasiliensis* in BALB/c mice. *Med Mycol.* 2003;41(2):83–7.
 247. Di Gangi R, Alves da Costa T, Thomé R, Peron G, Burger E, Verinaud L. *Paracoccidioides brasiliensis* infection promotes thymic disarrangement and premature egress of mature lymphocytes expressing prohibitive TCRs. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2016;16(1):1–9.
 248. Benard G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 2008;165(4–5):209–21.
 249. de Castro LF, Ferreira MC, da Silva RM, Blotta MH de SL, Longhi LNA, Mamoni RL. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. *J Infect.* 2013;67(5):470–85.
 250. Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannini MJS, Duarte AJS. Imbalance of IL-2, IFN- γ and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine.* 2001;13(4):248–52.
 251. Hernández AS. Células colaboradoras (TH1, TH2, TH17) y reguladoras (Treg, TH3, NKT) en la artritis reumatoide. *Reumatol Clin Supl.* 2009;5(SUPPL. 1):1–5.
 252. Roitt IM, Brostoff J, Male DK. *Inmunología.* 1994;
 253. Calich VLG, Da Costa TA, Felonato M, Arruda C, Bernardino S, Loures FV, et al. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathologia.* 2008;165(4–5):223–36.
 254. Carvalho A, Duarte-Oliveira C, Gonçalves SM, Campos A, Lacerda JF, Cunha C, et al. Host defense pathways against fungi: The basis for vaccines and immunotherapy. *Curr Fungal Infect Rep.* 2017;3(1):16–24.
 255. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(4):275–88.
 256. Pulendran B, Ahmed R. Immunological mechanisms of vaccination. *Nat Immunol.* 2011;12(6):509–17.
 257. Calich VLG, Pina A, Felonato M, Bernardino S, Costa TA, Loures F V. Toll-like receptors and fungal infections: The role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008;53(1):1–7.
 258. Nami S, Mohammadi R, Vakili M, Khezripour K, Mirzaei H, Morovati H. Fungal vaccines, mechanism of actions and immunology: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother.* 2019;109(August):333–44.
 259. Nakaira-Takahagi E, Golim MA, Bannwart CF, Puccia R, Peraçoli MTS. Interactions between TLR2, TLR4, and mannose receptors with gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* induce cytokine production by human monocytes. *Med Mycol.* 2011;49(7):694–703.
 260. Loures FV. Caracterização da função dos lípidios do *Paracoccidioides brasiliensis* e do receptor TLR-4 na interação fungo-hospedeiro. 2007.
 261. Jiménez MDP, Restrepo A, Radzioch D, Cano LE, García LF. Importance of complement 3 and mannose receptors in phagocytosis of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by Nrp1 congenic macrophages lines. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006;47(1):56–66.
 262. Ferreira KS, Lopes JD, Almeida SR. Down-regulation of dendritic cell activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunol Lett.* 2004;94(1–2):107–14.
 263. Hatanaka O, Rezende P, Moreno P, Fernandes F. Galectin-3 Inhibits *Paracoccidioides brasiliensis* Growth and. 2019;4(2):1–10.
 264. Kurita N, Oarada M, Miyaji M, Ito E. Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 2000;38(2):177–82.
 265. Soares A, Calvi SA, Peraçoli MTS, Fernandez AC, Dias LA, Dos Anjos AR. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high-and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunology.* 2001;102(4):480–5.
 266. Pina A, Saldiva PHN, Restrepo LEC, Calich VLG. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. *J Leukoc Biol.* 2006;79(6):1202–13.
 267. Mejía SP, Cano LE, Lopez JA, Hernandez O, Gonzalez A. Human neutrophils produce extracellular traps

- against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiology*. 2015;161(5):1008–17.
268. Valente-Ferreira RC, Calich VLG. Depletion of natural killer cells induces a more severe pulmonary paracoccidioidomycosis in athymic and euthymic BALB/C mice. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2005;47:31.
 269. Chander J. *Textbook of medical mycology*. JP Medical Ltd; 2017.
 270. Fidel PL, Huffnagle GB. *Fungal immunology: from an organ perspective*. 2005. 492 p.
 271. Longhi LNA, da Silva RM, Fornazim MC, Spago MC, de Oliveira RTD, Nowill AE, et al. Phenotypic and Functional Characterization of NK Cells in Human Immune Response against the Dimorphic Fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Immunol*. 2012;189(2):935–45.
 272. Bernardino S, Pina A, Felonato M, Costa TA, Frank de Araújo E, Feriotti C, et al. TNF- α and CD8+ T Cells Mediate the Beneficial Effects of Nitric Oxide Synthase-2 Deficiency in Pulmonary Paracoccidioidomycosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(8).
 273. Nascimento FRF, Calich VLG, Rodríguez D, Russo M. Dual Role for Nitric Oxide in Paracoccidioidomycosis: Essential for Resistance, but Overproduction Associated with Susceptibility. *J Immunol*. 2002;168(9):4593–600.
 274. Nishikaku AS, Molina RFS, Ribeiro LC, Scavone R, Albe BP, Cunha CS, et al. Nitric oxide participation in granulomatous response induced by *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Med Microbiol Immunol*. 2009;198(2):123–35.
 275. Pina A, Bernardino S, Calich VLG. Alveolar macrophages from susceptible mice are more competent than those of resistant mice to control initial *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *J Leukoc Biol*. 2008;83(5):1088–99.
 276. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y-J, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18(1):767–811.
 277. Calich VLG, Kipnis TL, Mariano M, Neto CF, Da Silva WD. The activation of the complement system by *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro: its opsonic effect and possible significance for an in vivo model of infection. *Clin Immunol Immunopathol*. 1979;12(1):20–30.
 278. Cano LE, Kashino SS, Arruda C, André D, Xidieh CF, Singer-Vermes LM, et al. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect Immun*. 1998;66(2):800–6.
 279. Jr GSD, Romani L, Calich VLG, Huffnagle G, Arruda C, Molinari-Madlum E, et al. Knockout mice as experimental models of virulence. *Med Mycol*. 2000;38(sup1):87–98.
 280. Mamoni RL, Blotta MHSL. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. *Cytokine*. 2005;32(1):20–9.
 281. Mello LM, Silva-Vergara ML, Junior VR. Patients with active infection with *Paracoccidioides brasiliensis* present a Th2 immune response characterized by high interleukin-4 and interleukin-5 production. *Hum Immunol*. 2002;63(2):149–54.
 282. Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC, Papaiordanou PMO, Blotta MHSL. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect*. 2002;4(2):139–44.
 283. de Almeida SR, de Moraes JZ, de Camargo ZP, Gesztes J-L, Mariano M, Lopes JD. Pattern of Immune Response to GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* in Susceptible and Resistant Mice Is Influenced by Antigen-Presenting Cells. *Cell Immunol*. 1998;190(1):68–76.
 284. Parise-Fortes MR, Marques SA, Soares AMVC, Kurokawa CS, Marques MEA, Peracoli MTS. Cytokines released from blood monocytes and expressed in mucocutaneous lesions of patients with paracoccidioidomycosis evaluated before and during trimethoprim-sulfamethoxazole treatment. *Br J Dermatol*. 2006;154(4):643–50.
 285. Peracoli MTS, Kurokawa CS, Calvi SA, Mendes RP, Pereira PCM, Marques SA, et al. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect*. 2003;5(5):413–8.
 286. Parise-Fortes MR, Pereira Da Silva MF, Sugizaki MF, Defaveri J, Montenegro MR, Soares AMVC, et al. Experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster: Fungicidal activity and production of inflammatory cytokines by macrophages. *Med Mycol*. 2000;38(1):51–60.
 287. Cassone A. Fungal vaccines: real progress from real challenges. *Lancet Infect Dis*. 2008;8(2):114–24.
 288. Carvalho A, Duarte-Oliveira C, Gonçalves SM, Campos A, Lacerda JF, Cunha C. Fungal Vaccines and Immunotherapeutics: Current Concepts and Future Challenges. *Curr Fungal Infect Rep*. 2017;11(1):16–24.
 289. Cano LE, Singer-Vermes LM, Vaz CA, Russo M, Calich VL. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. *Infect Immun*. 1995;63(5):1777–83.
 290. Mamoni RL, Nouer SA, Oliveira SJ, Musatti CC, Rossi CL, Camargo ZP, et al. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF- β in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Med Mycol*. 2002;40(2):153–9.
 291. Pina A, Valente-Ferreira RC, Molinari-Madlum EEW, Vaz CAC, Keller AC, Calich VLG. Absence of Interleukin-4 Determines Less Severe Pulmonary Paracoccidioidomycosis Associated with Impaired Th2 Response. *Infect Immun*. 2004;72(4):2369–78.
 292. Rodrigues DR, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peracoli MTS, Soares AMVC. *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN- γ , TNF- α and GM-CSF activated human neutrophils: Role for oxygen metabolites. *Med Mycol*. 2007;45(1):27–33.
 293. Tristão FSM, Rocha FA, Carlos D, Ketelut-Carneiro N, Souza COS, Milanezi CM, et al. Th17-inducing cytokines il-6 and il-23 are crucial for granuloma Formation during experimental Paracoccidioidomycosis. *Front Immunol*. 2017;8(AUG):949.
 294. Hunter CA. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(7):521–31.
 295. Wong MT, Ye JJ, Alonso MN, Landrigan A, Cheung RK, Engleman E, et al. Regulation of human Th9 differentiation by type I interferons and IL-21. *Immunol Cell Biol*. 2010;88(6):624–31.
 296. Baida H, Biselli PJC, Juvenale M, Del Negro GMB, Mendes-Giannini MJS, Duarte AJS, et al. Differential antibody isotype expression to the major

- Paracoccidioides brasiliensis antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect.* 1999;1(4):273–8.
297. Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, Crellin NK, Spits H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T H-17, T H 1 and T H 2 cells. *Nat Immunol.* 2009;10(8):864.
 298. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell.* 2008;133(5):775–87.
 299. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei K, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4⁺ CD25⁻ naive T cells to CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.* 2003;198(12):1875–86.
 300. Campanelli AP, Martins GA, Souto JT, Pereira MSF, Livonesi MC, Martinez R, et al. Fas-Fas ligand (CD95-CD95L) and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 engagement mediate T cell unresponsiveness in patients with paracoccidioidomycosis. *J Infect Dis.* 2003;187(9):1496–505.
 301. Calich VLG, Mamoni RL, Loures F V. Regulatory T cells in paracoccidioidomycosis. *Virulence* [Internet]. 2019;10(1):810–21.
 302. Fujio K, Komai T, Inoue M, Morita K, Okamura T, Yamamoto K. Revisiting the regulatory roles of the TGF- β family of cytokines. *Autoimmun Rev.* 2016;15(9):917–22.
 303. Loures F V., Pina A, Felonato M, Feriotti C, de Araújo EF, Calich VLG. MyD88 signaling is required for efficient innate and adaptive immune responses to Paracoccidioides brasiliensis infection. *Infect Immun.* 2011;79(6):2470–80.
 304. Loures F V, Araújo EF, Feriotti C, Bazan SB, Costa TA, Brown GD, et al. Dectin-1 induces M1 macrophages and prominent expansion of CD8⁺ IL-17⁺ cells in pulmonary Paracoccidioidomycosis. *J Infect Dis.* 2014;210(5):762–73.
 305. Feriotti C, de Araújo EF, Loures FV, Costa TA da, Galdino NA de L, Zamboni DS, et al. NOD-like receptor P3 inflammasome controls protective Th1/Th17 immunity against pulmonary paracoccidioidomycosis. *Front Immunol.* 2017;8(JUL):1–15.
 306. Pagliari C, Sotto MN. Dendritic cells and pattern of cytokines in paracoccidioidomycosis skin lesions. *Am J Dermatopathol.* 2003;25(2):107–12.
 307. Arruda C, Valente-Ferreira RC, Pina A, Kashino SS, Fazioli RA, Vaz CAC, et al. Dual role of interleukin-4 (IL-4) in pulmonary paracoccidioidomycosis: Endogenous IL-4 can induce protection or exacerbation of disease depending on the host genetic pattern. *Infect Immun.* 2004;72(7):3932–40.
 308. Batista-Duarte A, Lastre M, Pérez O. Adyuvantes inmunológicos. Determinantes en el balance eficacia-toxicidad de las vacunas contemporáneas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32(2):106–14.
 309. Pagliari C, Pereira NV, Kanashiro L, Stegun FW, Croda J, Duarte MJS, et al. Characterization of cytotoxic immune response in skin and mucosal lesions of paracoccidioidomycosis. *J Cutan Pathol.* 2010;37(5):565–70.
 310. Peracoli MTS, Parise-Fortes MR, Pereira da Silva MF, Montenegro MR. Natural killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the syrian hamster. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. 1995;37(2):129–36.
 311. Acorsi MJ, Dias-Melicio LA, Golim MA, Bordon-Graciani AP, Peraçoli MTS, Soares AMVC. Inhibition of human neutrophil apoptosis by Paracoccidioides brasiliensis: Role of interleukin-8. *Scand J Immunol.* 2009;69(2):73–9.
 312. McInturff JE, Modlin RL, Kim J. The role of toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease. *J Invest Dermatol.* 2005;125(1):1–8.
 313. Bonfim CV, Mamoni RL, Lima Blotta MHS. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by Paracoccidioides brasiliensis. *Med Mycol.* 2009;47(7):722–33.
 314. Galdino NAL, Loures F V., de Araújo EF, da Costa TA, Preite NW, Calich VLG. Depletion of regulatory T cells in ongoing paracoccidioidomycosis rescues protective Th1/Th17 immunity and prevents fatal disease outcome. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–15.
 315. Travassos LR, Taborda CP. Paracoccidioidomycosis vaccine. *Hum Vaccines Immunother.* 2012;8(10):1450–3.
 316. de Amorim J, Magalhaes A, Munoz JE, Rittner GMG, Nosanchuk JD, Travassos LR, et al. DNA vaccine encoding peptide P10 against experimental paracoccidioidomycosis induces long-term protection in presence of regulatory T cells. *Microbes Infect.* 2013;15(3):181–91.
 317. Munoz JE, Luft VD, Amorim J, Magalhães A, Thomaz L, Nosanchuk JD, et al. Immunization with P10 peptide increases specific immunity and protects immunosuppressed BALB/c mice infected with virulent yeasts of Paracoccidioides brasiliensis. *Mycopathologia.* 2014;178(3–4):177–88.
 318. Vasconcellos A, Ambrósio A, Camelo CCS, Barbosa CV, Tomazatti FG, Brazões FA de S, et al. Paracoccidioidomycosis disease (Lutz-Splendore-Almeida) - clinical manifestations. *Rev Médica Minas Gerais.* 2014;24(1):64–70.
 319. Nogueira MGDS, Andrade GMQ, Tonelli E. Clinical evolution of paracoccidioidomycosis in 38 children and teenagers. *Mycopathologia.* 2006;161(2):73–81.
 320. Marques SA. Paracoccidioidomycose: Atualização epidemiológica, clínica, diagnóstica e terapêutica. *An Bras Dermatol.* 2013;88(5):700–11.
 321. Wagner G, Moertl D, Glechner A, Mayr V, Klerings I, Zachariah C, et al. Paracoccidioidomycosis diagnosed in europe—a systematic literature review. *J Fungi.* 2021;7(2):1–25.
 322. Leon LA. La Paracoccidioidomycosis tegumentaria en el Ecuador. *Dermatología Venez.* 1971;10(2).
 323. Queiroz-Telles F, Escussato DL. Pulmonary paracoccidioidomycosis. *Semin Respir Crit Care Med.* 2011;32(6):764–74.
 324. Toro GR, Hernández CA. Leishmaniasis vs esporotricosis y otros diagnósticos diferenciales de la leishmaniasis tegumentaria. *Rev la Asoc Colomb Dermatología y Cirugía Dermatológica.* 1992;1(4):186–98.
 325. Stappaerts I, Bogers J, Ebo D, Broecke E Vanden, Stevens WJ, Van Marck E, et al. c-ANCA positivity in a Belgian patient with pulmonary paracoccidioidomycosis. *Eur Respir J.* 1997;10(10):2419–22.
 326. Diez MB, Montardit AL, Sanz P, Radonich JE, Galván F, Etcheverry M, et al. Paracoccidioidomycosis cutánea. *Arch Argent Dermatol.* 2016;66(6):178–81.
 327. Pedreira R do PG, Guimaraes EP, de Carli ML, de Sá Magalhaes EM, Pereira AAC, Hanemann JAC. Paracoccidioidomycosis mimicking squamous cell carcinoma on the dorsum of the tongue and review of published literature. *Mycopathologia.* 2014;177(5):325–9.

328. Araújo SA, Espindola BM, Pedroso ERP. Cutaneous disseminated paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;86(1):1.
329. Sambourg E, Demar M, Simon S, Blanchet D, Dufour J, Sainte-Marie D, et al. Paracoccidioidomycose localisée au pavillon d'une oreille. In: *Annales de Dermatologie et de Vénérologie.* Elsevier; 2014. p. 514–7.
330. de Macedo PM, Freitas DFS, Quintella LP, Zancopé-Oliveira RM, Almeida-Paes R, do Valle ACF. Mild Paracoccidioidomycosis Misdiagnosed as a Subcutaneous Mycosis. *Mycopathologia.* 2019;184(3):455–6.
331. Marques SA, Lastória JC, de MA Putinatti MS, de Camargo RMP, Marques MEA. Paracoccidioidomycose: lesões cutâneas, infiltrativas, sarcoidose-símile, diagnosticadas como hanseníase tuberculóide. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2008;50(1):47–50.
332. da Costa PSG, Hollanda BVS, de Assis RVC, Costa SMCR, de Carvalho Valle LM. Síndrome oculoglandular de Parinaud associada à paracoccidioidomycose. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2002;44(1):49–52.
333. Ureta Fernández LE, Ordoñez J, Lequini Pechi N, Acuña Zuñiga AM, Perendones Paseyro M. Paracoccidioidomycosis: reporte de un caso clínico. *Rev Uruguaya Med Interna.* 2019;4(3):43–51.
334. Peña CLS, Tarazona MLA, Alarcón IE, Daza MFJ. Paracoccidioidomycosis. Una enfermedad multisistémica. *Acta Médica Colomb.* 2018;43(2):111–4.
335. Quirós Alpizar JL, Jiménez Montero E, Miranda Solís L, Torres Cascante J. Paracoccidioidomycosis pulmonar. *Gac Médica Costa Rica.* 2005;7(1):33–6.
336. Coelho MG, Severo CB, de Mattos Oliveira F, Hochhegger B, Severo LC. Paracoccidioidomycosis mimicking sarcoidosis: a review of 8 cases. *Mycopathologia.* 2016;181(1–2):137–43.
337. Torres Esteche V, Arteta Z, Torres G, Vaucher A, Gezuele E, Balleste R. Un caso excepcional de paracoccidioidomycosis e histoplasmosis pulmonares de presentación concomitante. *J Bras Pneumol.* 2012;38(2):264–8.
338. Lambaré JM, Sanabria G, Taboada A, Nielebock SS, Benítez G. Chronic osteomyelitis to Paracoccidioides brasiliensis. *Rev del Inst Med Trop.* 2017;12(2):38–42.
339. Ghani A, Weinberg M, Pathan N, Vidhun R, Sieber S. Paracoccidioides brasiliensis Infection Mimicking Recurrent Hodgkin Lymphoma: A Case Report and Review of the Literature. *Mycopathologia.* 2018;183(6):973–7.
340. Marques de Macedo P, de Oliveira LC, Freitas DFS, da Rocha JA, Freitas AD, Nucci M, et al. Acute Paracoccidioidomycosis due to Paracoccidioides brasiliensis S1 mimicking hypereosinophilic syndrome with massive splenomegaly: diagnostic challenge. *Public Library of Science San Francisco, CA USA;* 2016.
341. Corti M, Villafañe MF, Trione N, Palmieri O, Negroni R, Yampolsky C, et al. Infección diseminada crónica con abscesos cerebrales múltiples por Paracoccidioides brasiliensis. *Rev argentina Radiol.* 2010;74(3):255–9.
342. Lomazi EA, de Negreiros LMV, Magalhães PVVS, Togni R de CS, de Paiva NM, Ribeiro AF, et al. Intestinal paracoccidioidomycosis resembling Crohn's disease in a teenager: a case report. *J Med Case Rep.* 2018;12(1):1–4.
343. Alves R, Marote J, Armas M, Freitas C, Almeida LS, Sequeira H, et al. Paracoccidioidomycosis: case report. *Med Cutan Ibero Lat Am.* 2013;41(2):63–6.
344. Fioti MFV, Corti M, Arechavala A, Negroni R. Paracoccidioidomycosis diseminada crónica como primera manifestación de SIDA. *Rev Patol Trop Trop Pathol.* 2012;41(2).
345. Dang J, Chanson N, Charlier C, Bonnal C, Jouvion G, Goulenok T, et al. A 54-year-old man with lingual granuloma and multiple pulmonary excavated nodules. *Chest.* 2017;151(1):e13–6.
346. Ramos-e-Silva M, Lopes RS, Trope BM. Cutaneous nocardiosis: A great imitator. *Clin Dermatol.* 2020;38(2):152–9.
347. Garcia I, Barbella R, Dickson S, Diaz S, Pichelbauer E, Hernandez A, et al. Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis) of the larynx mimicking carcinoma. *Am J Med Sci.* 2008;335(2):149–50.
348. Benoldi D, Alinovi A, Pezzarossa E, Bassissi P, Polonelli L. Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis): a report of an imported case previously diagnosed as tuberculosis. *Eur J Epidemiol.* 1985;1(2):150–2.
349. Alvarez DJP, Rosa J, Daián V, Nativ A. Paracoccidioidomycosis. A propósito de 4 casos. *Med Infant.* 2010;17(3).
350. Nogueira SA, Guedes AL, Wanke B, Capella S, Rodrigues K, Abreu TF, et al. Osteomyelitis caused by Paracoccidioides brasiliensis in a child from the metropolitan area of Rio de Janeiro. *J Trop Pediatr.* 2001;47(5):311–5.
351. Quintero-Cusguen P, Parra-Izquierdo V, Calderon CM, Martinez G, Sierra Y. Pseudotumoral neuroparacoccidioidomycosis in an immunocompetent patient. *Acta Neurológica Colomb.* 2013;29(3):203–8.
352. Bertoni TA, Perenha-Viana MCZ, Patussi EV, Cardoso RF, Svidzinski TIE. Western blotting is an efficient tool for differential diagnosis of paracoccidioidomycosis and pulmonary tuberculosis. *Clin vaccine Immunol CVI.* 2012;19(11):1887.
353. Gazzoni FF, Severo LC, Marchiori E, Irlon KL, Guimaraes MD, Godoy MC, et al. Fungal diseases mimicking primary lung cancer: radiologic-pathologic correlation. *Mycoses.* 2014;57(4):197–208.
354. Corti M, Villafañe MF, Negroni R, Palmieri O. Disseminated paracoccidioidomycosis with peripleuritis in an AIDS patient. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2004;46(1):47–50.
355. Navarro AM, Pérez P, Arrunategui AM, Cañas CA. Disseminated paracoccidioidomycosis associated with hypercalcemia and hemophagocytic syndrome. *Acta Medica Colomb.* 2008;33(4):302–4.
356. Valera ET, Mori BM, Engel EE, Costa IS, Brandao DF, Nogueira-Barbosa MH, et al. Fungal infection by Paracoccidioides brasiliensis mimicking bone tumor. *Pediatr Blood Cancer.* 2008;50(6):1284–6.
357. Finamor LP, Muccioli C, Martins MC, Rizzo L V, Belfort Jr R. Ocular and central nervous system paracoccidioidomycosis in a pregnant woman with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Ophthalmol.* 2002;134(3):456–9.
358. Neto GRS, Ganc RL, Colaiacovo R, Bueno FKN, Bernardi FC, Rossini LGB. Paracoccidioidomycosis simulating cancer diagnosed by endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration. *Endoscopy.* 2012;44(S 02):E439–40.
359. Román-González A, Toro JP, Arias LF. Adrenal paracoccidioidomycosis. *Biomédica.* 2020;40:20–2.

360. Gava P, de Melo ASA, Marchiori E, de Magalhães Costa MH, Pereira E, Rangel RDB. Intestinal and appendiceal paracoccidiodomycosis. *Radiol Bras*. 2015;48(2):126.
361. Lopes DL, Araújo S de A, Santos JPL da S, Lyon AC, Dantas DV, Reis BS, et al. Prostatic paracoccidiodomycosis: differential diagnosis of prostate cancer. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(1):33–6.
362. Zancope-Oliveira RM, Pizzini CV, de Medeiros Muniz M, do Valle ACF, Almeida-Paes R. Diagnostic Aspects of Paracoccidiodomycosis. *Curr Trop Med Reports*. 2014;1(2):111–8.
363. Salas Campos I, Gross N. Métodos diagnósticos en micología médica. Montes de Oca: Editorial de la Universidad de Costa Rica; 2012.
364. Fróes H, Caligiorne RB. Fundamentals of paracoccidiodomycosis treatment. *Drug Dev Res*. 2011;72(6):528–37.
365. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A, Microbiologia G De, Bogota S De. Paracoccidiodomycosis: an Update. 1993;6(2):89–117.
366. Araújo López PV, Aguilar Fernandez G. Manual de diagnóstico de las micosis sistémicas. primera. Asunción, Paraguay; 2016.
367. Nucci M, Colombo AL, Queiroz-Telles F. Paracoccidiodomycosis. *Curr Fungal Infect Rep [Internet]*. 2009;3(1):15.
368. Tabora CP, Travassos LR, Benard G. Paracoccidiodomycosis. 2020;
369. McGinnis MR. Laboratory handbook of medical mycology. Elsevier; 2012.
370. Roselló A, Boiso J, Hartung C, Pérez C, Colella MT, Olaizola C, et al. Determinación de un medio de cultivo apropiado para acelerar el crecimiento de paracoccidiodos brasiliensis. *Bol venez infectol*. 2008;45–9.
371. Chakrabarti A, Shivaprakash MR. Medical mycology laboratory procedures. PGIMER, Chandigarh. 2008;57–68.
372. Derengowski LS, De-Souza-Silva C, Braz S V, Mello-De-Sousa TM, Bão SN, Kyaw CM, et al. Antimicrobial effect of farnesol, a *Candida albicans* quorum sensing molecule, on *Paracoccidiodos brasiliensis* growth and morphogenesis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2009;8(1):1–9.
373. Arenas R. Micología: Médica ilustrada. McGraw-Hill Interamericana; 2003.
374. Castañeda E, Ordóñez N, Bustos L, Sánchez J. Diagnóstico por el laboratorio de 87 casos. *Acta Medica Colomb*. 1981;6(4).
375. Robles AM, Arechavala AI, Negroni R, Finquelievich JL. Estudio de algunas técnicas inmunológicas en pacientes con Paracoccidiodomycosis. *Rev argent micol*. 1990;15–25.
376. Negroni R. Normas para el diagnóstico de laboratorio de las micosis. *Rev Patol Trop Trop Pathol*. 1974;3(1).
377. van Gelderen AA. Vigencia de las pruebas intradérmicas en la vigilancia epidemiológica de las micosis endémicas. *Boletín Micológico*. 2013;28(2):33–6.
378. Pavillard AA, Mota JG, Pérez RC, Pérez-Ybarra LM, Luis-León JJ. Reactividad de la prueba dérmica con paracoccidiodina e histoplasmina en agricultores del estado Aragua. *Comunidad y Salud*. 2009;7(2):52–60.
379. Sánchez J, Martínez P, Luis-León JJ, Pérez RC, Mota-Alvarez JG, Pérez-Ybarra LM. Prevalencia de la infección por paracoccidiodos brasiliensis e histoplasma capsulatum en una comunidad agrícola del estado Aragua, Venezuela. *Comunidad y Salud*. 2013;11(2):47–58.
380. Urrego MAG, Rivera MB. Las pruebas serológicas en el diagnóstico de la enfermedad infecciosa. *Rev la Fac Med*. 1999;47(2):89–97.
381. Lomonte B. Técnicas de laboratorio en Inmunología Clínica. 2009;
382. Castillo J, Ordóñez N, López S, de Insignares R, Daza J, Correa A, et al. Paracoccidiodomycosis Diagnóstico por el laboratorio de 333 casos. *Biomedica*. 1994;14(4):230–8.
383. Conti Díaz IA. A propósito del centenario del descubrimiento de la paracoccidiodomycosis. Principales hitos de la evolución de su conocimiento con especial énfasis en las contribuciones científicas nacionales. *Rev Médica del Uruguay*. 2010;26(1):45–50.
384. Sánchez-Saldaña L, Cabanillas-Becerra JJ. Infecciones micóticas sistémicas o profundas: Blastomycosis norteamericana. *Dermatol Perú*. 2010;20(4):250–6.
385. de Camargo ZP. Serology of paracoccidiodomycosis. *Mycopathologia*. 2008;165(4–5):289.
386. da Silva J de F, de Oliveira HC, Marcos CM, Assato PA, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJS. Advances and challenges in paracoccidiodomycosis serology caused by *Paracoccidiodos* species complex: an update. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;84(1):87–94.
387. da Silva SHM, Colombo AL, Blotta MHSL, Lopes JD, Queiroz-Telles F, de Camargo ZP. Detection of circulating gp43 antigen in serum, cerebrospinal fluid, and bronchoalveolar lavage fluid of patients with paracoccidiodomycosis. *J Clin Microbiol*. 2003;41(8):3675.
388. Yarzabal LA, Biguet J, Vaucelle T, Andrieu S, Torres JM, Da Luz S. Analisis inmunquímico de extractos solubles de *Paracoccidiodos brasiliensis*. *Sabouraudia*. 1973;11(1):80–8.
389. Tilton RC. Counterimmunoelectrophoresis in biology and medicine. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci*. 1978;9(4):347–65.
390. Rytel MW. Counterimmunoelectrophoresis: a diagnostic adjunct in clinical microbiology. *Lab Med*. 1980;11(10):655–8.
391. Del Negro G, Garcia NM, Rodrigues EG, Cano MIN, de Aguiar MSM V, Lírio V de S, et al. The sensitivity, specificity and efficiency values of some serological tests used in the diagnosis of paracoccidiodomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1991;33(4):277–80.
392. Lázaro Chávez JV. “Producción de anticuerpos de tipo IgG en *Oryctolagus cuniculus* a las IgY de *Gallus gallus domesticus*”. 2013;
393. Svobodová Z, Jankovičová B, Horák D, Bílková Z. Dot-ELISA affinity test: An easy, low-cost method to estimate binding activity of monoclonal antibodies. *J Anal Bioanal Tech* 2013, vol 50, issue 6. 2013;
394. Tabora CP, Camargo ZP de. Diagnosis of paracoccidiodomycosis by dot immunobinding assay for antibody detection using the purified and specific antigen gp43. *J Clin Microbiol*. 1994;32(2):554.
395. Davelois K, Escalante H, Jara C. Rendimiento diagnóstico del Western Blot para detectar simultáneamente anticuerpos en pacientes con cisticercosis, hidatidosis y fascioliasis humana. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2016;33:616–24.
396. Cunha DA, Zancope-Oliveira RM, Sueli M, Felipe S, Salem-Izacc SM, Depe Jr GS, et al. Heterologous expression, purification, and immunological reactivity of a recombinant HSP60 from

- Paracoccidioides brasiliensis. Clin Diagn Lab Immunol. 2002;9(2):374.
397. Higuera-Gutiérrez LF, Quintero-Quinchía C, Madera-Miranda IC, Cardona-Arias JA. Metanálisis de pruebas inmunológicas para el diagnóstico de la infección por Paracoccidioides, 1972-2017. Infectio. 2019;23(2):167–75.
 398. Pinheiro BG, Hahn RC, de Camargo ZP, Rodrigues AM. Molecular tools for detection and identification of paracoccidioides species: Current status and future perspectives. J Fungi. 2020;6(4):1–24.
 399. Teles FRR, Martins ML. Laboratorial diagnosis of paracoccidioidomycosis and new insights for the future of fungal diagnosis. Talanta. 2011 Oct;85(5):2254–64.
 400. Arantes TD, Theodoro RC, Teixeira M de M, Bagagli E. Use of fluorescent oligonucleotide probes for differentiation between Paracoccidioides brasiliensis and Paracoccidioides lutzii in yeast and mycelial phase. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2017 Feb;112(2):140–5.
 401. Endo S, Komori T, Ricci G, Sano A, Yokoyama K, Otori A, et al. Detection of gp43 of Paracoccidioides brasiliensis by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. FEMS Microbiol Lett. 2004 May;234(1):93–7.
 402. de Almeida Jr JN, Del Negro GMB, Grenfell RC, Vidal MSM, Thomaz DY, De Figueiredo DSY, et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Differentiation of the Dimorphic Fungal Species Paracoccidioides brasiliensis and Paracoccidioides lutzii. Warnock DW, editor. J Clin Microbiol. 2015 Apr;53(4):1383–6.
 403. Comparato Filho OO, Morais F V., Bhattacharjee T, Castilho ML, Raniero L. Rapid identification of Paracoccidioides lutzii and P. Brasiliensis using Fourier Transform Infrared spectroscopy. J Mol Struct. 2019 Feb;1177:152–9.
 404. Gomes GM, Cisalpino PS, Taborda CP, de Camargo ZP. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. J Clin Microbiol. 2000 Sep;38(9):3478–80.
 405. Imai T, Sano A, Mikami Y, Watanabe K, Aoki FH, Branchini MLM, et al. A new PCR primer for the identification of Paracoccidioides brasiliensis based on rRNA sequences coding the internal transcribed spacers (ITS) and 5-8S regions. Med Mycol. 2000 Jan;38(4):323–6.
 406. Pinheiro BG, Pôssa AP, Della Terra PP, de Carvalho JA, Ricci G, Nishikaku AS, et al. A New Duplex PCR-Assay for the Detection and Identification of Paracoccidioides Species. J Fungi. 2021 Feb;7(3):169.
 407. Singh J, Birbian N, Sinha S, Goswami A. A critical review on PCR, its types and applications. Int J Adv Res Biol Sci. 2014;1(7):65–80.
 408. Bialek R, Ibricevic A, Aepinus C, Najvar LK, Fothergill AW, Knobloch J, et al. Detection of Paracoccidioides brasiliensis in tissue samples by a nested PCR assay. J Clin Microbiol. 2000;38(8):2940.
 409. Pitz A de F, Koishi AC, Tavares ER, Andrade FG de, Loth EA, Gandra RF, et al. An optimized one-tube, semi-nested PCR assay for Paracoccidioides brasiliensis detection. Rev Soc Bras Med Trop. 2013 Oct;46(6):783–5.
 410. Semighini CP, de Camargo ZP, Puccia R, Goldman MHS, Goldman GH. Molecular identification of Paracoccidioides brasiliensis by 5' nuclease assay. Diagn Microbiol Infect Dis. 2002 Dec;44(4):383–6.
 411. Buitrago MJ, Merino P, Puente S, Gomez-Lopez A, Arribi A, Zancopé-Oliveira RM, et al. Utility of Real-time PCR for the detection of Paracoccidioides brasiliensis DNA in the diagnosis of imported paracoccidioidomycosis. Med Mycol. 2009 Dec;47(8):879–82.
 412. Rocha-Silva F, Guimarães CF, de Oliveira Júnior ER, de Figueiredo SM, Caligiome RB. Disseminated paracoccidioidomycosis prediagnosed as neoplasm: An important challenge in diagnosis using rt-PCR. Med Mycol Case Rep. 2018 Mar;19:1–5.
 413. Hashim HO, Al-Shuhaib MB. Exploring the Potential and Limitations of PCR-RFLP and PCR-SSCP for SNP Detection: A Review. J Appl Biotechnol Reports. 2019 Dec;6(4):137–44.
 414. Roberto TN, Rodrigues AM, Hahn RC, de Camargo ZP. Identifying Paracoccidioides phylogenetic species by PCR-RFLP of the alpha-tubulin gene. Med Mycol. 2016 Mar;54(3):240–7.
 415. Cocio TA, Nascimento E, von Zeska Kress MR, Bagagli E, Martinez R. Phylogenetic Species of Paracoccidioides spp. Isolated from Clinical and Environmental Samples in a Hyperendemic Area of Paracoccidioidomycosis in Southeastern Brazil. J Fungi. 2020 Aug;6(3):132.
 416. Power EGM. RAPD typing in microbiology—a technical review. J Hosp Infect. 1996 Dec;34(4):247–65.
 417. Hahn RC, Macedo AMAM, Fernandes Fontes CJ, Batista RD, Santos NL, Hamdan JSJS, et al. Randomly Amplified Polymorphic DNA as a Valuable Tool for Epidemiological Studies of Paracoccidioides brasiliensis. J Clin Microbiol. 2003 Jul;41(7):2849–54.
 418. Zhivotovsky LA, Feldman MW. Microsatellite variability and genetic distances. Proc Natl Acad Sci. 1995;92(25):11549–52.
 419. Nascimento E, Martinez R, Rodrigues Lopes A, de Souza Bernardes LA, Pomponio Barco C, Goldman MHS, et al. Detection and Selection of Microsatellites in the Genome of Paracoccidioides brasiliensis as Molecular Markers for Clinical and Epidemiological Studies. J Clin Microbiol. 2004 Nov;42(11):5007–14.
 420. Matute DR, Sepulveda VE, Quesada LM, Goldman GH, Taylor JW, Restrepo A, et al. Microsatellite Analysis of Three Phylogenetic Species of Paracoccidioides brasiliensis. J Clin Microbiol. 2006 Jun;44(6):2153–7.
 421. Alves FL, Ribeiro MA, Hahn RC, de Melo Teixeira M, de Camargo ZP, Cisalpino PS, et al. Transposable elements and two other molecular markers as typing tools for the genus Paracoccidioides. Med Mycol. 2015 Feb;53(2):165–70.
 422. Dhama K, Karthik K, Chakraborty S, Tiwari R, Kapoor S, Kumar A, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP): a new diagnostic tool lights the world of diagnosis of animal and human pathogens: a review. Pak J Biol Sci. 2014;17(2):151–66.
 423. Jensen E. Technical Review: In Situ Hybridization. Anat Rec. 2014 Aug;297(8):1349–53.
 424. Swiger RR, Tucker JD. Fluorescence in situ hybridization: A brief review. Environ Mol Mutagen. 1996;27(4):245–54.
 425. Sanguinetti M, Posteraro B. Identification of molds by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2017;55(2):369.
 426. Jordana-Lluch E, Català EM, Ruiz VA. La espectrometría de masas en el laboratorio de microbiología clínica.

- Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012;30(10):635–44.
427. Fernández A, García C, Saéz JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en Microbiol Clínica Recomendados de la Soc Española Enfermedades Infecc y Microbiol Clínica Ed Emilia Cercenado y Rafael Cantón SEIMC. 2010;
 428. Patel R. A moldy application of MALDI: MALDI-ToF mass spectrometry for fungal identification. *J Fungi*. 2019;5(1):4.
 429. Maldonado I, Ramírez DG, Striebeck P, Lafage M, Caniglia LF. Espectrometría de masas MALDI-TOF: evaluación de la etapa preanalítica para la identificación de hongos miceliales. *Rev Argent Microbiol*. 2017;49(1):7–14.
 430. Faix O. Fourier transform infrared spectroscopy. In: *Methods in lignin chemistry*. Springer; 1992. p. 83–109.
 431. Silva LDC, de Oliveira AA, de Souza DR, Barbosa KLB, E Silva KSF, Carvalho Júnior MAB, et al. Overview of antifungal drugs against paracoccidioidomycosis: How do we start, where are we, and where are we going? *J Fungi*. 2020;6(4):1–21.
 432. Arenas R. Antimicóticos. *Micol médica Ilus México McGraw-Hill*. 2014;398–428.
 433. Theodoro RC, Teixeira M de M, Felipe MSS, Paduan K dos S, Ribolla PM, San-Blas G, et al. Paracoccidioidomycosis en caninos y felinos: hallazgos clínicos, diagnóstico y tratamiento. *Analecta Vet*. 2017;3(1):e1–4.
 434. Chander J. Antifungal Therapy. In: *Textbook of medical mycology*. 4th ed. New Delhi, India: Jaypee Brothers Medical Publishers Ltd.; 2018. p. 102–23.
 435. Shikanai Yasuda MA. Pharmacological management of paracoccidioidomycosis. *Expert Opin Pharmacother*. 2005;6(3):385–97.
 436. Santana MF, Pivoto G, Alexandre MAA, Baía-Da-silva DC, Borba MG da S, Val FA, et al. Confirmed invasive pulmonary aspergillosis and COVID-19: The value of postmortem findings to support antemortem management. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2020;53(June):1–4.
 437. Botero MC, Puentes-Herrera M, Cortés JA. Formas lipídicas de anfotericina. *Rev Chil infectología*. 2014;31(5):518–27.
 438. Almeida SM de. Central nervous system paracoccidioidomycosis: an overview. *Brazilian J Infect Dis*. 2005;9(2):126–33.
 439. Gupta AK, Lyons DCA. The rise and fall of oral ketoconazole. *J Cutan Med Surg*. 2015;19(4):352–7.
 440. Martindale SS. Antifungals. In: *The Complete Drug Reference*. 38th ed. London: Pharmaceutical Press; 2014. p. 563–99.
 441. Vera AM, Casadiego OA, Mantilla JC, Escobar P. Evaluación de formulaciones de ketoconazol para uso tópico en leishmaniasis cutánea por *Leishmania (Viannia)*. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2018;35:476–82.
 442. Ollague JM, de Zurita AM, Calero G. Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis) successfully treated with terbinafine: first case report. *Br J Dermatol*. 2000 Jul;143(1):188–91.
 443. Woods WJ, Belone A de FF, Carneiro LB, Rosa PS. Ten years experience with Jorge Lobo's disease in the state of Acre, Amazon region, Brazil. *Vol. 52, Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo . scielo* ; 2010. p. 273–8.
 444. Pilmis B, Jullien V, Sobel J, Lecuit M, Lortholary O, Charlier C. Antifungal drugs during pregnancy: an updated review. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(1):14–22.
 445. Muanda FT, Sheehy O, Bérard A. Use of trimethoprim-sulfamethoxazole during pregnancy and risk of spontaneous abortion: a nested case control study. *Br J Clin Pharmacol*. 2018;84(6):1198–205.
 446. Pereira RM, Bucarechi F, de Melo Barison E, Hessel G, Tresoldi AT. Paracoccidioidomycose em crianças: apresentação clínica, seguimento e evolução. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2004;46(3):127–31.
 447. Pereira GH, Santos AQ, Park M, Muller PR, Padua S, Marchesi RF, et al. Bone marrow involvement in a patient with paracoccidioidomycosis: a rare presentation of juvenile form. *Mycopathologia*. 2010;170(4):259–61.
 448. Neves MT, Livani B, Belangero WD, Tresoldi AT, Pereira RM. Psoas abscesses caused by *Paracoccidioides brasiliensis* in an adolescent. *Mycopathologia*. 2009;167(2):89–93.
 449. Grysczek RCB, Pereira RM, Kono A, Patzina RA, Tresoldi AT, Shikanai-Yasuda MA, et al. Paradoxical reaction to treatment in 2 patients with severe acute paracoccidioidomycosis: a previously unreported complication and its management with corticosteroids. *Clin Infect Dis*. 2010;50(10):e56–8.
 450. Macedo PM de, Almeida-Paes R, Almeida M de A, Coelho RA, Andrade HB, Ferreira ABTBC, et al. Paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides brasiliensis* S1 plus HIV co-infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(3):167–72.
 451. Peçanha-Pietrobom PM, Colombo AL. Paracoccidioidomycosis in immunocompromised patients: a literature review. *J Fungi*. 2019;5(1):2.
 452. Oliveira AF, Fernandes FF, Mariano VS, Almeida F, Ruas LP, Oliveira LL, et al. Paracoccin distribution supports its role in *Paracoccidioides brasiliensis* growth and dimorphic transformation. *PLoS One*. 2017;12(8):1–14.
 453. Álvarez de Lara MA, García Montemayor V. Ajuste de fármacos en la insuficiencia renal. *Rev Esp Nefrol*. 2017;
 454. Mora RM. Fármacos que deterioran la función renal. *FMC-Formación Médica Contin en Atención Primaria*. 2012;19(8):492–8.
 455. Catalán M, Montejo JC. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. *Rev Iberoam Micol*. 2006;23(1):39–49.
 456. Periañez-Párraga L, Martínez-López I, Ventayol-Bosch P, Puigventós-Latorre F, Delgado-Sánchez O. Drug dosage recommendations in patients with chronic liver disease. *Rev Esp Enferm Dig*. 2012;104(4):165–84.
 457. Shikanai-Yasuda MA. Paracoccidioidomycosis treatment. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015;57:31–7.
 458. Wagner G, Moertl D, Eckhardt A, Sagel U, Wrba F, Dam K, et al. Chronic Paracoccidioidomycosis with adrenal involvement mimicking tuberculosis – A case report from Austria. *Med Mycol Case Rep [Internet]*. 2016;14:12–6.
 459. Thompson GR, Rendon A, Ribeiro Dos Santos R, Queiroz-Telles F, Ostrosky-Zeichner L, Azie N, et al. Isavuconazole Treatment of Cryptococcosis and Dimorphic Mycoses. *Clin Infect Dis*. 2016;63(3):356–62.
 460. Cermeño JR, Alvarado P, Mendoza M, Hernández de Cuesta I. Sensibilidad in vitro de aislados del complejo *Paracoccidioides* spp a antifúngicos sistémicos utilizando el método de microdilución. *Invest Clin*. 2015;56(3):243–64.
 461. McGowan JE, Chesney PJ, Crossley KB, LaForce FM.

- Guidelines for the use of systemic glucocorticosteroids in the management of selected infections. *J Infect Dis*. 1992;165(1):1–13.
462. Barton GM. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest* [Internet]. 2008 Feb 1;118(2):413–20.
463. Benard G, Campos AF, Netto LC, Gonçalves LG, Machado LR, Mimicos E V, et al. Treatment of severe forms of paracoccidioidomycosis: is there a role for corticosteroids? *Med Mycol*. 2012;50(6):641–8.
464. De Paula E Silva ACA, De Oliveira HC, Scorzoni L, Marcos CM, Dos Santos CT, Fusco-Almeida AM, et al. Decyl gallate as a possible inhibitor of N-glycosylation process in paracoccidioides lutzii. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63(11):1–13.
465. Leal PC, Mascarello A, Derita M, Zuljan F, Nunes RJ, Zacchino S, et al. Relation between lipophilicity of alkyl gallates and antifungal activity against yeasts and filamentous fungi. *Bioorg Med Chem Lett* [Internet]. 2009;19(6):1793–6.
466. Ruas LP, Genaro LM, Justo-Junior AS, Coser LO, de Castro LF, Trabasso P, et al. Effect of ArtinM on human blood cells during infection with Paracoccidioides brasiliensis. *Front Microbiol*. 2018;9:867.
467. Coltri KC, Oliveira LL, Ruas LP, Vendruscolo PE, Goldman MH, Panunto-Castelo A, et al. Protection against Paracoccidioides brasiliensis infection conferred by the prophylactic administration of native and recombinant ArtinM. *Med Mycol* [Internet]. 2010 Sep 1;48(6):792–9.
468. Singulani J de L, Galeane MC, Ramos MD, Gomes PC, Dos Santos CT, de Souza BM, et al. Antifungal activity, toxicity, and membranolytic action of a mastoparan analog peptide. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9:419.
469. Izadpanah A, Gallo RL. Antimicrobial peptides. *J Am Acad Dermatol*. 2005;52(3):381–90.
470. Langford ML, Atkin AL, Nickerson KW. Cellular interactions of farnesol, a quorum-sensing molecule produced by *Candida albicans*. *Future Microbiol*. 2009;4(10):1353–62.
471. Hornby JM, Jensen EC, Lisec AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R, et al. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67(7):2982–92.
472. Silva CM de S. Efeitos do farnesol, uma molécula de quorum-sensing de *Candida albicans*, em diferentes isolados de Paracoccidioides brasiliensis. 2009;
473. Mendes G. Triagem, isolamento de substâncias antifúngicas a partir do extrato do fungo aspergillus felis e avaliação da ação antifúngica em paracoccidioides brasiliensis. Universidade Federal de Minas Gerais; 2016.
474. Coelho KIR, Defaveri J, Rezkallah-Iwasso MT, Peraçoli MTS. Experimental Paracoccidioidomycosis. In: Paracoccidioidomycosis. CRC press; 1993. p. 87–107.
475. Tani EM, Franco M, Peraçoli MTS, Montengro MR. Experimental pulmonary paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster: morphology and correlation of lesions with the immune response. *J Med Vet Mycol*. 1987;25(5):291–300.
476. Loth EA, Biazin SK, Paula CR, Simão R de CG, de Franco MF, Puccia R, et al. Experimental Model of Arthritis Induced by Paracoccidioides brasiliensis in Rats. *Mycopathologia*. 2012 Sep;174(3):187–91.
477. Da Costa EO, Netto CF, Rodrigues A, Brito T de. Bovine experimental paracoccidioidomycosis intradermic test standardization. *Sabouraudia*. 1978;16(2):103–13.
478. Greer DL, McMurray DN. Pathogenesis and immune response to Paracoccidioides brasiliensis in the fructivorous bat, *Artibeus lituratus*. *Sabouraudia J Med Vet Mycol*. 1981;19(3):165–78.
479. Rollin BE. Animal Research, Animal Welfare, and the Three R's. *J Philos Sci Law*. 2010;10(2):1–11.
480. Thomaz L, Garcia-Rodas R, Guimaraes AJ, Tabora CP, Zaragoza O, Nosanchuk JD. Galleria mellonella as a model host to study Paracoccidioides lutzii and Histoplasma capsulatum. *Virulence*. 2013;4(2):139–46.
481. Scorzoni L, de Lucas MP, Singulani J de L, de Oliveira HC, Assato PA, Fusco-Almeida AM, et al. Evaluation of Caenorhabditis elegans as a host model for Paracoccidioides brasiliensis and Paracoccidioides lutzii. *Pathog Dis*. 2018 Feb;76(1).
482. Alves AFF, Miranda JRA, Reis F, Oliveira AA, Souza SAS, Fortaleza CMCB, et al. Automatic algorithm for quantifying lung involvement in patients with chronic obstructive pulmonary disease, infection with SARS-CoV-2, paracoccidioidomycosis and no lung disease patients. Woloschak GE, editor. *PLoS One* [Internet]. 2021 Jun 10;16(6):e0251783.
483. de Macedo PM, Freitas DFS, Varon AG, Lamas C da C, Ferreira LCF, Freitas A d'Avila, et al. COVID-19 and acute juvenile paracoccidioidomycosis coinfection. Klingström J, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2020 Aug 10;14(8):e0008559.