

Paracoccidioidomicosis y *Paracoccidioides brasiliensis*

Gioconda San-Blas

Investigadora Titular Emérita, Jefe del Laboratorio de Micología, Centro de Microbiología y Biología Celular, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

E-mail: gsanblas@ivic.ve; <http://pasteur.ivic.ve/mycology>

Resumen

Paracoccidioides brasiliensis es un modelo muy adecuado para el estudio de los eventos bioquímicos y moleculares que regulan la transición morfológica en hongos, en vista de que la temperatura parece ser el único factor involucrado en el proceso. Este hongo es el agente causal de la paracoccidioidomicosis, una micosis sistémica que afecta a los humanos y está geográficamente confinada a América Latina, donde constituye una de las más frecuentes micosis sistémicas en humanos. Con la ayuda de herramientas moleculares, los eventos que regulan la transición dimórfica han sido rastreados en los genes que controlan la síntesis de pared celular, especialmente del glucán y la quitina, así como otros procesos metabólicos tales como la actividad de ornitina decarboxilasa. El diagnóstico molecular y la epidemiología de la paracoccidioidomicosis también son el objeto de investigaciones intensas, hasta el punto de que ya se están proponiendo algunas sondas moleculares para uso clínico y de campo. Los tratamientos clínicos de la micosis son resueltos fundamentalmente con azoles, en razón de la sensibilidad de *P. brasiliensis* a la acción de estas drogas antifúngicas.

Paracoccidioidomicosis y *Paracoccidioides brasiliensis*

Gioconda San-Blas

Investigadora Titular Emérita, Jefe del Laboratorio de Micología, Centro de Microbiología y Biología Celular, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

E-mail: gsanblas@ivic.ve; <http://pasteur.ivic.ve/mycology>

Paracoccidioides brasiliensis es un hongo dimórfico patógeno, causante de la micosis sistémica más frecuente en América Latina, única región geográfica en la que se encuentra este agente. La característica dimórfica, es decir, su capacidad de mudar de una fase micelial (M) saprófita a 23° C (Fig. 1a) a una fase levaduriforme (L) a 37° C (Fig. 1b), está relacionada con la patogenicidad, no sólo en *P. brasiliensis* sino también en otros hongos patógenos como *Histoplasma capsulatum* y *Blastomyces dermatitidis*. Hay factores nutricionales y de temperatura que modulan este fenómeno. En el caso de *P. brasiliensis*, el cambio de temperatura es el único requisito para iniciar el proceso dimórfico [1].

La mayoría de las personas infectadas sólo desarrollan una paracoccidioidomicosis (PCM) asintomática o subclínica, que puede progresar hacia una enfermedad con múltiples formas clínicas [2], que dependen de factores en el huésped o ambientales y de la virulencia fúngica [3]. Una reactividad muy alta a la paracoccidioidina (60-75%) en la población adulta de regiones endémicas, apunta a cifras cercanas a los 10 millones de personas infectadas en América del Sur, aunque sólo es una fracción la que desarrolla la enfermedad [4]. A pesar de que el contacto con *P. brasiliensis* es esencialmente el mismo para personas de cualquier sexo, la PCM es de 13 a 87 veces más frecuente en hombres que en mujeres, por lo cual se presume que hay condiciones hormonales influyendo en el desarrollo de la dolencia [5].

La pared celular de *P. brasiliensis* como un factor de virulencia y blanco de antibióticos específicos

La pared celular fúngica se considera la principal estructura afectada por los cambios morfogénicos ligados a la patogenicidad. Uno de los mejores ejemplos es quizás *P. brasiliensis*, cuya pared celular varía en composición polisacáridica según la fase morfológica. En ambas fases hay quitina, aunque en proporción tres veces mayor en la fase L. Los polímeros de glucosa, en cambio, están casi totalmente bajo la estructura de α -1,3-

glucán en la fase L y como β -1,3-glucán en la fase M. El primero de estos polímeros juega un papel muy importante en las relaciones huésped-parásito, por cuanto se encuentra en muy alta proporción (>45% del peso total de la pared celular) en las cepas virulentas y en menores cantidades en cepas de virulencia menor o mutantes avirulentos (hasta 3%). De allí que el α -1,3-glucán haya sido propuesto como un factor de virulencia, al jugar un papel protector contra las defensas del huésped, en razón de la inhabilidad de las células fagocíticas de digerirlo (Fig. 2) [1, 3]. Este mecanismo de virulencia fue también propuesto más tarde para *H. capsulatum* y *B. dermatitidis* (para una revisión, ver [3]).

Desde un punto de vista molecular, se han descrito un gen (*FKSPb1*) que codifica para la enzima productora del β -1,3-glucán (β -glucán sintetasa) [6] y cinco genes (*PbrCHS1* al *PbrCHS5*) para las enzimas sintetizadoras de quitina (quitina sintetasas) [7, 8]. Con estos datos moleculares, a los cuales se añaden datos bioquímicos de comportamiento de las enzimas sintetizadoras, se procura conocer mejor un sistema que bien puede convertirse en el blanco para la acción de antibióticos más específicos, por cuanto estas estructuras de pared celular fúngica no se repiten en las células de huésped infectado [3]. Siendo así, antibióticos antimicóticos contra algunas de las estructuras de pared celular serían los análogos de la penicilina y sus derivados, cuya acción se circunscribe a bloquear la síntesis del peptidoglicán, estructura específica de pared celular bacteriana. Dando pasos en este sentido, en enero de 2001, la FDA (Food and Drug Administration) de los Estados Unidos aprobó el uso de Cancidas (caspofungin acetate), una equinocandina que bloquea la síntesis de β -glucán fúngico, como una nueva medicación para pacientes que no responden o no toleran las terapias convencionales para la aspergilosis invasiva.

Antibióticos en uso

Los azoles son tal vez el grupo de antifúngicos más usados en nuestros días. Su interferencia en la síntesis del ergosterol de la membrana fúngica conduce a deformaciones estructurales y eventual muerte celular. *P. brasiliensis* es muy sensible a los azoles (Fig. 3). In vitro, las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) fluctúan entre 10^{-10} y 10^{-8} M en la secuencia: saperconazol>itraconazol>ketoconazol [9]. En la práctica médica, el itraconazol (un triazol) y el ketoconazol (un imidazol) son ampliamente usados para el tratamiento de

la PCM [10]. También la anfotericina B deoxicolato es indicada en el tratamiento de casos severos diseminados, con recomendación de hacer terapia de seguimiento con sulfonamida para prevenir recaídas [11].

El ajoene [(E,Z)-4,5,9-trithiadodeca-1,6,11-triene 9-oxide] (Fig. 4), derivado de la alicina, a su vez un producto natural del ajo, es otro compuesto actualmente en exploración como potencial droga antifúngica. Desarrollado en Venezuela en el Laboratorio de Trombosis Experimental del IVIC (Dr. Rafael Apitz), el ajoene ha sido efectivo en el tratamiento tópico de tinea pedis, cruris y corporis, con resultados similares a la terbinafina [12]. El ajoene inhibe el crecimiento de *P. brasiliensis* y la transición dimórfica hacia la fase L. Su efecto radica en el bloqueo de la síntesis de fosfatidil colina, con una acumulación del compuesto precursor fosfatidil etanolamina, lo cual se traduce en una alteración en la estructura de la membrana celular y consecuente muerte celular [13].

Identificación molecular de *P. brasiliensis* con propósitos diagnósticos y epidemiológicos

El diagnóstico concluyente de PCM ha sido basado tradicionalmente en la difícil identificación del hongo causal en muestras provenientes de lesiones del paciente, o en su lugar, a través de métodos indirectos de serología basados en la detección de anticuerpos. El más importante y confiable antígeno de *P. brasiliensis* es la glicoproteína gp43. Sin embargo, ella puede desaparecer de la circulación durante el tratamiento, a la vez que puede reaccionar positivamente con sueros provenientes de otras micosis [14]. Actualmente se están implementando métodos moleculares rápidos y de gran eficiencia como herramientas diagnósticas en micosis diversas. Hasta el momento, varias secuencias de DNA de *P. brasiliensis* han sido reportadas como potenciales sondas diagnósticas, en razón de su alta especificidad y sensibilidad. Goldani et al. [15] reportaron la clonación y secuenciación de un fragmento de 110 pb, del cual se derivaron dos sondas capaces de detectar un fragmento de apenas 62 pb, específico para el hongo. Sin embargo, los autores probaron estas sondas solamente en muestras provenientes de ratones infectados experimentalmente y no en muestras clínicas de pacientes con PCM [16].

Un ensayo por PCR usando sondas derivadas de secuencias del gen *gp43* que codifica para el principal antígeno de *P. brasiliensis*, fue desarrollado para detectar el

hongo en muestras de esputo [17] de 11 pacientes con PCM crónica. En cada una de ellas se produjo una banda única de 0,6 kb, específica para el hongo. A partir de otros ensayos con PCR, Calcagno et al. [18] identificaron dos bandas específicas de *P. brasiliensis* (Fig. 5) cuyo posible valor diagnóstico está actualmente en estudio.

Ese mismo estudio también sirvió para establecer la variabilidad genética de diversas cepas de *P. brasiliensis* por cuanto se pudo determinar una correlación entre las variaciones de DNA y áreas geográficas en América del Sur, de tal forma que 33 cepas del hongo pudieron discriminarse en 5 grupos que separaban a las cepas de origen argentino, brasileño (sólo Estado de São Paulo), colombiano, peruano y venezolano. Mientras tanto, otros trabajos desarrollados con esta misma técnica, lograron una agrupación según grados de virulencia [19]. Estos datos sugieren que *P. brasiliensis* podría consistir de varios grupos genéticamente diferenciados, aunque morfológicamente idénticos, como ya se ha discernido en otros hongos [20, 21], lo que podría explicar la diversidad de características patológicas de la PCM observadas por los micólogos clínicos.

Respuesta inmunológica del huésped

La PCM produce importantes alteraciones patológicas características de una enfermedad granulomatosa crónica. La respuesta inmune del huésped está asociada con hipergammaglobulinemia, elevados niveles de complejos inmunes, activación del sistema de complemento y deficiente inmunidad celular (para una revisión del tema, ver [3]).

El único test serológico confiable de gran especificidad para el diagnóstico de la PCM es el test de inmunodifusión, con el uso del antígeno específico gp43 [22]. Sin embargo, deben recordarse las precauciones ya señaladas en cuanto a la posibilidad de reacciones cruzadas o falsos negativos al usar este antígeno. También se cuenta con métodos serológicos indirectos y desarrollo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra un determinante de 87 kDa [23] y otro de 58 kDa [24], entre varios más.

Los pacientes con PCM presentan una inmunidad humoral hiperactiva, con niveles elevados de IgG, IgE e IgA [25], específicos contra el antígeno gp43 [26]. Al cuarto mes de quimioterapia, se produce una caída en los títulos de anticuerpos contra este antígeno que se correlaciona con mejoría clínica, por lo que se sugirió que estos cambios podrían ser

indicadores útiles de la extensión de la enfermedad activa y valiosos para determinar la prognosis de la infección.

La respuesta celular inmune representa el principal mecanismo de defensa contra la infección por *P. brasiliensis*. Trabajos recientes en el rol defensivo de los neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) sugieren que éstos pueden ser fungistáticos [27]. Los macrófagos obtenidos de ratones infectados con *P. brasiliensis* y tratados con IFN- γ , mostraron una modificación del patrón en la expresión del antígeno del complejo de histocompatibilidad Ia [28], efecto que fue relacionado con la producción de óxido nítrico, principal agente microbicida de los macrófagos. La inmunidad a *P. brasiliensis* puede ser regulada por poblaciones Th1 o Th2. La activación de Th2 lleva a la estimulación de células B y a una ineficiente activación de macrófagos [29], mientras que la resistencia es asociada a una respuesta Th1 [30].

Las paredes celulares de *P. brasiliensis* cumplen un papel fundamental en el proceso inflamatorio observado en la PCM. Cuando una fracción de pared celular, compuesta fundamentalmente por β -glucán y quitina, se inoculó en ratones, produjo una reacción granulomatosa, actividad estimuladora de macrófagos y altos niveles de secreción de mediadores inmunológicos del tipo TNF- α [31]. Esta fracción también indujo una acumulación de macrófagos CD11b/C18 y una respuesta proliferativa de linfocitos CD4+ [32]. Por lo tanto, hay indicios de que la pared celular cumple un papel importante como inmunorregulador de los desórdenes observados en la PCM.

En los actuales momentos, está en prueba la inmunización genética contra la PCM, usando un DNA plasmídico que contiene el gen *gp43*, que induce una respuesta celular tipo 2 en ratones inmunizados con el vector [33].

Conclusiones

En la última década, las investigaciones sobre la PCM y su agente causal han disfrutado de un crecimiento exponencial. Sobre todo, la introducción de métodos moleculares para estudiar la epidemiología y la inmunología han traído nuevos enfoques prometedores para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la dolencia. El antígeno mejor y más ampliamente estudiado hasta ahora a disposición, es el antígeno *gp43* el cual debería ser promovido como antígeno de referencia en todos los laboratorios micológicos clínicos

de la región, sustituyendo las viejas preparaciones de baja especificidad aún en uso en laboratorios remotos de América Latina. Esto ayudaría también a obtener resultados epidemiológicos más confiables. Por otra parte, un mejor conocimiento de la biología de *P. brasiliensis* se traducirá en la clarificación de los mecanismos de patogenicidad y dimorfismo, para un desarrollo racional de drogas antifúngicas altamente específicas y sensibles. Estamos seguros de que en los próximos años veremos un desarrollo estimulante en estos aspectos que conciernen a la más relevante micosis sistémica en América Latina.

BIBLIOGRAFIA

1. San-Blas G, San-Blas F. Biochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* dimorphism. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro A, eds. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press, 1994: 49-66.
2. Franco MF. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 1987; **25**: 5-18.
3. San-Blas G, Niño-Vega G. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In: Cihlar RL, Calderone RA, eds. *Fungal Pathogenesis: Principles and Clinical Applications*. New York: Marcel Dekker, 2001: in press.
4. Restrepo A. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro A, eds. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press, 1994: 121-130.
5. Stevens, DA. The interface of mycology and endocrinology. *J Med Vet Mycol* 1989; **27**: 133-140.
6. Pereira M, Felipe MSS, Brígido MM, Soares CMA, Azevedo MO. Molecular cloning and characterization of a glucan synthase from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast* 2000; **16**: 451-462.
7. Niño-Vega GA, Buurman ET, Gooday GW, San-Blas G, Gow, NAR. Molecular cloning and sequencing of a chitin synthase gene (*CHS2*) of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast* 1998; **14**: 181-187.
8. Niño-Vega GA, Munro CA, San-Blas G, Gooday GW, Gow NAR. Differential expression of chitin synthase genes during temperature-induced dimorphic transition in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol* 2000; **38**: 31-39.

9. San-Blas G, Calcagno AM, San-Blas F. A preliminary study of in vitro antibiotic activity of saperconazole and other azoles on *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* 1993; **31**: 169-174.
10. Wanke B, Londero AT. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: L Ajello, RJ Hay, eds. Medical Mycology; Vol 4 Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. London: Arnold, 1998, pp 395-407.
11. Dietze R, Fowler VG, Steiner TS, Pecanha PM, Corey GR. Failure of amphotericin B colloidal dispersion in the treatment of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 1999; **60**: 837-839.
12. Ledezma E, López JC, Marín P, Romero H, Ferrara G, De Sousa L, Jorquera A, Apitz-Castro R. Ajoene in the topical short-term treatment of tinea cruris and tinea corporis in humans. Randomized comparative study with terbinafine. *Arzneimittelforschung* 1999; **49**: 544-547.
13. San-Blas G, Urbina JA, Marchán E, Contreras LM, Sorais F, San-Blas F. Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by ajoene is associated with blockade of phosphatidylcholine biosynthesis. *Microbiology* 1997; **143**: 1583-1586.
14. Camargo ZP, Baruzzi RG, Maeda SM, Floriano MC. Antigenic relationship between *Loboa lobo* and *Paracoccidioides brasiliensis* as shown by serological methods. *J Med Vet Mycol* 1998; **36**: 413-417.
15. Goldani LZ, Maia AL, Sugar AM. Cloning and nucleotide sequence of a specific DNA fraagment from *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol* 1995; **33**: 1652-1654.
16. Goldani LZ, Sugar AM. Short report: Use of the polymerase chain reaction to detect *Paracoccidioides brasiliensis* in murine paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 1998; **58**: 152-153.
17. Gomes GM, Cisalpino PS, Taborda CP, Camargo ZP. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 3478-3480.
18. Calcagno AM, Niño-Vega G, San-Blas F, San-Blas G. Geographic discrimination of *Paracoccidioides brasiliensis* strains by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol* 1998; **36**: 1733-1736.

19. Molinari-Madlum EEWI, Felipe MSS, Soares CMA. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis. *Med Mycol* 1999; **37**: 269-276.
20. Koufopanou V, Burt A, Taylor JW. Correction: Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 8414-8414.
21. Kasuga T, Taylor, JW White T. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. *J Clin Microbiol* 1999; **37**: 653-663.
22. Puccia R, Takaoka DT, Travassos LR. Purification of the 43 kDa glycoprotein from exocellular components excreted by *Paracoccidioides brasiliensis* in liquid culture (TOM medium). *J Med Vet Mycol* 1991; **29**: 57-60.
23. Gómez BL, Figueroa JI, Hamilton AJ, Ortiz B, Robledo MA, Hay RJ, Restrepo A. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of paracoccidioidomycosis: New strategies for detection of circulating antigens. *J Clin Microbiol* 35:3278-3283, 1997.
24. Figueroa JI, Hamilton AJ, Allen MH, Hay R. Isolation and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* 58 kDa extracellular glycoprotein which is recognized by human immune sera. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995; **89**: 566-572.
25. Arango M, Yarzabal L. T-cell dysfunction and hyperimmunoglobulinemia E in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 1982; **79**: 115-123.
26. Mendes-Giannini MJ, Bueno JP, Shikanai-Yashuda MA, Stolf AMS, Masuda A, Neto VA, Ferreira AW. Antibody response to the 43 kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. *Am J Trop Med Hyg* 1990; **43**: 200-206.
27. Kurita N, Oarada M, Ito E, Miyaji M. Antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol* 1999; **37**: 261-267.
28. Bocca AL, Silva MF, Silva CL, Cunha FQ, Figueiredo F. Macrophage expression of class II major histocompatibility complex gene products in *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice. *Am J Trop Med Hyg* 1999; **61**: 280-287.

29. Calich VLG, Vaz CAC, Burger E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Res Immunol* 1998; **149**: 407-417.
30. Munk ME, Fazioli RA, Calich VLG, Kaufmann SHE. *Paracoccidioides brasiliensis*-stimulated human γ/δ T cells support antibody production by B cells. *Infect Immun* 1995; **63**: 1608-1610.
31. Silva MF, Silva CL. The role of somatic structures of the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* upon B cell activation in experimental paracoccidioidomycosis. *Clin Exp Immunol* 1995; **101**: 321-327.
32. Silva MF, Bocca AL, Ferracini R, Figueiredo F, Silva CL. Cellular requirements for immunomodulatory effects caused by cell wall components of *Paracoccidioides brasiliensis* on antibody production. *Clin Exp Immunol* 1997; **109**: 261-271.
33. Pinto AR, Puccia R, Diniz SN, Franco MF, Travassos LR. DNA-based vaccination against murine paracoccidioidomycosis using the *gp43* gene from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Vaccine* 2000; **18**: 3050-3058.