

IMUNOGLOBULINAS E C₃ NO GRANULOMA PARACOCCIDIÓIDICO

Lilian M. V. BIAGIONI (1), Sonia ORSI (1), Luiz G. CHAMMA (1), Terue SADATSUNE (2);
& Marcello FRANCO (1)

RESUMO

Utilizou-se o modelo experimental de paracoccidioidomicose, em camundongos, induzida pela inoculação endovenosa de suspensão de formas cerebriformes do *P. brasiliensis* (cepa Bt2; 1x10⁶ formas viáveis/animal), para avaliar, após 2, 4, 8, 16 e 20 semanas: 1. A presença de imunoglobulinas e C₃ nos granulomas pulmonares, por imunofluorescência direta; 2. A resposta imune humoral (imunodifusão) e celular (teste do coxim plantar), e 3. A histopatologia das lesões. Os camundongos apresentaram resposta imunocelular positiva desde a 2a. semana, com depressão transitória na 16a. semana, e anticorpos desde a 4a. semana, com pico na 16a. semana. Os granulomas pulmonares foram epitelióides, com numerosos fungos e microabscessos; a extensão das lesões foi progressiva até a 16a. semana, com regressão discreta na 20a. semana. Desde a 2a. semana, houve deposição de IgG e C₃ na parede dos fungos no interior dos granulomas e a presença de células IgG positivas no halo linfomononuclear periférico; estes achados foram máximos entre a 4a. e 16a. semanas. Não se detectou depósito de IgG e C₃ no interstício dos granulomas. IgG e C₃ parecem exercer papel precoce e importante na defesa do hospedeiro contra o *P. brasiliensis*, contribuindo possivelmente para a destruição dos fungos e bloqueando a difusão de antígenos para fora dos granulomas.

UNITERMOS: Paracoccidioidomicose; Granuloma; Imunoglobulinas; Complemento

INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (Pbmicose) é micose profunda causada pelo *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*), caracterizada histologicamente por reação inflamatória crônica granulomatosa. O granuloma paracoccidióidico é de padrão tuberculóide, formado por células epitelióides, células gigantes multinucleadas, macrófagos, linfócitos, plasmócitos, eosinófilos e número variável de fungos; pode haver supuração ou necrose central^{12,13}.

Recentemente, BRITO e col.⁴ descreveram a presença de imunoglobulinas e de C₃ no granuloma da esquistossomose hepática experimental do camundongo; os autores postularam que os anticorpos, difundindo-se pelo granuloma,

interagem e depositam localmente os antígenos, cooperando assim com a resolução do processo.

Outros trabalhos recentes têm também ressaltado o papel dos anticorpos e complemento na patogenia dos granulomas, inflamação que tem sido frequentemente associada à imunidade celular. Assim, RIDLEY e col.¹⁸, estudando o granuloma induzido por complexos imunes BCG-Anti-BCG em ratos, concluíram que as imunoglobulinas desempenham papel na patogênese da tuberculose, sendo que a razão entre antígenos e anticorpos nas lesões é fundamental no balanço entre necrose tecidual e cicatrização.

(1) Departamento de Patologia — Faculdade de Medicina — UNESP. 18610 Botucatu, SP — Brasil.

(2) Disciplina de Microbiologia — Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola — UNESP, Botucatu, SP — Brasil.

Utilizando modelos de infecção experimental pelo *P. brasiliensis* em camundongos, temos estudado a patogenia do granuloma paracoccidíóidico, a fim de melhor compreender o papel da resposta imune celular e humoral no desenvolvimento e cura da infecção. O modelo murino de infecção experimental por via endovenosa se caracteriza por infecção sistêmica progressiva, com formação de granulomas epitelióides, moderada resposta imune humoral e depressão transitória da resposta imune celular² específica anti-*P. brasiliensis*.

No presente trabalho, empregamos este modelo a fim de avaliar — presença de imunoglobulinas e C₃ nos granulomas pulmonares em diferentes fases de infecção, correlacionando-a com as alterações histológicas e a resposta imune.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e grupos experimentais — Foram utilizados 5 grupos de 6 camundongos suíços, brancos, não isogênicos, do sexo masculino, com 28 dias de idade. Os animais de cada grupo foram sacrificados após 2,4, 8, 16 e 20 semanas de inoculação com *P. brasiliensis*. Para cada grupo de animais infectados, houve 2 animais controles que foram injetados com o diluente do inóculo.

Inóculo — Os animais receberam, por via endovenosa, dose única de 0,25 ml de suspensão, em solução salina estéril, de formas cerebriformes da cepa Bt2 do *P. brasiliensis*, cultivadas por 7 dias em meio de FAVA NETO¹⁰. Esta amostra foi recentemente isolada de exsudato de lesão ganglionar de paciente internado no Hospital das Clínicas de Botucatu. A suspensão foi ajustada para 1x10⁶ fungos viáveis/animal. A viabilidade dos fungos foi avaliada por imunofluorescência direta, segundo método de CALICH e col.⁶

AValiação DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA

Antígeno — Utilizou-se antígeno solúvel obtido por ultra-sonicação de formas cerebriformes do *P. brasiliensis*, conforme descrito previamente^{2,16}.

Teste cutâneo de leitura tardia — A resposta imune celular anti-*P. brasiliensis* foi

avaliada "in vivo", 24 horas antes do sacrifício, pelo teste do coxim plantar (TCP)¹³. Foram injetados 0,05 ml do antígeno e 0,05 ml de solução salina estéril, respectivamente no coxim plantar posterior direito (pata teste) e esquerdo (pata controle). Os volumes das patas foram medidos 24 horas após, por pletismografia. Os índices de resposta foram expressos como a diferença entre as patas teste e controle.

Anticorpos anti-*P. brasiliensis* — A presença e a titulação de anticorpos anti-*P. brasiliensis*, nos soros colhidos quando do sacrifício, foram determinados por imunodifusão dupla em gel de ágar, segundo técnica de PERAÇOLI e col.¹⁶.

Deteção de IgG e C₃ no granuloma — Utilizamos reação de imunofluorescência direta em tecido. Para tal, fragmentos de pulmão, obtidos quando do sacrifício, foram congelados em nitrogênio líquido e seccionados em criostato em 4 μ . Os cortes foram lavados em solução salina tamponada com fosfato de sódio dibásico e monobásico pH 7,2 (SST), em 3 banhos de 5 min; em seguida, os cortes foram incubados com conjugados fluoresceïnados anti-IgG, IgM e IgA (Melory Lab — Inc, Springfield — USA) e anti-C₃ (Cappel Lab., Concraville, USA) de camundongo, em câmara úmida, por 30 min a 37°C. Após as lâminas foram lavadas em SST montadas em glicerina tamponada alcalina com carbonato e bicarbonato de sódio e lidas em microscópio de fluorescência com epi-iluminação, Zeiss. Como controle utilizamos cortes nos quais se omitiu o uso dos conjugados.

Estudo anátomo-patológico — Quando do sacrifício, fragmentos de pulmão foram coletados e fixados em solução de formalina a 10%. O material foi preparado pelas técnicas habituais de inclusão, corte e coloração (Hematoxilina-Eosina e Gomori-Grocott para fungos).

As lâminas de pulmão foram analisadas quanto aos seguintes aspectos da resposta inflamatória: extensão das lesões; padrão do granuloma e número de fungos.

Estatística — O método estatístico utilizado nas avaliações foi o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis¹¹.

RESULTADOS

individuais do TCP dos animais infectados e controles estão relacionados na Tabela 1.

Teste cutâneo de leitura tardia — Os índices

T A B E L A I

Índices do teste do coxim plantar dos camundongos infectados (I) e controles (C), sacrificados após 2, 4, 8, 16 e 20 semanas

Sacrifício (semanas)		Índices	Média ± Desvio Padrão	Mediana
2a.	I	0,4 0,8 1,0 1,6 1,7 1,8	1,2 ± 0,6	1,30
	C	0,4 0,4	0,4	
4a.	I	0,7 1,3 1,4 1,5 1,8 NR*	1,1 ± 0,6	1,40
	C	0,3 NR		
8a.	I	0,7 0,9 0,9 1,3 1,4 1,5	1,1 ± 0,3	1,10
	C	0,3 0,6	0,4	
16a.	I	0,3 0,5 0,5 0,6 0,8 1,1	0,6 ± 0,3	0,55
	C	0,4 0,4	0,4	
20a.	I	1,3 1,3 1,5 1,5 1,5 1,6	1,4 ± 0,1	1,50
	C	0,2 0,3	0,2	

* NR = Não realizado or imprevisto técnico.

Os animais controles apresentaram índices que variaram de 0,2 a 0,6 com média de $0,36 \pm 0,11$. O valor da média foi semelhante ao da mediana (0,4) e ao da moda (0,4). A variabilidade dos dados foi pequena e a distribuição simétrica, tendo-se então adotado o valor 0,57, correspondente ao percentil 90, como o limite superior de normalidade.

Com exceção de 4 animais (1 na 2.a semana e 3 na 16.a semana), os demais camundongos, infectados apresentaram positividade do TCP (% + = 86,3%).

Como o teste preliminar de homogeneidade de variância entre os índices dos animais dos grupos infectados demonstrou heterogeneidade ($X^2 = 11$; $p \cong 0,05$), utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis¹¹ para a comparação entre os resultados. Os índices dos animais infectados, em todos os grupos, foram significativamente maiores do que os dos animais controles ($H = 24,356$; $p < 0,001$). Na 16.a semana, os índices dos animais infectados tenderam a apresentar queda (significância para $\alpha = 0,10$). Nas demais semanas, os índices dos camundongos infectados não diferiram entre si.

Anticorpos — anti-P. brasiliensis — A Tabela 2 demonstra os títulos de anticorpos anti-P. brasiliensis. Os camundongos controles não apresentaram anticorpogênese. Nos animais infectados, foram detectados anticorpos específicos

desde a 4.a semana de infecção com pico na 16.a semana.

T A B E L A II

Títulos de anticorpos anti-P. brasiliensis medidos por imunodifusão, nos soros dos camundongos infectados (I) e controles (C), sacrificados após 2, 4, 8, 16 e 20 semanas

Sacrifício (semanas)		Índices	Mediana
2a.	I	Neg Neg Neg Neg Neg Neg	Neg
	C	Neg Neg	
4a.	I	Neg Neg 2 2 4	2
	C	Neg Neg	
8a.	I	Neg 2 2 8 8 16	8
	C	Neg Neg	
16a.	I	2 4 8 8 32 32	16
	C	Neg Neg	
20a.	I	Neg Neg 2 2 2 2	2
	C	Neg Neg	

Deteção de Igs e C₃ através de imunofluorescência direta nos pulmões — A presença ou ausência de IgG, IgM, IgA e C₃ nos granulomas pulmonares, bem como a intensidade da deposição, expressa como a mediana dos achados de 6 animais, estão apresentadas na Tabela 3. Os depósitos envolvendo os fungos foram de IgG e C₃, e caracterizam-se por coloração linear mais ou menos difusa da parede celular. Dois aspectos foram observados: coloração homogênea de toda a parede e coloração isolada da parte interna e/ou externa da parede (Fig. 1). Os depósitos na parede dos fungos de IgG e C₃ foram dis-

cretos na 2a. semana de infecção, tendo-se intensificado e assim se mantido até a 16a. semana; na última semana de sacrifício (20^o), houve diminuição da intensidade de coloração. O

número de células IgG positivas nos granulomas apresentou a mesma variação da fixação de IgG e C₃ na parede dos fungos.

T A B E L A III

Semiquantificação em escala de 0 a 4+ da presença de IgG, IgA, IgM e C₃, por imunofluorescência direta, nos granulomas pulmonares. Os valores representam a mediana de 6 animais/semana

Sacrifício (semanas)	Parede de Fungos				Células nos granulomas positivas para:			
	IgG	IgA	IgM	C ₃	IgG	IgA	IgM	IgM
2. ^a	1+	Neg	Neg	1+	1+	Neg	Neg	Neg
4. ^a	3+	Neg	Neg	3+	3+	1+	Neg	Neg
8. ^a	3+	Neg	Neg	4+	4+	Neg	Neg	Neg
16. ^a	3+	Neg	Neg	4+	4+	Neg	Neg	Neg
20. ^a	2+	Neg	Neg	3+	2+	Neg	Neg	Neg

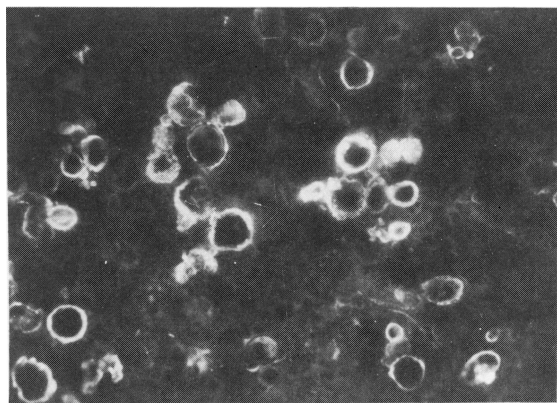


Fig. 1 — Imunofluorescência direta — granuloma pulmonar — 8a. semana de infecção: depósito de C₃ nos fungos, corando total ou parcialmente a parede; depósitos de IgG mostraram padrão semelhante (400 X).

Não foram observados depósitos intersticiais de imunoglobulinas e de C₃, quer sob forma de linhas ou de grumos. Os cortes usados como controle nos quais se omitiu o uso dos conjugados não apresentaram coloração.

Histopatologia — Os achados foram homogêneos em cada semana. Desde a 2a. semana, observou-se a formação de granulomas epitelióides bem definidos, compactos, com número moderado de fungos em multiplicação e microabscessos. A partir da 4a. semana, os granulomas passaram a apresentar halo linfomonuclear evidente. Na 8a. semana, o processo foi mais intenso com intensificação à confluência das lesões (Fig. 2). Na 16a. semana, a intensidade da inflamação foi máxima, notando-se tendência dos granulomas de se localizar em torno da trama vaso-brônquica, em manguito.

Este aspecto persistiu na 20a. semana, sendo porém as lesões menos intensas e com halo linfomonuclear menos exuberante. A partir da 16a. semana, os granulomas eram constituídos predominantemente por células epitelióides, com grande número de fungos em multiplicação. Quanto aos plasmócitos, observou-se na 2a. semana de infecção número muito pequeno de plasmócitos nos granulomas, no entanto observam-se vários plasmócitos geralmente isolados nas paredes alveolares. Na 4a. semana, em alguns dos animais, nota-se um número maior de plasmócitos que, ao lado de linfócitos se dispõem em um halo ao redor dos granulomas. Em um dos animais no entanto, observa-se grande número de plasmócitos não só ao redor dos granulomas como também nos tecidos frouxos que envolvem os brônquios. Nos animais do 8a. semana o número de plasmócitos é semelhante ao observado nos animais da 4a. semana. Nos animais da 16a. e 20a. semanas, praticamente não se observam halos linfoplasmocitários ao redor dos granulomas.

DISCUSSÃO

A infecção experimental por via endovenosa de camundongos, com amostra de *P. brasiliensis* isolada recentemente de paciente da área endêmica de Botucatu, induziu doença pulmonar evolutiva, granulomatosa, de intensidade máxima na 16a. semana. No geral, o padrão do granuloma obedeceu ao observado em experimentos prévios^{2,21}, sendo constituído por células epitelióides e numerosos fungos, com microabscessos e halolinfomonuclear. Como também relatado anteriormente, os camun-

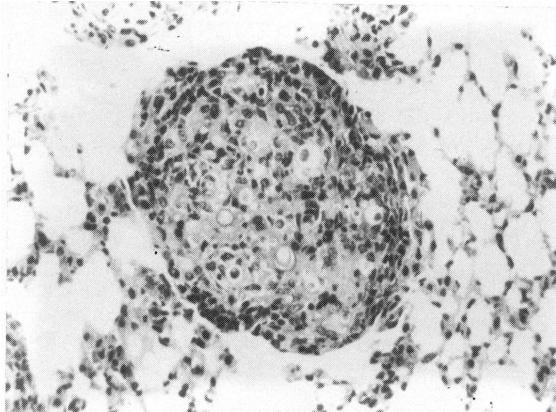


Fig. 2 — Pulmão — 8a. semana de infecção: granuloma epitelióide com numerosos fungos no interior e halo de células linfo-mononucleares. Há raros plasmócitos. (HE; 320 X).

ongos desenvolveram resposta imune celular e humoral anti-*P. brasiliensis* desde a fase precoce da infecção². Deve ser ressaltado que a anticorpo-gênese máxima foi detectada na 16a. semana, quando houve diminuição dos índices de resposta imune celular. Esta alternância entre resposta humoral e celular tem sido descrita na paracoccidioidomicose humana^{3,14} e experimental¹⁶, bem como em outras micoses profundas²⁰. Como uma das explicações para este fenômeno, tem-se demonstrado a ação inibidora de anticorpos e/ou complexos imunes anti-*P. brasiliensis* sobre a expressão da resposta imune-celular^{1,8}.

Vários artigos da literatura parecem indicar que a morfogênese do granuloma paracoccidióidico está basicamente ligada à imunidade celular. Assim, entre outros indícios podemos citar: o aspecto de granulomas frouxos, com grande número de fungos, em pacientes ou em modelos experimentais com formas graves e disseminadas da doença e intensa imunodepressão celular^{14,15}; a incapacidade de camundongos atímicos de formar inflamação granulomatosa eficiente na destruição do parasita¹⁹; a eficácia do uso experimental de estimulantes da resposta imune celular (levamisole; fator de transferência) na manutenção de granulomas efetivos no bloqueio da multiplicação do fungo e da disseminação da doença^{16,17}.

No presente trabalho, investigamos o papel da imunidade humoral na patogenia do granuloma pulmonar anti-*P. brasiliensis* em camundongos. Documentou-se, por imunofluorescên-

cia direta, a presença de IgG e de C_3 na parede dos fungos nos granulomas, desde as fases iniciais da infecção. A presença de C_3 pode ter ocorrido pela capacidade do fungo de ativar o sistema complemento por via alternada⁵ ou mais provável que seja decorrente de sua ativação por via clássica pela reação antígeno-anticorpo na parede do fungo, já que IgG foi detectada na mesma localização. Houve correlação entre a presença de IgG e de plasmócitos nas lesões.

A fixação precoce de anticorpos nos fungos no interior dos granulomas pode exercer papel no bloqueio da difusão intersticial de antígenos. Como tem sido demonstrada na paracoccidioidomicose a ocorrência de lesão intersticial relacionada apenas com a presença de antígenos do *P. brasiliensis*¹², pode ser sugerido que os anticorpos, bloqueando a difusão antigênica, exercem ação protetora, diminuindo o dano tecidual causado pela doença. A fixação precoce do complemento nos fungos teria também papel protetor importante, já que há evidências de que o complemento pode eliminar o parasita, quer através de efeito opsonizante⁵ ou lítico¹⁵. Ao contrário do granuloma esquistossomótico, não se detectaram depósitos intersticiais de imunoglobulinas e de C_3 no seio do granuloma paracoccidióidico, fato que reforça a hipótese de bloqueio dos antígenos ao nível dos fungos.

No conjunto, podemos sugerir o seguinte papel para os anticorpos e o sistema complemento na modulação do granuloma anti-*P. brasiliensis*: os fungos instalam-se nos tecidos, causando lesão inicial, com conseqüente afluxo de leucócitos, especialmente neutrófilos e macrófagos; os macrófagos são ativados e liberam um fator quimiotático para neutrófilos⁷, que aportam em maior número, aumentando as defesas locais; se estas não foram suficientes, os parasitas multiplicam-se e os macrófagos organizam-se em granulomas; o estabelecimento da resposta imune celular anti-*P. brasiliensis* coopera com a organização e a atividade fungicida do granuloma; os anticorpos específicos fixam-se nos fungos, bloqueando a difusão antigênica; a reação antígeno-anticorpo a este nível ativa o sistema complemento, facilitando a destruição dos parasitas por fagocitose ou por lise, e a liberação de fatores líticos por células

do granuloma, aumentando a presença local de defesas (proteases, radicais livres de oxigênio)⁹.

Os fungos são estruturas menores do que os ovos de *S. mansoni*, sendo que sua destruição e lise completa deve ocorrer mais rapidamente, possibilitando um clareamento dos granulomas sem a formação de tecido de granulação e fibrose envolvente. Foi nesta área fibrosa periférica, que BRITO e col.⁴ detectaram a maior deposição de imunoglobulinas no granuloma esquistossomótico, achado não observado no presente modelo.

Estudo complementar sobre a presença de antígenos do fungo no granuloma paracoccidíóidico está no momento sendo desenvolvido em nosso laboratório.

SUMMARY

Immunoglobulins and C₃ in the *P. brasiliensis* granuloma

The experimental model of paracoccidíomycosis induced in mice by the intravenous injection of yeast-forms of *P. brasiliensis* (Bt2 strain; 1 x 10⁶ viable fungi/animal) was used to evaluate sequentially 2, 4, 8, 16 and 20 weeks after inoculation: 1. The presence of immunoglobulins and C₃ in the pulmonary granulomata, by direct immunofluorescence; 2. The humoral (immunodiffusion test) and the cellular (footpad swelling test) immune response; 3. The histopathology of lesions. The cell-immune response was positive since week 2, showing a transitory depression at week 16. Specific antibodies were first detected at week 4 and peaked at week 16. At histology, epithelioid granulomas with numerous fungi and polymorphonuclear aggregates were seen. The lungs showed progressive involvement up to week 16, with little decrease at week 20. From week 2 on, there were deposits of IgG and C₃ around fungal walls within the granulomas and IgG stained cells among the mononuclear cell peripheral halo. Interstitial immunoglobulins and C₃ deposits in the granulomas were not detected. IgG and C₃ seen to play an early an important role in the host defenses against *P. brasiliensis* by possibly cooperating in the killing of parasites and blocking the antigenic diffusion.

AGRADECIMENTO

Este trabalho foi realizado com verbas de Convênio FINEC-UNESP (n.º 1271/83). Agradecemos ao Dr. Paulo Curi pela análise estatística.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ARANGO, M.; OROPEZA, F.; ANDERSON, O.; CONTRERAS, C.; BIANCO, N. & YARZABAL, L. — Circulating immune complexes and in vitro cell reactivity in paracoccidíomycosis. *Mycopathologia (Den Haag)*, 79: 153-158, 1982.
2. BACCHI, M. M. & FRANCO, M. F. — Experimental paracoccidíomycosis in the mouse. III. Immunological aspects of the intravenous infection with and without previous immunization. *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, 18: 101108, 1985.
3. BIAGIONI, L.; SOUZA, M. J.; CHAMMA, L. G.; MENDFS, R. P.; MARQUES, S. A.; MOTA, N. G. S. & FRANCO, M. — Serology of paracoccidíomycosis. II. Correlation between class-specific antibodies and clinical forms of the disease. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 78: 617-621, 1984.
4. BRITO, T.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; SILVA, L. C.; KANAMURA, H.; COSTA, C. M. & PINTO, P. S. — Immunopathology of the experimental schistosome (*S. mansoni*) egg granuloma in mice. Possible defence mechanisms mediated by local immune deposits. *J. Path.*, 140: 17-28, 1983.
5. CALICH, V. L. G.; KIPNIS, T. L.; FAVA NETTO, C. & SILVA, W. D. — The activation of the complement system by *Paracoccidíoides brasiliensis* in vitro. Its opsonic effect and possible significance for an "in vivo" model of infection. *Clin. Immunol. Immunopath.*, 12: 20-30, 1979.
6. CALICH, V. L. G.; PURCHIO, A. & PAULA, C. R. — A new fluorescent viability test for fungi cells. *Mycopathologia (Den Haag)*, 66: 175-177, 1978.
7. CALICH, V. L. G.; VAZ, C. A. C. & BURGER, E. — PMN chemotactic factor produced by glass adherent cells in the acute inflammation caused by *Paracoccidíoides brasiliensis*. *Brit. J. exp. Path.*, 66: 57-65, 1985.
8. CASTAÑEDA, E. — Immunological studies in murine paracoccidíomycosis. San Francisco, USA, 1965. (Tese de doutoramento — University of California).
9. EMANCIPATOR, S. N. & LAMM, M. E. — Pathways of tissue injury initiated by humoral immune mechanisms. *Lah. Invest.*, 54: 475-478, 1986.
10. FAVA NETTO, C. — Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico. *Arch. Cirurg. clín. exp.*, 18: 197-254, 1955.
11. HOLLANDER, M. & WOLFE, D. A. — Non-parametric statistical methods. New York, John Wiley, 1973.

12. IABUKI, K. & MONTENEGRO, M. R. — Experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster; morphology, ultrastructure and correlation of lesions with presence of specific antigens and serum levels of antibodies. *Mycopathologia (Den Haag)*, 67: 131-141, 1973.
13. MOSCARDI, M. & FRANCO, M. F. — Paracoccidioidomicose experimental do camundongo. I. Aspectos imunopatológicos da infecção intraperitoneal. *Rev. Inst. Med. S. Paulo*, 22: 286-293, 1980.
14. MOTA, N. G. S.; REZKALLAH-IWASSO, T.; PERAÇOLI, M. T. S.; AUDI, R. C.; MENDES, R. P.; MARCONDES, J.; MARQUES, S. A.; DILLON, N. L. & FRANCO, M. F. — Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 79: 765-772, 1985.
15. NOGUEIRA, M. E. S.; MENDES, R. P.; MARQUES, S. A. & FRANCO, M. — Complement mediated lysis detection of antibodies in paracoccidioidomycosis. A preliminary study. *Braz. J. med. biol. Res.*, 19: 241-247, 1986.
16. PERAÇOLI, M. T. S.; MOTA, N. G. S. & MONTENEGRO, M. R. — Experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster; morphology and correlation of lesions with humoral and cell-mediated immunity. *Mycopathologia (Den Haag)*, 79: 7-17, 1982.
17. REZKALLAH-IWASSO, M. T.; MOTA, N. G. S.; GOMES, M. C. G. & MONTENEGRO, M. R. — The effect of levamisole on experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster: immunologic and histopathologic correlation. *Mycopathologia (Den Haag)*, 84: 171-180, 1984.
18. RIDLEY, M. J.; MARIANAYAGAM, Y. & SPECTOR, W. C. — Experimental granulomas induced by mycobacterial immune complexes in rats. *J. Path.*, 138: 59-73, 1982.
19. ROBLEDO, M. A.; GRAYBILL, J. R.; AHRENS, J.; RESTREPO, A.; DRUTZ, D. J. & ROBLEDO, M. — Host defense against experimental paracoccidioidomycosis. *Amer. Rev. resp. Dis.*, 125: 563-567, 1982.
20. TAYLOR, M. L.; DÍAZ, S.; GONZALEZ, P. A.; SOSA, A. C. & TORIELLO, C. — Relationship between pathogenesis and immune regulation mechanisms in histoplasmosis: a hypothetical approach. *Rev. Infect. Dis.*, 6: 775-782, 1984.
21. UEDA, A. K. — Ketoconazole no tratamento da paracoccidioidomicose experimental endovenosa do camundongo. Botucatu, 1984. (Tese de doutoramento — Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas da UNESP).

Recebido para publicação em 09/9/86.