

## ESTUDIO COMPARATIVO DE LA PATOGENICIDAD Y LA ANTIGENICIDAD DE 6 CEPAS DE *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*

J.L. FINQUELIEVICH, R. NEGRONI, C.A. IOVANNITTI & M.R.I. de ELÍAS COSTA.

### RESUMEN

Fueron estudiadas en forma comparativa 6 cepas de *P. brasiliensis* con el propósito de determinar su patogenicidad para la rata y su antigenicidad. Las mismas fueron aisladas de: 1) biopsia de cuello uterino en 1989 (U), 2) biopsia de mucosa bucal en 1988 (V), 3) aspiración ósea en 1991 (63265), 4) testículo de cobayo 1984 (C24), 5) punción-aspiración ganglionar en 1986 (G) y 6) cepa proveniente de la Escola Paulista de Medicina (339).

Se prepararon antígenos citoplasmáticos liofilizados de cada una de ellas, en la concentración final de 100 mg/ml y se realizaron pruebas de inmunodifusión frente a 6 sueros patrones positivos de ratas. En este ensayo todos los antígenos presentaron dos ó tres bandas de precipitación. Para estudiar el poder patógeno se inocularon, en total, 120 ratas Wistar, de ambos sexos de 200 g de peso, por vía intracardiaca con suspensiones de la fase levaduriforme del *P. brasiliensis*, en concentraciones de  $3 \times 10^7$  y  $5 \times 10^7$  células/ml de cada cepa. Los animales que no murieron espontáneamente fueron sacrificados a los 14, 28, 42, 56 y 70 días post-infección y se evaluaron los siguientes parámetros: A) exámenes macro y microscópicos de pulmones, hígado, bazo y riñones; B) cultivos de un pulmón y C) prueba de inmunodifusión con antígeno homólogo. Se consideró además, el porcentaje de muertes espontáneas por cada cepa. Los resultados de estos estudios fueron los siguientes:

Cepas	Muertes espontáneas %	Granulomas pulmonares %	Cultivos pulmonares (+)	Lesiones extrapulmonares %	Prueba ID (+)
U	0	100	>90	>50	100
G	35	100	>90	>50	56.5
63265	>50	100	100	80	49.5
C-24	5	75	15	10	87.5
339	0	0	0	0	0
V	0	0	50	0	100

No se observó relación entre la patogenicidad y la antigenicidad. La cepa más virulenta correspondió a un aislamiento reciente a partir de una forma juvenil grave y la más antigénica fue una cepa, morfológicamente atípica, que no provocó lesiones macroscópicas ni microscópicas en los órganos de las ratas.

**UNITERMOS:** *Paracoccidiodies brasiliensis*; Cepas; Antigenicidad; Patogenicidad.

## INTRODUCCION

Varios autores han demostrado que las cepas de *Paracoccidioides brasiliensis* difieren mucho en su patogenicidad para animales de laboratorio. Se han empleado para tal fin habitualmente ratones y hamsters<sup>1,2,5,6,8,9,12,13,17,18,19</sup>. Ha sido posible observar también que las cepas son antigénicamente heterogéneas<sup>3,9,16,17,19</sup>. Recientemente hemos trabajado con ratas Wistar como modelo experimental de paracoccidioidomicosis<sup>7,10,11</sup>. Este animal presenta una enfermedad progresiva y crónica, con alteraciones anatomopatológicas semejantes a las de la paracoccidioidomicosis humana y lesiones principalmente pulmonares<sup>7</sup>. Su utilidad en el estudio de la eficacia de diversas drogas antifúngicas ha sido demostrada en trabajos anteriores<sup>10,11</sup>.

El propósito de esta investigación fue establecer si había diferencias del poder patógeno de distintas cepas de *P. brasiliensis* frente a la rata Wistar y si la virulencia guardaba relación con la antigenicidad. Las razones para estudiar esta correlación entre antigenicidad y virulencia son: 1) ambas propiedades del *P. brasiliensis* han demostrado ser variables en las diferentes muestras de esta especie fúngica, pero son escasos los trabajos que las vinculan entre sí, SINGER-VERMES et al.<sup>17</sup>; SAN BLAS & SAN BLAS<sup>13</sup>, relacionaron la virulencia al contenido de  $\alpha$  1-3 glucanos en la pared celular del *P. brasiliensis*.

## MATERIALES Y METODOS

### *Cepas de P. brasiliensis estudiadas.*

Fueron examinadas 6 cepas cuya procedencia se detalla a continuación:

- 1) U: fue aislada de una biopsia de cuello uterino en 1989.
- 2) 63265: se cultivó a partir de una aspiración ósea de una forma infante juvenil en 1991.
- 3) V: se obtuvo a partir de una biopsia de mucosa bucal en 1988.
- 4) G: fue aislada de una punción-aspiración ganglionar en 1986.
- 5) C24: fue cultivada de un testículo de cobayo inoculado con un cultivo procedente de un paciente. La cepa fue aislada del cobayo en 1984.
- 6) 339: cultivo de *P. brasiliensis* procedente de la Escola Paulista de Medicina, cepa empleada para la preparación de antígenos para pruebas de inmunodifusión.

Estas cepas fueron mantenidas en cultivos en agar-caldo glucosado al 2%, incubadas a 37°C y repicadas cada 10 días.

### *Preparación de antígenos citoplasmático de P. brasiliensis*

Las diversas cepas de *P. brasiliensis* fueron sembradas en frascos de Roux con medio de agar-caldo glucosado al 2%. La inoculación de los frascos se llevó a cabo con una suspensión densa de la fase levaduriforme obtenida a partir de cultivos de 72 hs. de incubación a 37°C. Después de sembrados se los dejó incubar a 37°C durante 10 días. A continuación se suspendió el desarrollo en agua destilada estéril con mertiolato-borato de sodio 1/10000 y se mantuvo la suspensión a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C) durante 24 hs. Seguidamente se efectuaron tres lavados por centrifugación con agua destilada estéril y el paquete de elementos levaduriformes fue suspendido nuevamente en agua destilada adicionada de mertiolato-borato de sodio 1/10000 y un inhibidor de proteasas, el fenilmetilsulfonilfluoruro hasta la concentración final de 1/5000. La ruptura de las levaduras se llevó a cabo en un homogeneizador de tejidos Braun, con perlas de vidrio de 0,2 mm, en 3 ciclos de 10 minutos cada uno a 2000 r.p.m.

Las paredes celulares fueron separadas por centrifugación refrigerada a 4°C a razón de 10.000 r.p.m., durante 30 minutos y el sobrenadante fue liofilizado. Para las pruebas de inmunodifusión en gel de agar se utilizó una concentración de 100 mg/ml de polvo liofilizado en agua destilada. Se utilizó este parámetro físico para determinar la concentración del antígeno, porque es conocida la gran variación en la composición química de las diversas cepas del *P. brasiliensis*. La concentración seleccionada fue elegida por experiencias previas con el obtenido a partir de la cepa U.

### *Pruebas de inmunodifusión*

La capacidad antigénica "in vitro" de las cepas en estudio, fue determinada mediante pruebas de inmunodifusión en gel de agar con sueros de ratas, previamente inoculadas con la cepa U, que habían demostrado reacciones positivas frente al antígeno patrón provisto por Pires de Camargo (antígeno metabólico obtenido a partir de la cepa 339). Se empleó la técnica de inmunodifusión de Ouchterlony con las modificaciones propuestas por ZAROR et al.<sup>20</sup>. Las pruebas se llevaron a

cabo con sueros sin diluir, se las dejó a temperatura ambiente durante 72 hs. y la lectura se realizó después de haber cubierto las placas con una solución buffer de citrato de sodio pH 8,2 durante una hora.

Una vez demostrado el poder antigénico de los extractos citoplasmáticos de cada una de las cepas y durante los estudios de patogenicidad, las ratas fueron sangradas por punción cardíaca antes de ser sacrificadas y los sueros fueron guardados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de realizar las pruebas serológicas.

Estas se llevaron a cabo con el antígeno homólogo, empleando la técnica de inmunodifusión antes mencionada.

### **Estudio del poder patógeno de las cepas de *P. brasiliensis***

#### **Animales utilizados:**

Se emplearon 120 ratas Wistar, en igual número de ambos sexos, con un peso aproximado de 200 g. Los animales fueron endocriados en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de Buenos Aires. Esta raza de ratas ha sido empleada en otros estudios de paracoccidioidomicosis experimental<sup>9,14</sup>.

#### **Preparación del inóculo**

Fue realizado a partir de cultivos de la fase levaduriforme, de 72 hs. de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  en agar-caldo glucosado al 2%. Por cada cepa se prepararon dos suspensiones con  $3 \times 10^7$  y  $5 \times 10^7$  células por ml. Se comprobó una viabilidad mayor del 80% de las células fúngicas por el método de naranja de acridina<sup>4</sup>. Las ratas fueron sometidas a una anestesia etérea suave e inoculadas con 0,5 ml de las suspensiones antes mencionadas, por vía intracardiaca. Por cada cepa se emplearon 20 ratas para conformar 2 grupos de 10 animales inoculados con cada suspensión. La magnitud de los inóculos fue establecida en una experiencia preliminar con la cepa U y se utilizaron dos dosis para observar si existía correlación entre el inóculo infectante y el desarrollo de la enfermedad experimental.

#### **Estudios de los animales infectados.**

Se sacrificaron 2 ratas de cada grupo a los 14, 28, 42, 56 y 70 días post-infección, previamente se tomó una muestra de 2 ml de sangre cardíaca para estudios serológicos. Todas las ratas fueron sometidas a autopsia completa y se estudiaron sistemáticamente pulmones, corazón, hígado, bazo y riñones. Estos órganos se procesaron de acuerdo al siguiente protocolo:



Fig. 1 - Observación macroscópica de lesiones pulmonares, hepáticas, esplénicas y renales en rata Wistar, inoculada con la cepa 63264. Muerte espontánea a los 30 días.

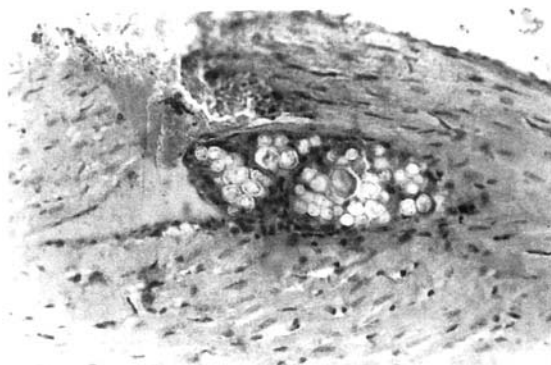


Fig. 2 - Examen microscopico de granulomas epitelioides de miocardio con abundantes *Paracoccidioides brasiliensis* en rata Wistar, inoculada con la cepa 63264. 11&E 400X. Corresponde ao mismo animal de la figura anterior.

lo: 1) examen macroscópico de todos los órganos en busca de granulomas (Fig.n°1); 2) estudio microscópico al estado fresco de los órganos con alteraciones macroscópicas; 3) estudio histopatológico de cortes de los distintos órganos teñidos con hematoxilina-eosina (Fig.n°2); y 4) cultivos de pulmones. Estos últimos se llevaron a cabo con una suspensión homogénea de un pulmón entero en 5 ml de solución salina isotónica estéril. El homogeneizado fue obtenido en mortero con arena estéril y se sembró en 3 tubos de agar-miel de Sabouraud y en 3 tubos de caldo glucosado al 2%. Ambos medios de cultivo contenían una mezcla de cloranfenicol-estreptomicina a razón de 100 ug/ml y cicloheximida en la proporción de 300 ug/ml. La incubación se llevó a cabo a  $28^{\circ}\text{C}$  y  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 4 semanas y se anotó la presencia o ausencia de desarrollo del *P. brasiliensis*. Las colonias fueron identificadas por examen microscópico.

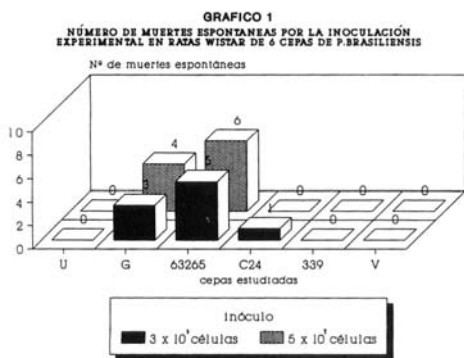
Se anotó el día de deceso de los animales que murieron espontáneamente y, siempre que fue posible, se les practicó la autopsia de acuerdo al protocolo de estudio expuesto previamente.

## RESULTADOS

### Patogenicidad

Los resultados obtenidos están sintetizados en la Tabla nº 1. La producción de granulomas epitelioides es muy precoz en este modelo experimental. Los animales sacrificados a los 14 días ya exhibían este tipo de respuesta. Los resultados de los exámenes macroscópicos, demostrando granulomas, coincidieron con la presencia de abundantes formas levaduriformes de *P. brasiliensis* en el estudio microscópico al estado fresco y la observación de granulomas epitelioides bien desarrollados con abundantes hongos parásitos en la histopatología. Por este motivo se expresan en la Tabla nº 1, sólo como porcentajes de animales de cada grupo que exhibieron lesiones granulomatosas. En las ratas inoculadas con las cepas menos virulentas, se observaron respuestas diferentes, en la cepa C 24 se comprobaron pequeños granulomas epitelioides con escasos parásitos en el 70 u 80% de los animales, en tanto que en la muestra V se observaron elementos parasitarios del *P. brasiliensis* en los pulmones, rodeados por una respuesta inflamatoria escasa o aún aislados en los septos interalveolares. Sin embargo, los resultados de los cultivos de pulmón, demostraron que algunos de estos microorganismos estaban viables.

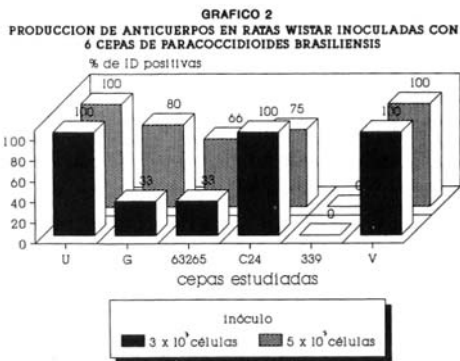
En todas las cepas examinadas se observó una tendencia a la disminución de las lesiones extrapulmonares con la evolución de la enfermedad experimental hacia la cronicidad (40 a 50 días post-infección).



**TABLA 1**  
Estudio del poder patógeno en ratas Wistar inoculadas con 6 cepas de *P. brasiliensis*

Cepas	Dosis infectantes	% de animales granulomas típicos					% cultivos de pulmón positivos
		P	H	B	R	CO	
U	3 x 10 <sup>7</sup>	100	0	10	20	10	90
	5 x 10 <sup>7</sup>	100	10	10	50	10	100
G	3 x 10 <sup>7</sup>	100	60	40	60	30	86
	5 x 10 <sup>7</sup>	100	20	20	30	20	100
63265	3 x 10 <sup>7</sup>	100	60	80	40	20	100
	5 x 10 <sup>7</sup>	100	60	80	40	20	100
C 24	3 X 10 <sup>7</sup>	80	10	10	10	0	20
	5 X 10 <sup>7</sup>	70	10	10	10	0	10
339	3 X 10 <sup>7</sup>	0	0	0	0	0	0
	5 X 10 <sup>7</sup>	0	0	0	0	0	0
V	3 X 10 <sup>7</sup>	0	0	0	0	0	40
	5 X 10 <sup>7</sup>	0	0	0	0	0	60

Referencias: P.: Pulmón., H.: Hígado., B.: Bazo., R.: Riñon., CO.: Corazón



Sin embargo los granulomas pulmonares permanecieron activos en las cepas virulentas y poseyeron gérmenes viables durante todo el período controlado (70 días).

La mayor parte de las muertes espontáneas, 17/18 ratas, se produjeron entre los 18 y 32 días post-infección y fueron ocasionadas por la gran diseminación de las lesiones de paracoccidioidomicosis (Gráfico nº 1).

Las muestras de *P. brasiliensis* que determinaron mayor número de muertes espontáneas fueron también la que produjeron porcentajes más altos de lesiones extrapulmonares y de cultivos pulmonares positivos. (Tabla nº 1 y Gráfico nº 1).

### Antigenicidad

Como fue expuesto anteriormente las seis cepas estudiadas demostraron que producían buenos antígenos citoplasmáticos en los estudios "in vitro" frente a sueros positivos de ratas. Estos resultados, así como la existencia de una banda de precipitación con reacción de identidad entre todos estos reactivos, tornó innecesaria la titulación en bloque de los mismos.

Resulta más difícil interpretar los resultados de las pruebas de inmunodifusión, realizadas con estos antígenos, frente a los sueros de ratas empleadas en los estudios de patogenicidad. Esto se debe a que la rata forma tardíamente anticuerpos específicos (después de 30-40 días de la infección) y a que las cepas más virulentas ocasionaron un número elevado de muertes espontáneas en estadios tempranos, interfiriendo así con la demostración de anticuerpos. Una de las cepas (339), que carecía totalmente de poder patógeno para las ratas, no generó la producción de anticuerpos específicos cuando fue inoculada (Gráfico nº 2). La cepa V, que no produjo granulomas epitelioides, ni muertes espontáneas, pero que tenía microorganismos viables en los pulmones, determinó la formación de anticuerpos en todos los animales. Igual comprobación se obtuvo con la cepa U, que provocó graves lesiones pulmonares, pero no muertes espontáneas.

### CONCLUSIONES

Se comprobaron diferencias marcadas de poder patógeno para la rata Wistar entre las cepas de *P. brasiliensis* estudiadas. Estas fueron fácilmente puestas en evidencia por varios criterios: a) porcentajes de muertes espontáneas; b) formación de granulomas epitelioides con abundantes *P. brasiliensis* en los pulmones y en otros órganos y c) porcentaje de cultivos pulmonares positivos. Los tres criterios de evaluación mostraron resultados concordantes, a mayor cantidad de muertes espontáneas, más elevado porcentaje de lesiones extrapulmonares y de cultivos pulmonares positivos.

Las características de las lesiones histopatológicas observadas y el lapso en que se produjeron la mayoría de las muertes espontáneas sugieren que este microorganismo estimula una reacción granulomatosa con abundantes células epitelioides y células gigantes tipo Langhans relacionadas con la hipersensibilidad mediada por células.

Se observaron 2 cepas con patogenicidad muy reducida o nula. La muestra V, es morfológicamente atípica, ocasionó lesiones muy pequeñas, invisibles macroscópicamente, pero con gérmenes viables en muchos animales y buena formación de anticuerpos específicos. La cepa 339, usada para la preparación del antígeno metabólico patrón para inmunodifusión, resultó ser carente de patogenicidad para la rata.

Los resultados obtenidos con dos inóculos diferentes por cada cepa, indican que la dosis infectante no fue un factor destacado en la patogenicidad, en general una misma cepa proporcionó resultados semejantes con ambas dosis. Estas comprobaciones están de acuerdo con lo encontrado por ACOSTA et al.<sup>1</sup>.

Nos proponemos estudiar en el futuro, si la inoculación previa de las cepas V y 339 torna a los animales más resistentes frente a la inoculación experimental con las muestras patógenas.

Las 6 cepas examinadas produjeron antígenos citoplasmáticos aptos para las reacciones de inmunodifusión en gel de agar, cuando se los utilizó en la concentración de 100 mg/ml. Pese a que hubo producción de bandas de precipitación diferentes, todos los reactivos mostraron una de ellas en común.

Las cepas que provocaron infección en las ratas con sobrevida larga, determinaron 100% de reacciones de inmunodifusión positivas (cepas U y V). Por el contrario aquellas muestras que no infectaron a la rata (cepa 339), así como las que provocaron muertes tempranas, exhibieron resultados negativos de esta reacción, ya sea en forma total o parcial.

Tampoco pudo comprobarse un nexo entre ambas propiedades y el tiempo durante el cual la muestra fue mantenida "in vitro", ya que las cepas 63265 aislada en 1991 y la cepa G mantenida por repiques desde 1986 fueron las más patógenas.

Los resultados obtenidos señalan la necesidad de estudiar la virulencia de cada cepa, en forma minuciosa, antes de llevar a cabo estudios sobre la eficacia de antifúngicos "in vivo".

Por todo lo expuesto podemos concluir que: a) la cepa 339 no tuvo capacidad de infectar a los animales. El antígeno obtenido pudo detectar anticuerpos en todos los animales infectados; b) la cepa V presentó baja patogenicidad ya que si bien pudo infectar a las ratas y

estimuló la formación de anticuerpos, pero no produjo granulomas; c) las cepas U y C24 fueron capaces de enfermar a los animales, estimular la formación de granulomas y originar la producción de anticuerpos, se las consideró de patogenicidad intermedia; d) las cepas G y 63265 fueron calificadas como de alta patogenicidad, ya que produjeron el mayor porcentaje de muertes espontáneas, lesiones extrapulmonares y cultivos pulmonares positivos.

## SUMMARY

### Comparative study of pathogenicity and antigenicity of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains

A comparative study of antigenicity and pathogenicity for rats of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains was carried out.

The antigenic capacity "in vitro" of cytoplasmic extract from each strain was determined by immunodiffusion test against 6 serum samples obtained from rats experimentally infected with *Paracoccidioides brasiliensis*, that had presented positive reactions with a metabolic control antigen. The cytoplasmic extracts were used at final concentration of 100 mg/ml. All of them showed 2 or 3 precipitation bands in this assay.

One hundred twenty Wistar rats both sexes weighing approximately 200 g, were inoculated intracardiacally with suspensions of the yeast phase of different *P. brasiliensis* strains. Two concentrations containing  $3 \times 10^7$  and  $5 \times 10^7$  cells/ml of each isolate were prepared.

The inoculated animals were divided in two groups, one was left to its spontaneous outcome and the percentages of deaths were registered and the other rats were sacrificed at 14, 28, 56 and 70 days post-infection. The following parameters were taken into account for evaluation: A) presence of macroscopic granulomas in lung, liver, spleen and kidney; B) presence of *P. brasiliensis* in microscopic exams of the same organs, in wet preparations and in histologic sections stained by H&E; C) culture of lung and D) immunodiffusion test using pre-mortem serum samples and the homologous antigen.

The correlation between the most important parameters studied in each strain are summarized as follow:

Strain	Spontaneous death	Pulmonary granulomas	Lung cultures (+)	Extra-pulmonary lesions	Positive ID-test
	%	%	%	%	%
U	0	100	>90	>50	100
G	35	100	>90	>50	56.5
63265	>50	100	100	80	49.5
C-24	5	75	15	10	87.5
339	0	0	0	0	0
V	0	0	50	0	100

As no significant differences between the two inocula employed for each strain was observed, the before-mention results are the average of those obtained with each inoculation doses.

The most virulent strain was a recent isolate from an acute disseminated form of the juvenil type. A morphological atypic isolate, which produced a very mild experimental infection with viable *P. brasiliensis* determined 100% of positive immunodiffusion tests. The strain 339 did not produce infection in the rats, and the animals inoculated did not presented antibodies. Nevertheless this strain is useful to prepare antigens for serologic reactions.

No correlation between antigenicity or pathogenicity and the time during which these strains were maintained "in vitro" could be established.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Sr. Ricardo Rando por las preparaciones histopatológicas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ACOSTA, M.V.; MELO, L. & CASTAÑEDA, E. - Estudio del comportamiento "in vivo e in vitro" de seis cepas de *Paracoccidioides brasiliensis*. Rev. Iberoamer. Micol., 9: 7-11, 1992.
- BACCHI, M.M. & FRANCO, M. - Experimental paracoccidioidomycosis in the mouse. III. Histopathological and immunological finding after intravenous infection in the presence or absence of previous immunization. Rev. Soc. bras. Med. trop., 18: 101-108, 1985.
- BIAGIONI, L.M.V.; SADATSUNE, T.; FRANCO, M.F. & MATHIOS, M.C.F.I. - A comparative study of the immunogenicity of eight *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 29: 97-103, 1986.
- CALICH, V.L.G.; PURCHIO, A. & PAULA, C.R. - A new fluorescent viability test for fungi cells. Mycopathologia (Den Haag), 66: 175-177, 1978.
- CALICH, V.L.G.; FAZIOLI, R.A.; TEIXEIRA, H.C.; RUSSO, M.;

- SINGER-VERMES, L.M.; BURGER, E. & VAZ, C.A.C. - Mechanisms of host-resistance to *Paracoccidioides brasiliensis*. In: CONGRESS OF INTERNATIONAL SOCIETY FOR HUMAN AND ANIMAL MICROLOGY, 10, Barcelona, J.R.Prous Science, 1988. Proceedings.p. 154-159.
6. CALICH, V.L.G.; BURGER, E.; RUSSO, M.; VAZ, C.A.C. & SINGER-VERMES, L.M.- Immunopathogenesis of murine paracoccidioidomycosis. Rev. argent. Micol., 15 (1) : 38, 1992.
7. GOSIS, A. & NEGRONI, R. - Desarrollo de un modelo animal para el estudio de la paracoccidioidomycosis animal. Rev. argent. Micol. 4 (3): 5-9, 1981.
8. IABUKI, K. & MONTENEGRO, M.R. - Experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster morphology, ultrastructure and correlation of lesion with presence of specific antigens and serum levels of antibodies. Mycopathologia (Den Haag), 67: 131-141, 1979.
9. KASHINO, S.S.; CALICH, V.L.G.; BURGER, E. & SINGER-VERMES, L.M.- "In vivo" and "in vitro" characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains. Mycopathologia (Den Haag), 92: 173-178, 1985.
10. NEGRONI, R.; FINQUELIEVICH, J.L. & GOSIS, A.S. - Estudio comparativo de la eficacia de itraconazol y ketoconazol en el tratamiento de la paracoccidioidomycosis experimental. Med. cut. iberolat. amer., 15: 455-460, 1987.
11. NEGRONI, R.; ELIAS COSTA, M.R.; FINQUELIEVICH, J.; IOVANNITTI, C.; AGORIO, I. & TIRABOSCHI, N. - Three triazole in the treatment of experimental paracoccidioidomycosis. Rev. iberamer. Micol., 8: 8-12, 1991.
12. RESTREPO, A.; ROBLEDO, M.; GIRALDO, R.; HERNÁNDEZ, H.; SIERRA, F.; GUTIÉRREZ, F.; LONDOÑO, F.; LÓPEZ, R. & CALLE, G. - The gamut of paracoccidioidomycosis. Amer. J. Med., 61: 33-42, 1976.
13. SAN BLAS, G. & SAN BLAS, F. - *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. Mycopathologia (Den Haag), 62: 77-86, 1977.
14. SAN BLAS, G.; SAN BLAS, F. & SERRANO, L.E. - Host-parasite relationships in the yeast-like form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC-Pb9. Infect. Immun., 15: 343-346, 1977.
15. SAN BLAS, G.; SAN BLAS, F.; ORDAZ, D.; CENTENO, S. & ALBORNOZ, M. - Chemical changes in cell wall structure of five strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. Sabouraudia, 22: 255-257, 1984.
16. SCROFERNEKER, M.L. - Contribuição para o estudo da composição antigênica do *Paracoccidioides brasiliensis*. Comparação entre 5 amostras. São Paulo, 1982. (Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).
17. SINGER-VERMES, L.M.; BURGER, E.; FRANCO, M.F.; MOSCARDI BACCHI, M.; MENDES GIANNINI, M.J. & CALICH, V.L.G. - Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. J. med. vet. Mycol., 27: 71-82, 1987.
18. TANI, E.M.; PERAÇOLI, M.T.S.; FRANCO, M.F. & MONTENEGRO, M.R.- Experimental pulmonary paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster: morphology and correlation of lesion with the immune response. J. med. vet. Mycol., 25: 291-300, 1987.
19. ZACHARIAS, D.; UFDA, A.; MOSCARDI-BACCHI, M.; FRANCO, M. & SAN BLAS, G. - A comparative histopathological, immunological, and biochemical study of experimental intravenous paracoccidioidomycosis induced in mice by three *Paracoccidioides brasiliensis* isolate. J. med. vet. Mycol., 24: 445-454, 1986.
20. ZAROR, L.; ROBLES, A.M. & NEGRONI, R. - Pruebas de inmunodifusión en medios gelosados con agregado de polietilenglicol 6000 para el serodiagnóstico de las micosis. Rev. argent. Micol., 10: 61-64, 1978.

Recebido para publicação em 10/03/1993  
Aceito para publicação em 01/09/1993