

PARACOCCIDIOIDOMICOSE EXPERIMENTAL DO CAMUNDONGO

I — Aspectos imunopatológicos da infecção intraperitoneal

Maura MOSCARDI (1) e Marcello Fabiano FRANCO (2)

RESUMO

Inoculamos, por via intraperitoneal, 30 camundongos machos, de 4 semanas de idade, com 10×10^6 formas cerebriformes do *P. brasiliensis* (cepa 18). Dez animais controle foram inoculados com o diluente (sol. salina estéril). Cinco animais infectados e dois controle foram sacrificados 1, 2, 3, 4, 8 e 16 semanas após a inoculação e estudou-se: 1) Resposta de hipersensibilidade retardada, medida pelo teste do coxim plantar, realizado 24 h antes do sacrifício; 2) Anticorpo-gênese específica, medida pelo teste de imunodifusão dupla em gel de ágar; 3) Histopatologia do peritônio, fígado, baço, rim, pulmões e intestino. **Observamos:** 1) A peritonite paracoccidiodomicótica foi caracterizada por inflamação neutrofílica-macrofágica em torno dos fungos inoculados; após a 4.^a semana de infecção, houve fibrose encapsulante, com resolução progressiva do processo; 2) Presença de focos metastáticos infecciosos para o fígado e pulmões, desde a 1.^a semana e não mais encontrados a partir da 4.^a semana de infecção; 3) Resposta de hipersensibilidade retardada presente desde a 1.^a semana de infecção e persistente até a 16.^a, com exceção a 8.^a semana; 4) Aparecimento de anticorpos específicos séricos a partir da 2.^a semana, com pico na 4.^a e decréscimo em direção a 16.^a semana. Deve ser ressaltado que no presente modelo experimental: 1) O início do bloqueio e "cura" da infecção coincidiu com resposta de hipersensibilidade retardada e anticorpo-gênese específica máxima; 2) A inflamação peritoneal não foi granulomatosa epitelióide, apesar do aparecimento precoce de resposta de hipersensibilidade retardada.

O modelo fornece ampla perspectiva de estudos anátomo-imunológicos da infecção paracoccidiodomicótica do camundongo.

INTRODUÇÃO

Paracoccidiodomicose é micose profunda endêmica em nosso país e bastante freqüente em pacientes que procuram o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu². Este fato tem levado docentes da Faculdade a desenvolverem trabalhos visando contribuir para o conhecimento dos aspectos clínicos, diagnósticos, imunológicos e patogênicos da doença^{6,12,14,19}.

Inicialmente, deve ser levado em consideração que: 1) A paracoccidiodomicose é infla-

mação granulomatosa epitelióide, com morfo-gênese provavelmente mediada por mecanismos imunopatológicos¹⁶; 2) O *Paracoccidoides brasiliensis* (*P. brasiliensis*) tem alto poder antigênico, desenvolvendo no hospedeiro variada gama de anticorpos e de respostas de hipersensibilidade celular ou retardada^{10,15}; 3) Há indícios experimentais e clínicos que a resposta inflamatória contra o fungo é diretamente relacionada com a reatividade imunológica do hospedeiro⁹; 4) O camundongo se constitui em bom

(1) Acadêmica do 6.^o ano da Faculdade de Medicina de Botucatu (recipiente de bolsa de iniciação científica da FAPESP)
(2) Professor Livre-Docente do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, São Paulo, Brasil

animal de laboratório para o estudo experimental das micoses profundas; além disto, vem sendo utilizado amplamente em trabalhos de imunopatologia, havendo grande quantidade de informação sobre suas respostas imunes humoral e celular⁸.

Dentro deste contexto, realizamos o presente trabalho que teve como objetivos: 1) Estudar a morfologia da infecção experimental intraperitoneal paracoccidioidomycótica do camundongo; 2) Verificar, nas diferentes etapas da infecção, o desenvolvimento e o comportamento da anticorpo-gênese específica e da resposta de hipersensibilidade celular; 3) Estabelecer correlações entre os achados histopatológicos e imunológicos, visando contribuir para o conhecimento das morfogênese das reações entre hospedeiro e parasita neste modelo experimental de paracoccidioidomicose.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Delineamento experimental

A infecção experimental foi induzida pela inoculação intraperitoneal de camundongos com suspensão de *P. brasiliensis*. Quando do sacrifício dos animais, foram avaliadas: a) Resposta de hipersensibilidade celular medida através do teste do coxim plantar e b) A anticorpo-gênese específica quantificada pela técnica de imunodifusão dupla em gel de ágar. Após autópsia dos animais, incluindo o exame macroscópico das cavidades torácica e abdominal, realizou-se estudo histopatológico dos pulmões, fígado, baço, rins e peritônio.

2. Animais e grupos experimentais

Foram utilizados 40 camundongos machos, de 4 semanas de idade, provenientes de Biotério Geral, do Campus de Botucatu: a) Trinta animais foram infectados e sacrificados 1, 2, 3, 4, 8 e 16 semanas após a infecção (5 animais/grupo); b) Dez animais foram inoculados com solução salina estéril (animais controle) e sacrificados conforme os períodos acima (2 animais/grupo).

3. Inóculo

Utilizou-se a cepa 18 do *P. brasiliensis*, proveniente da Micoteca do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, cultivada em meio de FAVA NETTO¹¹, a 37°C, durante 10 dias. Cada animal foi infectado com injeção

intraperitoneal de 0,5 ml da suspensão de fungos, com turvação correspondente ao tubo 10 da escala de MacFarland (aproximadamente 20 x 10⁶ fungos/ml). Os animais controle foram inoculados com injeção intraperitoneal de mesmo volume de solução salina estéril.

4. Avaliação da resposta imunológica

4.1. Hipersensibilidade celular — A resposta de hipersensibilidade celular específica contra *P. brasiliensis* foi avaliada "in vivo", 24 horas antes do sacrifício de cada animal, pelo teste do coxim plantar. Injetaram-se 0,04 ml de antígeno solúvel bruto do *P. brasiliensis* (concentração protéica = 8 mg/ml) e 0,04 ml de solução salina estéril, respectivamente no coxim plantar posterior direito (pata teste) e esquerdo (pata controle). Os volumes das patas injetadas foram medidos 24 horas após com auxílio de pletismógrafo, segundo WINDER & col.²⁰. Os índices de resposta foram expressos como a diferença de volume entre a pata teste e a pata controle.

Para o exame da resposta mononuclear-retardada específica da reação da pata injetada com o antígeno de *P. brasiliensis*, realizou-se estudo histopatológico do coxim plantar teste e controle.

4.2. Imunidade humoral — A presença e a titulação de anticorpos séricos específicos contra *P. brasiliensis* foram determinadas por reação de imunodifusão dupla em gel de ágar. Os soros foram obtidos de amostras de sangue colhidas quando do sacrifício dos animais e estocadas a -20°C. Nas reações empregou-se o antígeno solúvel bruto, na concentração protéica de 3 mg/ml, e os soros foram diluídos na razão dois.

5. Estudo anátomo-patológico

Todos os animais sacrificados foram autópsados, com o registro dos achados macroscópicos das cavidades torácica e abdominal. Fragmentos dos órgãos, para estudo histológico, foram fixados em solução de formalina a 10%, incluídos em parafina, cortados em 4 µ e corados pelos métodos de Hematoxilina e Eosina (HE) e Gomori, pelas técnicas habituais.

RESULTADOS

1. Hipersensibilidade celular

A Tabela I demonstra os resultados do teste do coxim plantar realizado nos animais in-

fectados e controle. Para efeito do tratamento estatístico, adicionou-se às médias a constante 0.5. Os dados dos animais controle revelaram que não houve nenhuma diferença entre os volumes das patas injetadas com antígeno de *P. brasiliensis* e os das patas injetadas com solução salina estéril.

TABELA I

Teste do coxim plantar dos camundongos controle (2 animais/grupo) e infectados (5 animais/grupo), sacrificados 1, 2, 3, 4, 8 e 16 semanas após inoculação. Os resultados são expressos como a diferença de volume entre a pata teste e a pata controle. As médias com asterisco foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) das médias dos animais controle.

Sacrifício (semanas)	Animais	Diferença entre as patas, controle e teste					Média
		0.6	0.7	0.8	1.0	1.2	
1.º	Infectado	0.6	0.7	0.8	1.0	1.2	0.86*
	Controle	Não realizado					—
2.º	Infectado	0.1	0.3	0.4	0.5	0.9	0.44*
	Controle	0.2	0.2				0.2
3.º	Infectado	0.4	0.4	0.6	0.9	1.4	0.74*
	Controle	0.0	0.0				0.0
4.º	Infectado	0.2	0.5	0.7	1.5	1.7	0.92*
	Controle	0.0	0.2				0.1
8.º	Infectado	-0.2	0.0	0.0	0.1	0.3	0.04
	Controle	0.0	0.0				0.0
16.º	Infectado	0.3	0.4	0.7	0.8		0.53*
	Controle	0.0	0.0				0.0

Os camundongos sacrificados 8 semanas após infecção apresentaram resultados semelhantes aos do grupo controle. Os animais dos demais grupos infectados (1, 2, 3, 4 e 16 semanas de infecção) mostraram a pata teste macroscopicamente mais volumosa e eritematosa do que a pata controle; as diferenças médias de volume entre as patas variaram entre 0.44 (3.ª semana) e 0.92 (4.ª semana); constatou-se diferença significativa entre estas médias e as dos animais controle (teste t — 95% de probabilidade) ($p < 0,05$).

A histologia do coxim plantar dos animais controle injetados com o antígeno de *P. brasiliensis* revelou infiltração mononuclear ausente ou discreta. Esta infiltração foi sempre moderada ou intensa nas patas teste dos animais infectados, com exceção dos camundongos da 8.ª semana. Houve portanto paralelismo entre a medida pletismográfica e histológica do tes-

te de hipersensibilidade retardada. A injeção de solução salina estéril no coxim plantar dos camundongos infectados ou controle determinou alterações inflamatórias mínimas, caracterizadas por discreto edema e infiltração polimorfonuclear neutrofílica.

2. Imunidade humoral

A Tabela II demonstra os títulos de anticorpos anti-*P. brasiliensis* detectados nos soros dos camundongos controle e infectados, pela técnica de imunodifusão dupla em gel de ágar.

TABELA II

Reação de imunodifusão dupla em gel de ágar dos camundongos controle (2 animais/grupo) e infectados (5 animais/grupo), sacrificados 1, 2, 3, 4, 8 e 16 semanas após inoculação. Os títulos representam a recíproca da diluição máxima do soro com linha de precipitação.

Sacrifício (semanas)	Títulos (*)					Mediana
1.º	0	0	0	0	0	0
2.º	0	0	0	2	4	0
3.º	0	4	4	8	8	4
4.º	8	8	32	64	64	32
8.º	0	4	8	32	128	8
16.º	2	4	4	4		4

(*) Os animais controle não apresentaram anticorpo-gênese

Os camundongos do grupo controle e os sacrificados 1 semana após a infecção não apresentaram anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis*. No grupo infectado, os títulos de anticorpos específicos foram crescentes a partir da 2.ª semana de infecção, atingindo pico na 4.ª semana e decrescendo em direção a 16.ª semana.

3. Achados anátomo-patológicos

Desde a 1.ª semana de infecção, todos os animais apresentaram peritonite difusa, caracterizada pela presença de nódulos irregulares, de tamanhos variados, predominantemente localizados no peritônio parietal e na região próxima do baço. Este aspecto mais ou menos difuso nodular, exuberante do processo permaneceu inalterado até a 4.ª semana de infecção, quando então as alterações macroscópicas passaram a ser mais discretas e circunscritas; os camundongos da 8.ª semana mostraram ainda a presença de pequenos nódulos peritoneais iso-

lados, principalmente localizados junto ao baço, ao lado de aderências fibrosas de vísceras entre si ou com o peritônio parietal; na 16.^a semana, a peritonite apresentou aspecto de resolução, não mais se encontrando granúlia peritoneal, havendo sinéquias e cicatrizes fibrosas, sob forma de placas esbranquiçadas, principalmente localizadas no peritônio capsular do fígado e baço.

O estudo macroscópico da superfície de corte dos rins, fígado, baço e dos pulmões não

revelou alterações em nenhuma fase da infecção.

Desde o começo da infecção peritoneal (1.^a semana), a reação histológica foi predominantemente histocitária, macrofágica, rica em polimorfonucleares neutrófilos (PMNs), em torno dos fungos inoculados (Fig. 1A); estes mantinham ainda, em geral, morfologia preservada, com massa protoplasmática central basófila e cápsula íntegra.

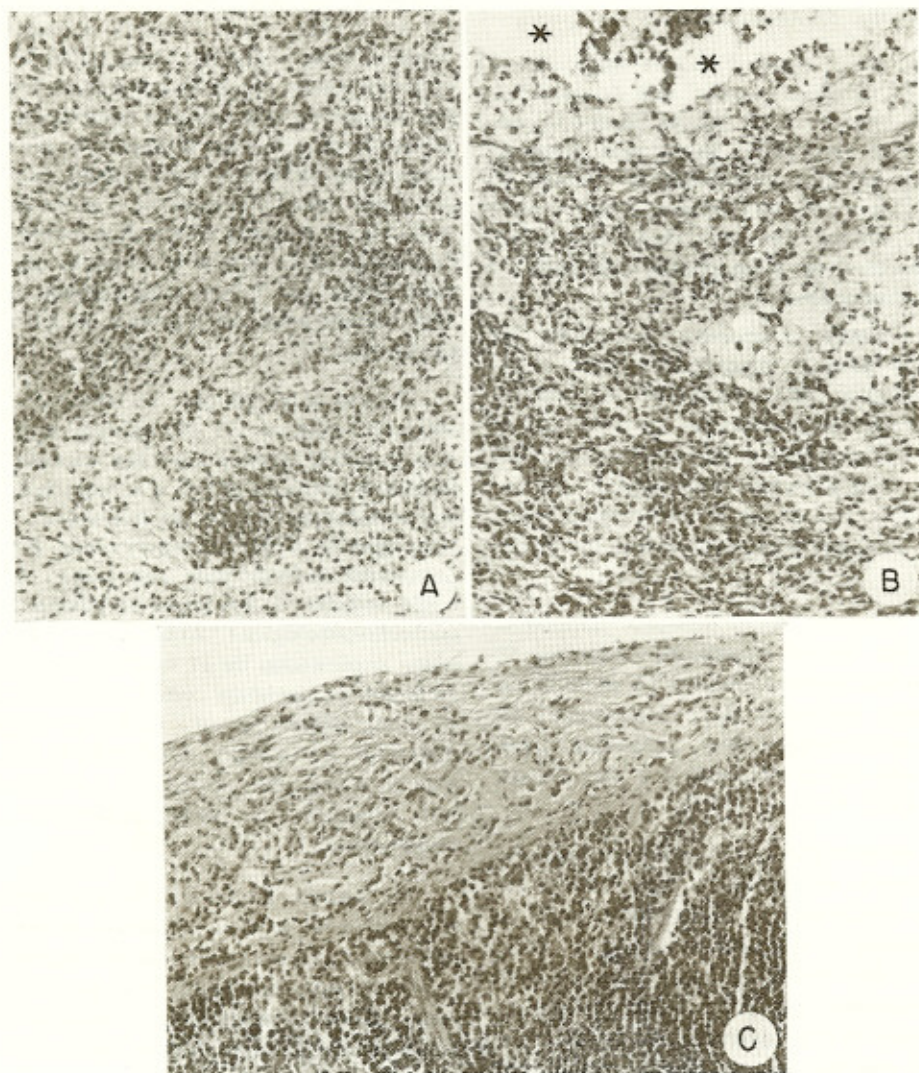


Fig. 1 A) — Peritonite paracoccidioidomycótica — 1.^a semana de infecção: Inflamação rica em macrófagos e neutrófilos, com formação de microabscessos (H.E., 200x). Fig. 2 B) — Peritonite paracoccidioidomycótica — 4.^a semana de infecção: Tecido de granulação com macrófago, células xantomatosas e neutrófilos, em torno de inóculo necrótico (*) (H.E., 200x). Fig. 3 C) — Cápsula do baço: Peritonite paracoccidioidomycótica — 16.^a semana de infecção: Cicatriz fibrosa, sem fungos ou necrose; inflamação mononuclear residual discreta (H.E., 200x).

Durante a 2.^a e 3.^a semana de infecção, este padrão se manteve e houve o aparecimento de proliferação de tecido de granulação exuberante, tendendo a circunscrever e encapsular o processo; o centro dos nódulos era constituído por áreas mais ou menos extensas de necrose, com número variável de fungos; estes mostraram protoplasma mais eosinofílico, contraído, irregular, sendo rara a presença de gemulação. Não se observou o aparecimento de reação granulomatosa epitelióide, sendo o processo fundamentalmente macrofágico, com ou sem a presença de células xantomatosas.

A partir da 4.^a semana, houve início de fibrose encapsulante em redor dos focos inflamatórios; o centro dos nódulos, contendo material e fungos necróticos, mostrou-se progressivamente invadido e substituído por tecido de granulação, rico em macrófagos, células xantomatosas e PMNs (Fig. 2B); chamou atenção, número crescente de plasmócitos, em meio ao infiltrado inflamatório.

Na 8.^a semana, o processo peritoneal foi muito menos intenso, mantendo sempre o caráter macrofágico, não epitelióide da resposta inicial. O tecido de granulação mostrou número elevado de linfócitos e plasmócitos, ao lado de fibrose; fungos foram encontrados em pequeno número nas lesões e excepcionalmente mostraram basofilia protoplasmática ou gemulação.

Na 16.^a semana, a inflamação peritoneal mostrou-se em franca resolução; cicatrizes fibrosas, principalmente evidentes na cápsula do fígado e baço; pequenos focos intersticiais de infiltração mononuclear sem parasitas; total reabsorção das áreas de necrose e dos fungos inoculados (Fig. 3C).

Lesões microscópicas de disseminação foram encontradas no fígado e pulmões de camundongos infectados e sacrificados após 1, 2, 3 e 4 semanas, com incidência em 80%, 60%, 100% e 60% dos animais, respectivamente. O número e extensão dos focos metastáticos de infecção foram muito variáveis nos animais de cada grupo; sua histopatologia foi semelhante à da peritonite, caracterizada por inflamação histiocitária e neutrofílica, sem a formação de granuloma epitelióide. Da mesma forma que a peritonite paracoccidiodomicótica, as lesões de disseminação não foram progressivas, não

tendo sido mais observadas a partir da 8.^a semana de infecção.

DISCUSSÃO

A infecção peritoneal do camundongo pelo *P. brasiliensis*, nas condições experimentais por nós utilizadas, caracterizou-se por processo inflamatório crônico inespecífico em torno dos fungos inoculados, encontrado em 100% dos animais infectados. O processo foi progressivo e intenso até a 4.^a semana de infecção; a partir desta fase, houve bloqueio e destruição dos fungos, com posterior reabsorção e organização das lesões necróticas e exsudativas das fases anteriores. Os animais sacrificados após 16 semanas de infecção mostraram lesões focais, cicatriciais, fibrosas, sem fungos, ao nível do peritônio parietal e visceral. Lesões de disseminação para o fígado e pulmões foram encontradas desde a 1.^a até a 4.^a semana de infecção; estes focos não foram progressivos, não tendo sido encontrados nos animais sacrificados posteriormente.

Devido a diferenças: 1) Na cepa de *P. brasiliensis* utilizada; 2) No inóculo e 3) Nas peculiaridades, idade e sexo dos camundongos infectados, torna-se difícil a comparação de nossos resultados com os da literatura. Trabalhos empregando a via intraperitoneal de infecção paracoccidiodomicótica são pouco numerosos e não voltados à descrição detalhada das lesões anátomo-patológicas. ALMEIDA³, em 1929, inoculou o peritônio de 11 camundongos, com pus de lesão de paciente com paracoccidiodomicose, e não obteve "pega". Resultado negativo semelhante foi obtido por SARAVIA-GOMES¹⁸, com a inoculação peritoneal de camundongos com suspensão de terra contaminada com *P. brasiliensis*.

Os demais Autores^{7,13,17}, que utilizaram a via peritoneal para a produção de infecção experimental do camundongo, obtiveram, de modo geral, infecção lenta, não progressiva, não fatal, pouco disseminante e com tendência a resolução espontânea. Estes dados estão concordes com os por nós obtidos.

Nenhum dos trabalhos acima citados estudou evolutivamente as respostas imunes humoral e celular anti-*P. brasiliensis* nos camundongos experimentalmente infectados. Observamos

anticorpo gênese específica a partir da 2.^a semana de infecção que foi máxima na 4.^a semana, pico coincidente com o bloqueio da infecção, morte dos parasitas e início do processo de resolução⁴. Depois desta fase, os títulos de anticorpos anti-*P. brasiliensis* decresceram, fato em concordância com a infecção humana, na qual a "cura" da doença se acompanha de queda ou negatificação dos níveis de anticorpos específicos¹⁰.

O desenvolvimento de respostas de hipersensibilidade retardada, medida pelo teste do coxim plantar, foi detectado, nos nossos animais infectados, a partir da 1.^a semana de infecção; a precocidade da resposta imune celular quando comparada com a resposta imune humoral, no nosso modelo experimental, pode ser interpretada como devida à maior sensibilidade do teste do coxim plantar em relação a reação de imunodifusão dupla em gel de ágar; por outro lado, nas micoses profundas, há dados que demonstram que a resposta celular tende a ser detectada mais precocemente do que a resposta humoral⁸. Os índices de resposta de hipersensibilidade retardada se mantiveram elevados até a 4.^a semana de infecção, quando então houve negatificação da resposta (8.^a semana), que reapareceu na 16.^a semana.

Este comportamento flutuante da resposta imune-celular específica tem sido descrita em outras infecções experimentais do camundongo⁸ e poderia estar relacionada com o aparecimento, na 8.^a semana, de uma classe de anticorpos capazes de inibir ou de bloquear a expressão da resposta de hipersensibilidade retardada ou estar ligada a fenômeno de tolerância provocado pelo aumento sérico de antígenos específicos, causado pela necrose dos fungos, ao nível dos focos inflamatórios⁵.

Em resumo, os camundongos sacrificados 16 semanas após a inoculação intraperitoneal de suspensão de *P. brasiliensis* apresentaram bloqueio e "cura" da infecção, caracterizados por: 1) Reabsorção, organização e fibrose dos focos inflamatórios peritoneais; 2) Regressão dos focos infecciosos metastáticos; 3) Queda dos títulos dos anticorpos específicos e 4) Persistência de resposta de hipersensibilidade retardada específica. Apesar deste último fato, não observamos, em nenhuma fase do experimento,

o desenvolvimento de inflamação granulomatosa, em torno dos fungos inoculados.

Em outros contextos infecciosos experimentais, como a tuberculose e esquistossomose¹, a presença de resposta de hipersensibilidade retardada está relacionada com o desenvolvimento de inflamação granulomatosa, que se intensifica e se transforma em granulomas epitelióides paralelamente ao aparecimento e aumento da resposta imune celular¹. Por outro lado, hipersensibilidade retardada por si só não é suficiente para o desenvolvimento de inflamação granulomatosa. Outros fatores são necessários, como a natureza da agressão e sua capacidade de provocar maturação macrofágica¹. Apesar do *P. brasiliensis* ser agente que normalmente determina a formação de granulomas epitelióides frouxos ou compactos, na nossa infecção peritoneal o processo foi rapidamente evolutivo, com destruição eficiente do parasita pelas defesas imunológicas e celulares macrofágicas e neutrofílicas — do hospedeiro, sem nunca ocorrer a organização da inflamação em granulomas.

Em conclusão, a infecção paracoccidiodomicótica experimental peritoneal do camundongo, como padronizada no modelo que agora descrevemos, apresenta algumas características que poderão ser de interesse para futuras investigações: 1) O processo não é progressivo: este fato permite o delineamento de experimentos visando o estudo da reação hospedeiro-parasita nesta micose profunda, nos quais se pode facilmente variar a virulência do parasita ou a resistência do hospedeiro; 2) A inflamação não é granulomatosa: assim sendo, experimentos posteriores usando o estudo comparativo da inflamação peritoneal em camundongos com ou sem sensibilização prévia poderão fornecer subsídios para o conhecimento do papel da resposta imune celular no desenvolvimento de granuloma epitelióide; 3) Há o desenvolvimento precoce de respostas de hipersensibilidade retardada e de anticorpo gênese específica, após 1 e 2 semanas de infecção, respectivamente. São raros os trabalhos que correlacionam a resposta imune ao *P. brasiliensis* com a natureza da inflamação e com a evolução e o prognóstico da infecção^{9,15,16}; sem dúvida estudos desta natureza são importantes para o melhor conhecimento das relações parasita-hospedeiro nesta micose profunda e para o melhor manuseio clínico, terapêutico e imunológico da infecção.

S U M M A R Y

Experimental paracoccidioidomycosis in the mouse. I — Some immunopathological findings in the intraperitoneal infection

Thirty 4 week-old male white mice were intraperitoneally injected with 10×10^6 fungi (live cerebriform culture of the sample 18). Ten control mice were injected with sterile saline. Five infected and 2 control animals were killed at week 1, 2, 3, 4, 8, 16 and the following studies were carried out: 1) Foot-pading tests for measuring delayed-hypersensitivity response, performed 24 h prior to sacrifice; 2) Detection and quantification of the specific antibody production by the Ouchterlony immunodiffusion test; 3) Histopathology of the peritoneum, liver, spleen, kidney, lungs and gut.

It was observed: 1) The peritoneal inflammation was non-specific, neutrophil-macrophage rich, surrounding the inoculated fungi; after week 4, there was progressive fibrosis, with resolution of infection; at week 16, only small peritoneal fibrotic scars were noticed; 2) There were metastatic foci in the liver and lungs since the 1st week of infection which were no more found after week 4; 3) Delayed hypersensitivity reactions were present throughout the experiment, except at week 8; 4) Specific antibodies were first detected at week 2, peaked at week 4 and decreased towards week 16.

We would like to emphasize: 1) The blockade and the beginning of the "cure" of the infection were coincident with good delayed hypersensitivity response and maximal antibody titers; 2) The peritoneal inflammation showed no granulomatous foci despite of the early appearance of cell-mediated immune response.

This experimental model may be a good tool for further studies on the immunopathology of the *P. brasiliensis* infection in the mouse.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o valioso auxílio técnico dos Srs. Luiz Gastão Chamma e Wilson Vergílio Fábio e na parte estatística da Dra. Sheila Zambello de Pinho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, D. O. — The granulomatous inflammatory response. *Am. J. Path.* 84: 164-191, 1976.
2. ALENCAR, S. M.; TRINDADE, R. A. S. & DILLON, N. L. — Paracoccidioidomicose — perfil epidemiológico. In: ENCONTRO SOBRE PARACOCIDIIDOMICOSE, 1.ª. Barra Bonita, S.P., Set. 28-30, 1979. Anais... Barra Bonita, 1979.
3. ALMEIDA, F. V. — Blastomycose experimental. *Bol. Biol. Lab. Parasit. Fac. Med. Univ. São Paulo* 15: 20-22, 1929.
4. BRITO, T. & FAVA NETTO, C. — Disseminated experimental South American Blastomycosis of the guinea pig. A pathologic and immunologic study. *Path. Microbiol.* 26: 29-43, 1963.
5. CANTER, H. & GERSHON, R. K. — Immunological circuits: cellular composition. *Fed. Proc.* 38: 2058-2064, 1979.
6. CARANDINA, L. & MAGALDI, C. — Inquérito sobre blastomycose sul-americana pela intradermo reação em uma comunidade rural do Município de Botucatu, S.P. (Brasil). *Rev. Saúde Públ. S. Paulo* 8: 171-179, 1974.
7. CONANT, N. F. & HOWEEL Jr., A. — The similarity of the fungi causing South American blastomycosis (paracoccidioidal granuloma) and North American blastomycosis (Gilchrist's disease). *J. Invest. Derm.* 5: 353-370, 1942.
8. CROWLE, A. J. — Delayed hypersensitivity in the mouse. *Adv. Immunol.* 20: 197-264, 1975.
9. DEFAVERI, J. — Paracoccidioidomicose pulmonar experimental do camundongo. [Tese de mestrado]. São Paulo, Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, 1979.
10. FAVA NETTO, C. — Imunologia da paracoccidioidomicose. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 18: 42-43, 1976.
11. FAVA NETTO, C. — Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomycose sul-americana, com antígeno polissacarídico. *Arq. Cir. Clin. Exper.* 18: 197-254, 1955.
12. FRANCO, M. F.; FAVA NETTO, C. & CHAMMA, L. G. — Reação de imunofluorescência indireta para o diagnóstico sorológico de blastomycose sul-americana. Padronização da reação e comparação dos resultados com a reação de fixação do complemento. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 15: 393-398, 1973.
13. MACKINNON, J. E. — Pathogenesis of South American blastomycosis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 53: 487-494, 1959.
14. MOTA, F. T. & FRANCO, M. F. — Observação sobre a pesquisa de anticorpos IgM anti-Paracoccidioides brasiliensis, por imunofluorescência, no soro de pacientes com paracoccidioidomicose. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 21: 82-89, 1979.
15. MUSATTI, C. C. — Imunidade celular na paracoccidioidomicose. [Tese de Doutorado]. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1974.

16. PERAÇOLI, M. T. S. — Paracoccidiodomicose experimental do hamster. Estudo da imunidade celular e humoral, correlação com a morfologia das lesões de inoculação e disseminação. [Tese de Mestrado]. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1978.
17. SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F. & SERRANO, L. E. — Host-parasite relationships in the yeastlike form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb 9. *Infect. Immun.* 15: 343-346, 1977.
18. SARAIVA-GOMES, J. — Contribution a l'étude expérimentale de l'épidémiologie de la blastomycose sud-américaine. *Brux. Med.* 9: 577-587, 1968.
19. VIEIRA E SILVA, C. R.; IWANA DE MATOS, M. C. F. & FUJIMORE, K. — Scanning electron microscopy of *Paracoccidioides brasiliensis*. Study with and without pre-treatment with pooled sera from patients with South-American Blastomycosis. *Mycopath. Mycol. Appl.* 54: 235-251, 1974.
20. WINDER, C. V.; WAX, J. & BEEN, M. A. — Rapid foot volume measurement on unanesthetized rats, and the question of a phenylbutazone effect on anaphylactoid edema. *Arch. Int. Pharmacodyn. Theor.* 62: 174-187, 1957.

Recebido para publicação em 31/1/1980.