

CONTRIBUIÇÃO DOS MODELOS MURINOS NO ESTUDO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

Ana Paula Junqueira Kipnis¹

RESUMO

A paracoccidiodomicose (PBM) é a micose profunda de maior ocorrência no Brasil e na América Latina. Apesar dos grandes avanços nos estudos dos pacientes acometidos por PBM, várias questões ainda continuam sem solução. O uso de animais têm contribuído para o melhor entendimento destas lacunas e favorecido as abordagens terapêuticas ao longo dos anos. Resumem-se, neste trabalho, as principais contribuições das infecções murinas experimentais para o entendimento da relação parasito-hospedeiro da infecção paracoccidiodomicótica.

UNITERMOS: Paracoccidiodomicose. Infecção experimental. Camundongos.

INTRODUÇÃO

A paracoccidiodomicose (PBM), doença crônica, causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, é a micose sistêmica de maior incidência na América Latina, sendo frequentemente encontrada no Brasil, Venezuela, Colômbia e Argentina (Montenegro, 1927; Mackinnon, 1959; Franco & Montenegro, 1982; Franco, 1987; Restrepo, 1988; Restrepo et al., 1990; San-Blas et al., 1992; Restrepo, 1994). A PBM pode se desenvolver, segundo Mendes (1994), de forma aguda, subaguda ou crônica. As formas subaguda e aguda apresentam uma progressão rápida através da disseminação pelas vias linfáticas e hematogênicas, atingindo principalmente o baço, o fígado, os linfonodos e a medula óssea. As lesões pulmonares são raras. Estas formas clínicas acometem principalmente crianças, adolescentes e adultos

¹ Prof^a Adjunto do Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás.

E-mail: anapaula@ipe.ufg.br

Endereço para correspondência: Rua Delenda Rezende de Melo eq. com 1^a Avenida, Setor Universitário. Caixa Postal 131, CEP 74605-050, Goiânia, GO.

Recebido para publicação em 24/04/99.

jovens. A PBM crônica pode ser classificada em leve, moderada e severa de acordo com a gravidade da doença. Em geral, ainda conforme descreveu Mendes (1994), a forma crônica de PBM acomete principalmente adultos do sexo masculino com idade superior a 30 anos. Já de acordo com as idéias de Montenegro & Franco (1994) e Del Negro et al., (1994), na forma crônica, os focos quiescentes de multiplicação pulmonares primários estariam ativos, promovendo uma disseminação lenta e progressiva das leveduras pelo organismo. A doença crônica pode acometer a pele, as mucosas, os linfonodos, o sistema nervoso central, o intestino, os ossos, a glândula adrenal, o pâncreas e os órgãos genitais. Além destas formas descritas, a PBM exibe inúmeras formas clínicas intermediárias entre a aguda e a crônica (Mendes, 1994).

Os modelos experimentais em diferentes espécies animais têm contribuído para o estudo da resposta imune do hospedeiro a esta infecção (Moscardi e Franco, 1980; Moscardi e Franco, 1981; Brummer et al., 1984; Moscardi-Bacchi e Franco, 1985; Franco, 1987; Calich et al., 1987; Restrepo et al., 1992; Singer-Vermees et al., 1993; Hostetler et al., 1993; Junqueira-Kipnis et al., 1994; Coelho, et al., 1994). Com o uso de animais foi possível definir alguns dos principais parâmetros envolvidos na susceptibilidade a esta infecção. O intuito deste trabalho é o de fornecer as principais contribuições do modelo murino para o entendimento das relações parasito-hospedeiro da infecção paracoccidiodomicótica.

OS PRINCIPAIS MODELOS MURINOS

Mackinnon, em 1959, foi o primeiro a utilizar camundongos como modelo experimental. Este pesquisador infectou camundongos não isogênicos por diferentes vias de inoculação, estudando as possíveis portas de entrada do agente na natureza. A única via que não induziu a infecção foi a via oral, sugerindo que a contaminação por água e alimentos talvez não seja a principal forma de transmissão da doença.

O camundongo, desde então, é a espécie mais utilizada para o estudo da PBM experimental. A disponibilidade de diversas linhagens isogênicas, com diferentes características genéticas, tem favorecido o estudo das relações parasito-hospedeiro, cruciais no estabelecimento de resistência ou de susceptibilidade à infecção.

Na tentativa de imitar a porta de entrada mais provável da infecção humana, tem sido utilizada a instilação de conídios, de formas filamentosas ou de leveduras nas vias aéreas superiores de diferentes linhagens isogênicas de camundongos. A falta de reprodutibilidade destes experimentos foi associada à dificuldade do patógeno em atingir os pulmões. Os conídios, por serem partículas pequenas, foram os que se mostraram mais eficazes em induzir a infecção murina, pela via pulmonar (McEwen et al. 1987; Restrepo

et al. 1992). De acordo com Restrepo et al. (1992), com Linares e Friedman et al. (1972) e Defaveri et al. (1982), as lesões induzidas pelos fungos inoculados por esta via são geralmente semelhantes às descritas para outras vias. No início as lesões apresentam fibras colágenas desorganizadas e são ricas em polimorfonucleares. Após o estabelecimento do patógeno, ocorre a organização dos granulomas que passam a ser ricos em macrófagos, em células gigantes e em linfócitos, apresentando infiltrados confluentes e delimitados por fibras de colágeno. As lesões culminam com a fibrose da área pulmonar afetada. As disseminações observadas nestes animais dependeram da dose inoculada e da cepa utilizada. Segundo Defaveri et al. (1982), a resposta imune celular, medida através de testes de hipersensibilidade tardia, mostrou-se ativa ao longo dos experimentos, enquanto o título máximo de anticorpos específicos ocorreu entre os 30 e 60 dias de infecção, decaindo nas análises subseqüentes. Os estudos de Brummer et al. (1984), produzindo um modelo de infecção pulmonar aguda fatal e crônica disseminada, variando a dose das leveduras em camundongos BALB/c, serão descritos *a posteriori*.

A determinação das relações parasito-hospedeiro, induzidas pela infecção endovenosa estudada por Biagioni et al. (1987) e por Moscardi-Bacchi et al. (1988), demonstrou que por meio desta via, em geral, ocorre alta disseminação das leveduras com baixa resposta imune celular, induzindo invariavelmente à morte dos animais. A deposição de IgG e de proteínas do complemento sobre as leveduras nos granulomas, segundo Biagioni et al. (1987), parece ter um papel fundamental na resposta imune frente ao fungo.

A injeção intraperitoneal de leveduras de *P. brasiliensis* em camundongos, embora não seja a porta de entrada natural, tem sido amplamente utilizada pelo fácil manuseio e reprodutibilidade (Moscardi e Franco, 1981; Singer-Vermes et al. 1989; Singer-Vermes et al. 1993; Junqueira-Kipnis et al. 1994). Moscardi e Franco (1981) foram os primeiros a realizar um estudo sistemático da infecção murina intraperitoneal. Estes autores observaram que a inflamação peritoneal induzida pelas leveduras inoculadas não era granulomatosa.

ANIMAIS SENSÍVEIS E RESISTENTES

A classificação de linhagens isogênicas de camundongos em sensíveis (B10.A, B10.D2/oSn e B10.D2/nSn), em intermediárias (BALB/c, C57Bl/10, CBA e C3H/Fe) e em resistentes (A/Sn, DBA/2 e C3H/HeJ) permitiu o estudo dos mecanismos imunológicos envolvidos no controle da infecção intraperitoneal (Singer-Vermes et al., 1993; Calich, et al., 1985). Os principais estudos, usando a via intraperitoneal nestas linhagens, possibilitaram o esclarecimento de vários aspectos correlacionados à susceptibilidade. Dentre eles, observou-se que a susceptibilidade independe da dose inoculada; a região gênica H-2, responsável pela produção das

proteínas do CPH (Complexo Principal de Histocompatibilidade), não parece ser determinante da susceptibilidade à infecção pelo *P. brasiliensis*, uma vez que camundongos que apresentam o mesmo haplótipo comportam-se de maneira diferente (B10A e A/Sn) (Singer-Vermes et al., 1993; Calich et al., 1985) e que a presença de C5 ou a ausência de resposta a LPS (lipopolissacarídeo) não interferem com a mortalidade (Burger et al., 1985). Através de cruzamento entre linhagens isogênicas de camundongos demonstrou-se que a resistência à infecção intraperitoneal é devida a um único gene autossômico dominante (Calich et al., 1987).

Nos últimos anos apresentaram-se vários trabalhos cuja temática era a determinação dos possíveis mecanismos de resistência à infecção nestes modelos. O estudo da resposta imune natural, usando a linhagem B10.A, como camundongo sensível, e a A/Sn, como resistente, mostrou que os macrófagos peritoneais das duas linhagens aumentam a expressão de moléculas de classe II do CPH e que a produção de peróxido de hidrogênio é maior nos animais resistentes em relação aos sensíveis (Singer-Vermes et al., 1993). A resposta imune humoral, nestes experimentos, foi caracterizada pela baixa produção de anticorpos específicos em camundongos sensíveis. Já a resposta imune celular, determinada através da avaliação da reação de hipersensibilidade tardia (RHT) aos antígenos de *P. brasiliensis*, mostrou-se altamente reativa em animais resistentes e em sensíveis. No entanto, após quatro semanas de infecção, ambas as linhagens tornaram-se anérgicas e apenas a linhagem resistente voltou a reagir ao antígeno após a oitava semana (Singer-Vermes et al., 1993). Em 1994, Calich et al., entretanto, mostraram que os camundongos susceptíveis da linhagem B10.A apresentam ativação ineficiente de macrófagos, depressão da reação de HT, altos níveis de IgG2b e IgA específicos e produção exacerbada de anticorpos IgG1, IgG2b e IgG2a. Em contraste, camundongos resistentes apresentam ativação eficiente dos macrófagos, resposta de HT intensa e baixos níveis de anticorpos inespecíficos e anticorpos específicos com predomínio do isótipo IgG2a.

Estudos mais aprofundados realizados recentemente por Fazioli (1997), analisando a linfoproliferação e o papel dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, mostraram que os animais resistentes apresentam respostas proliferativas frente ao antígeno fúngico mais precoces do que os animais sensíveis, indicando que a resposta imune celular destes camundongos se estabelece mais lentamente. Estudos envolvendo depleção dos linfócitos T CD4⁺ mostraram que a proliferação se deve principalmente às células T CD4⁺. Nas duas linhagens, a capacidade de proliferação frente ao mitógeno, no entanto, não é alterada com a infecção. A depleção de linfócitos T CD8⁺ leva ao aumento da linfoproliferação tanto nos animais sensíveis como nos resistentes, o que é sugestivo do papel inibitório destas células. Ainda com estudos de depleção, a autora concluiu que a reatividade cutânea e a resposta imune humoral são dependentes de linfócitos T CD4⁺ nos animais resistentes.

Nos animais sensíveis, esta dependência é apenas parcial, tendo em algumas etapas o envolvimento das células T CD8⁺.

O estudo da produção de citocinas nas culturas de linfonodos por linhagens sensíveis e resistentes foi realizado por Kashino (1997). A produção de citocinas em culturas de linfonodos regionais é em geral mais baixa do que as obtidas das culturas dos linfonodos totais. Células obtidas dos linfonodos que drenam o sítio da infecção nos camundongos resistentes produzem IFN- γ e IL-2, no início da infecção, e IL-5, mais tardiamente. Nos camundongos sensíveis observou-se, mais cedo, uma baixa produção de IFN- γ , associada à produção de IL-5. A produção de citocinas pelas células dos linfonodos totais permitiram polarizar melhor os tipos de respostas envolvidas. Enquanto as células dos camundongos resistentes apresentam uma alta produção de IFN- γ e de IL-2, as células dos camundongos sensíveis apresentam altos níveis de IL-10, IL-4 e IL-5. Nestes estudos, a proteção dos animais sensíveis contra a infecção também se correlacionou diretamente com os níveis de IL-2. Além disso, a doença exacerbada nestes camundongos está associada à produção preferencial de IL-4, IL5 e IL-10.

Estes resultados em conjunto mostram que, na infecção intraperitoneal murina utilizando linhagens sensíveis e resistentes, existe uma polarização do padrão de resposta imune. Assim, o animal resistente apresenta uma resposta imune envolvendo a ativação de células efetoras do tipo Th1. A ativação destas células se traduz por alta produção de IFN- γ , por altos níveis de anticorpos específicos da classe IgG2a, por maior ativação macrofágica e por resposta imune mais precoce. Já o animal sensível apresenta resposta imune do tipo Th2, com baixos níveis de anticorpos específicos e com alta produção de IgG1 e IgG2b. Apesar de a infecção induzir aumento da expressão de moléculas do CPH de classe II nos macrófagos peritoneais, estas células encontram-se menos ativadas nos camundongos sensíveis.

ANIMAIS COM SUSCEPTIBILIDADE INTERMEDIÁRIA

O camundongo BALB/c tem sido utilizado como modelo da infecção pelo *P. brasiliensis*, por apresentar susceptibilidade intermediária e por ser amplamente utilizado em outros modelos experimentais de infecções (Restrepo et al., 1992). A utilização desta linhagem permite, portanto, avaliar padrões de resposta imune que envolvem mecanismos efetores menos polarizados do que aqueles observados nas linhagens sensíveis e resistentes, provavelmente imitando a infecção natural.

Estudar o papel da parede celular das leveduras de *P. brasiliensis*, na indução da ativação da resposta imune, é importante para a determinação de elos de ligação entre a resposta imune específica e a natural. Em 1993, Figueiredo et al. estudaram a produção de fator de necrose tumoral (TNF) em

camundongos BALB/c desafiados com leveduras da cepa avirulenta e virulenta, assim como com preparações contendo a parede celular destes fungos. Os níveis séricos de TNF foram maiores nos camundongos desafiados com leveduras da cepa virulenta ou parede celular da mesma, quando comparados com animais desafiados com fungos da cepa avirulenta. Quando a beta-glucana foi depletada das paredes celulares, os níveis de TNF, produzidos por macrófagos estimulados *in vitro*, foram semelhantes. Estes autores concluíram que os diferentes níveis de TNF produzidos pelas duas cepas provavelmente dependem da concentração de beta-glucana, que é superior nas cepas virulentas. Os lipídios presentes na parede celular destes fungos parecem desempenhar um papel importante na indução de granulomas. Lipídios isolados de *P. brasiliensis* quando inoculados por via intravenosa induzem a formação de reação inflamatória granulomatosa nos pulmões de camundongos (Silva, 1985). Polissacarídeos extraídos da parede celular do *P. brasiliensis* são capazes de induzir a inflamação crônica, causando perda do peso corporal, esplenomegalia, inflamação pulmonar e morte na dose de 6 mg/animal. Assim, componentes da parede celular como lipídios e polissacarídeos parecem importantes indutores da inflamação granulomatosa e da resposta imune desencadeada pela PBM (Silva e Fazioli, 1985).

A capacidade microbicida dos macrófagos peritoneais dos camundongos BALB/c normais foi avaliada por Cano et al. (1994). Macrófagos peritoneais expostos *in vitro* a conídios do fungo são capazes de fagocitá-los. No entanto, como acontece com os macrófagos humanos, estes conídios são capazes de se transformar em leveduras e de se reproduzir. Contrariamente, em macrófagos previamente tratados com citocinas, os conídios perdem a capacidade de multiplicação e de diferenciação. Estes achados sugerem que o meio intracelular de macrófagos não ativados favorece a transformação dos conídios em leveduras. Foi também demonstrado que os conídios ingeridos por macrófagos peritoneais não se diferenciam em leveduras após o tratamento com deferroxamina, uma droga quelante de ferro. Quando estes macrófagos são tratados com holotransferrina (transferrina humana saturada de ferro), a capacidade de transformação e de reprodução dos conídios é restituída. Todavia, após o tratamento com apotransferrina (transferrina sem ferro), esta capacidade não é restituída. Conclui-se que a restrição de ferro pode ser um dos mecanismos pelo qual os macrófagos ativados controlam a transformação dos conídios ingeridos em leveduras (Cano et al., 1994). Estes dados em conjunto sugerem que os macrófagos peritoneais dos animais BALB/c, quando ativados, podem eliminar conídios infectantes de *P. brasiliensis*.

Quanto à susceptibilidade contra a infecção, os camundongos BALB/c podem desenvolver doença aguda, crônica ou progressiva, dependendo da dose e da via de inoculação. Os camundongos BALB/c

quando infectados pela via pulmonar com um baixo inóculo de leveduras de *P. brasiliensis* apresentam uma forma não progressiva da doença e produzem IL-4 e IFN- γ . De forma contrária, os animais infectados com um inóculo maior desenvolvem uma doença progressiva caracterizada pela produção de IL-4, na ausência de IFN- γ . O tratamento destes animais com anti-IL-4 resultou no aumento da resistência do hospedeiro à infecção com conseqüente diminuição dos níveis de IgE. A diminuição das lesões nos órgãos (fígado e pulmão) após tratamento com IFN- γ ou com anti-IL-4 se correlacionou também com a diminuição de IgE (Brummer et al., 1984; Hostetler et al., 1993).

O padrão de fibrose e a seqüência das lesões desenvolvidas nos camundongos BALB/c comparados com animais BALB/c nude (nu/nu) e (nu/+) foram estudados por Lenzi e colaboradores (1994) e por Burger e colaboradores (1996). Estes autores observaram que, na primeira semana de infecção de camundongos das duas linhagens, ocorre a encapsulação do granuloma com predominância de colágeno tipo 3 e carboxiglicanas. No entanto, na quarta semana de infecção, os camundongos heterozigotos desenvolvem lesões contendo agregados pseudoxantomatosos com macrófagos e com predomínio de colágeno tipo 1, enquanto os camundongos nu/nu apresentam lesões não capsuladas permanentemente ativas contendo colágeno tipo 3 e 1. Lenzi e colaboradores também observaram, na infecção de animais nu/nu pelo *P. brasiliensis*, a presença de um envoltório de fibras reticulares contendo famílias de leveduras com célula-mãe e células-filhas, sugerindo reprodução extracelular. Já em relação à evolução das lesões, Burger e colaboradores demonstraram que os macrófagos e os neutrófilos são as células predominantes nos granulomas de animais BALB/c nu/nu e nu/+ e estão sempre associadas à hematopoiese extensa. A partir da quarta semana de infecção, no entanto, os camundongos nu/nu apresentam uma progressão da lesão com metástases possuindo inúmeras leveduras, enquanto os camundongos nu/+ apresentam uma tendência ao encapsulamento e à substituição do tecido lesado por estruturas de reposição.

Dentre os vários trabalhos apresentados, podemos concluir que a infecção de camundongos BALB/c pode induzir resposta imune com padrões variados, dependendo da dose de antígeno utilizada. De uma maneira geral, estes camundongos apresentam macrófagos com boa capacidade microbicida, capacidade de montar um granuloma epitelióide característico da ativação de células efetoras do tipo Th1 e produzem IFN- γ como citocina efetora, quando em situações de resistência, e IL-4, em situações de susceptibilidade.

PAPEL DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL

O papel dos anticorpos na susceptibilidade à infecção intraperitoneal foi estudado utilizando como modelo um camundongo selecionado geneticamente para a alta ou baixa expressão de anticorpos. Carvalhaes et al. (1986) demonstraram que os camundongos bons produtores de anticorpos (H- seleção III) apresentaram maior sobrevida e lesões menores que os camundongos maus produtores de anticorpos (L- seleção III). Estes trabalhos sugerem um papel protetor para os anticorpos. No entanto, quando utilizada a seleção IV-A neste estudo, Soares et al. (1992) obtiveram resultados opostos, em que os bons produtores de anticorpos são sensíveis à infecção.

O envolvimento dos anticorpos na proteção da infecção murina à PBM continua controverso. A utilização de um animal que apresente alterações funcionais dos linfócitos B, levando à diminuição dos níveis séricos de anticorpos, e a ausência de resposta a antígenos microbianos conservados na evolução poderiam tentar elucidar esta lacuna. O entendimento destas relações em situações de imunodeficiência é pouco entendido. Estas questões foram abordadas no trabalho de Junqueira-Kipnis (1998), na tentativa de caracterizar a resposta imune, utilizando, como modelo, camundongos com imunodeficiência ligada ao cromossomo X (BALB.xid) e camundongos normais (BALB/c) infectados com *Paracoccidioides brasiliensis*, isolado 01. Neste trabalho foram abordadas as alterações histopatológicas, na ultra-estrutura celular do hospedeiro e das leveduras, as fenotípicas e de produção de moléculas efetoras pelas células peritoneais, as fenotípicas e de produção de moléculas efetoras pelas células esplênicas e os níveis séricos de imunoglobulinas específicas. Com este trabalho foi possível concluir que, apesar da deficiência apresentada pela resposta imune humoral dos camundongos BALB.xid, estes são mais resistentes à infecção do que os camundongos normais.

Este fato pode ser comprovado pelas seguintes observações:

1) Os granulomas induzidos pela infecção dos camundongos BALB.xid foram mais compactados, apresentando menor comprometimento tecidual e tendência à cura após 120 dias de infecção.

2) Enquanto o fígado dos camundongos normais apresentou leveduras com vida extracelular, no fígado dos camundongos imunodeficientes observaram-se somente leveduras fagocitadas e com tendência à degeneração.

3) As duas linhagens apresentaram a mesma cinética de alterações fenotípicas ao longo da infecção, sejam elas no peritônio ou no baço. As células peritoneais analisadas na fase aguda foram muito influenciadas pela infecção, quando se observou um aumento expressivo das células MAC-1⁺CD5⁻CD45R⁻, com tamanho e granulosidade intermediários, e um aumento menos pronunciado das células CD5⁺. Quanto aos fatores produzidos pelas

células peritoneais, notou-se uma alta produção de H₂O₂ e de NO aos três dias de infecção nas duas linhagens, enquanto aos sete dias, quando se observou um menor comprometimento peritoneal dos camundongos BALB.xid, apenas NO foi produzida pelas duas linhagens. As principais alterações fenotípicas induzidas nas células esplênicas, ao longo da infecção, foram: o aumento dos linfócitos CD45R⁺ e CD5⁺, evidenciado aos 20 dias de infecção; e um aumento precoce (sete dias) das células MAC-1⁺CD5⁺CD45R⁻ nos camundongos BALB.xid, evidenciado apenas aos 30 dias nos camundongos BALB/c. Quanto à expressão de moléculas coestimulatórias pelo linfócito B esplênico, notou-se que estas células nos camundongos BALB.xid apresentaram maior expressão de MAC-1 do que a dos camundongos BALB/c, enquanto o aumento da expressão de B7.1 e B7.2 foi parecido nas duas linhagens.

4) As células esplênicas dos camundongos BALB/c produzem cerca de oito vezes mais imunoglobulinas do que a dos camundongos BALB.xid, no entanto as células dos camundongos BALB.xid apresentaram maior capacidade de fazer mudança de classe para IgG.

5) Enquanto os camundongos BALB/c produziram baixos títulos de anticorpos específicos, os camundongos BALB.xid apresentaram alto título de anticorpos específicos principalmente dos isótipos IgG2a e IgG1.

6) Nenhuma alteração foi observada quanto à produção de citocinas pelas células esplênicas dos camundongos BALB/c infectados com relação aos seus controles. Entretanto, observou-se a diminuição da produção de IL-2, na fase aguda da infecção, e o aumento da produção de IFN- γ , na fase de cura da infecção, pelas células esplênicas dos camundongos BALB.xid.

CONCLUSÃO

As interações entre os fungos e os mamíferos existem há milhares de anos permitindo uma relação parasito-hospedeiro mais estável, em que apenas indivíduos em situações de imunodeficiência – sejam elas sociais ou não – são acometidos por doença fúngica clínica. O estabelecimento de modelos experimentais para o estudo destas infecções tem permitido uma boa correlação com a doença humana, facilitando o entendimento da relação parasito-hospedeiro, das ações terapêuticas e do estabelecimento de prognóstico.

SUMMARY

Contribution of murine models to the study of paracoccidioidomycosis

Paracoccidioidomycosis is the most frequent deep-seated fungal infection occurring in Brazil and Latin America. Even though progress has been made

in the study of this disease, many questions remain unanswered. The use of animal models has made a contribution to answer these questions and to test new therapeutic approaches to the disease. The main contributions of experimental murine infections to the comprehension of host-parasite interactions in the paracoccidioidomycosis are reviewed.

KEYWORDS: Paracoccidioidomycosis. Experimental infection. Mice.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Biagioni, L.M.V.; Orsi, S.; Chamma, L.G.; Sadatsune, T.; Franco, M. Imunoglobulinas e C3 no granuloma paracoccidióidico. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 29: 97, 1987.
2. Brummer, E. Restrepo, A., Stevens, D. A., Azzi, R., Gomez, A. M., Hoyos, G. L., MC Evens, J. G., Cano, L. E. and Bedout, C. Murine model of Paracoccidioidomycosis. Production of fatal acute pulmonary or chronic pulmonary and disseminated disease. Immunological and pathological observations. *J. Exp. Pathol.*, 7: 241-255, 1984.
3. Brummer, E., Castaneda E., and Restrepo, A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin. Microbiol. Rev.*, 6: 89-117, 1993.
4. Burger, E.; Singer-Vermes, L.M.; Calich, V.L.G. The role of C5 in experimental murine paracoccidioidomycosis. *J. Infect. Dis.*, 152: 425, 1985.
5. Burger, E., Miyaji, M., Sano, AS, Calich, V. L. G., Nishimura, K., Lenzi, H. Histopathology of paracoccidioidomycotic infection in athymic and euthymic mice: a sequential study. *Am. J. Med. Hyg.*, 55: 235-242, 1996.
6. Calich, V. L. G., Burger, E., Kashino, S. S., Fazioli, R. A., and Sinter-Vermes, L.M. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in mice is controlled by a single autosomal gene. *Infect. Immun.*, 55: 1919-1923, 1987.
7. Calich, V. L. G., Singer-Vermes, L. M., Siqueira, A. M., and Burger, E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Br. J. Exp. Pathol.*, 66: 585, 1985.
8. Calich, V.L.G.; Russo, M.; Vaz, C.A.C.; Burger, E. and Singer-Vermes, L.M. Resistance mechanisms to experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *J. Brazilian Ass. Adv. Sci.*, 46: 455-461, 1994.
9. Cano, L. E., Gomez, B., Brummer, E., Restrepo, A. and Stevens, D. A. Inhibitory effect of deferoxamine or macrophage activation on transformation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia ingested by macrophages: reversal by holotransferrin. *Infect. Immun.*, 62: 1494-1496, 1994.
10. Cano, L. E., Singer-Vermes, L. M.; Vaz, C. C. A.; Russo, M.; Calich, V. L. G. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune responses and specific isotype patterns. *Infect. Immun.*, 63: 1777-1783, 1995.
11. Cano, E.L.; Kashino, S.S.; Arruda, C.; André, D.; Xidieh, C.F. Singer-Vermes, L.M.; Vaz, C.A.C.; Calich, V.L.G. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun.*, 66: 800-806, 1998.
12. Carvalhaes, M.S.; Dias da Silva, W.; Birman, E.G.; Sant'anna, O.A.; Abrahamsohn, P.; Kipnis, T.L. Experimental Paracoccidioidomycosis in high and low antibody-producer mice. *Ann. Inst. Pasteur/Immunol.*, 137C: 127-141, 1986.
13. Coelho, K. I. R., Defaveri, J., Rezkallah-Ivasso, M. T., Peraçolli, M. T. S. Experimental paracoccidioidomycosis. In: Franco, M. F.; Lacaz, C. S.; Restrepo, A.; Del Negro, G. (Ed.) *Paracoccidioidomycosis*, Boca Ratón, Florida, CRC Press, p. 87-107., 1994.
14. Defaveri, J.; Rezkallah-Ivasso, M.T.; Franco, M. Experimental pulmonary paracoccidioidomycosis in mice: morphology and correlation of lesions with humoral and cellular immune response. *Mycopathologia*, 77: 3, 1982.

15. Del Negro, G.; Lacaz, C.S.; Zamith, V.A.; Siqueira, A. M. Franco, M. F.; Lacaz, C. S.; Restrepo, A.; Del Negro, G. (Ed.) polar forms of paracoccidiodomycosis. In: *Paracoccidiodomycosis*. General clinical aspects. Boca Ratón, Florida, CRC Press, p. 225-231, 1994.
16. Fazioli, R. A. *Paracoccidiodomycose experimental murina*. Estudo da linfoproliferação e da contribuição de células TCD4⁺ e TCD8⁺ na resposta imune de camundongos resistentes e susceptíveis. Tese de doutorado, 1997.
17. Figueiredo, F., Alves, L. M., Silva, C. L. Tumor necrosis factor production *in vivo* and *in vitro* in response to *Paracoccidiodomycose brasiliensis* and the cell wall fractions thereof. *Clin. Exp. Immunol.*, 93: 189-194, 1993.
18. Forjaz, M. H. H. *Estudo da epidemiologia da paracoccidiodomycose*. Rastreamento de áreas endêmicas e de reservares no Brasil, através do traçado do perfil migratório residencial-profissional, de pacientes diagnosticados em São Paulo, 1989.
19. Franco, M. F. e Montenegro, M. R. G. *Paracoccidiodomycosis Anatomia Patológica*, 97-117, 1982.
20. Franco, M. Host-parasite relationships in *Paracoccidiodomycosis*. *J. Med. Vet. Mycol.*, 25: 5-18, 1987.
21. Hostetler, J. S., Brummer, E., Coffman, R. L. & Stevens, D. A. Effect of anti-IL-4, interferon-gamma and an antifungal triazole (SCH42427) in *Paracoccidiodomycosis*. *Clin. Exp. Immunol.*, 94: 11-16, 1993.
22. Junqueira-Kipnis, A.P., O *Paracoccidiodomycose brasiliensis* utiliza o pâncreas para sua replicação na infecção de *Calomys callosus*? Anais do Congresso Brasileiro de Imunologia, Caxambu, 1994.
23. Junqueira-Kipnis, A.P. *Caracterização da infecção com camundongos BALB.xid com Paracoccidiodomycose brasiliensis*. Instituto de Ciências Biomédicas- Universidade de São Paulo, Tese de Doutorado, 1998.
24. Kashino, S.S. *Produção de citocinas por camundongos resistentes e suscetíveis à infecção pelo Paracoccidiodomycose brasiliensis*. Instituto de Ciências Biomédicas- Universidade de São Paulo, Tese de doutorado, 1997.
25. Lenzi, H. L., Calich, V. L. G., Miyaji, M., Sano, A., Nishimura, K., Burger, E. Fibrosis patterns of lesions developed by athymic and euthymic mice infected with *Paracoccidiodomycose brasiliensis*. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 27: 2301-2308, 1994.
26. Linares, L.I. and Friedman, L. Experimental *Paracoccidiodomycosis* in mice. *Infect. Immun.*, 5: 681, 1972.
27. Mackinnon, J. E., Pathogenesis of South American blastomycosis, *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 53: 487, 1959.
28. McEwen, J.G.; Bedoya, V.; Palatino, M.M.; Salazar, E.; Restrepo, A. Experimental murine *Paracoccidiodomycosis* induced by inhalation of conidia. *J. Med. Vet. Mycol.*, 30: 173, 1992.
29. Mendes, R.P. The gamut of clinical manifestations. In: *Paracoccidiodomycosis*. Franco, M. F.; Lacaz, C. S.; Restrepo, A.; Del Negro, G. ED. Boca Ratón, Florida, CRC Press, p. 233-252, 1994.
30. Montenegro, J. Acerca da inoculabilidade da blastomycose no Brasil. *Bras. Med.*, 41: 808-812, 1927.
31. Montenegro, M. R. and Franco F. Pathology. In: *Paracoccidiodomycosis*. Franco, M. F.; Lacaz, C. S.; Restrepo, A.; Del Negro, G. ED. Boca Ratón, Florida, CRC Press, p. 121-130, 1994.
32. Moscardi, M. and Franco, M. F. *Paracoccidiodomycose experimental do camundongo*. I Aspectos imunopatológicos da infecção intraperitoneal. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 22: 286-293, 1980.
33. Moscardi, M. and Franco, M. F. *Paracoccidiodomycose experimental do camundongo*. II Infecção intraperitoneal após sensibilização prévia. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 23: 204, 1981.
34. Moscardi-Bacchi, M. and Franco, M. Experimental *Paracoccidiodomycosis* in the mouse. III Histopathological and immunological findings after intravenous infection in the presence or absence of previous immunization. *Rev. Soc. Br. Med. Trop.*, 18: 101-108, 1985.
35. Restrepo, A. Immune response to *Paracoccidiodomycose brasiliensis* in human and animal hosts. In: *Current topics in medical mycology*. McGinnis, M.R. Ed. Springer-Verlag, New York, 1988.
36. Restrepo, A. *Paracoccidiodomycose brasiliensis*. In: *Principles and practice of infectious disease*. ED. GL Mandell, p. 2028-2031, 1990.
37. Restrepo-Moreno, A. Ecology of *Paracoccidiodomycose brasiliensis*. In: Franco, M. F.; Lacaz, C. S.; Restrepo, A.; Del Negro, G. (Ed.) *Paracoccidiodomycosis* Boca Ratón, Florida, CRC Press, p. 121-130, 1994.
38. Restrepo, S., Tobon, A., Trujillo, J. and Restrepo, A. Development of pulmonary fibrosis in mice during infection with *Paracoccidiodomycose brasiliensis* conidia. *J. Med. Vet. Mycol.*, 30: 173, 1992.
39. San-Blas, G., Restrepo, A., Clemons, K., Stevens, D.A., San Blas, F., Puccia, R., Travassos, L. R., Figueroa, J. I., Hamilton, A. J. *Paracoccidiodomycosis*. *J. Med. Vet. Mycol.*, 30: 59-71, 1992.
40. Silva, C.L., Fazioli, R.A. A *Paracoccidiodomycose brasiliensis* polysaccharide having granuloma-inducing, toxic and macrophage-stimulating activity. *J. Gen. Microbiol.*, 131: 1497-1501, 1985.
41. Silva, C.L. Granulomatous reaction induced by lipids isolated from *Paracoccidiodomycose brasiliensis*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 79: 70-73, 1985.
42. Singer-Vermes, L. M., Caldeira, C. B., Burger, E., Calich, V. L. G. Experimental murine *paracoccidiodomycosis*: relationship among the dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. *Clin. Exp. Immunol.*, 94: 75-79, 1993.
43. Singer-Vermes, L. M., Burger, E., Franco, M. F., Moscardi-Bacchi, M., Mendes-Guianni, M. J. S., Calich, V. L. G. Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidiodomycose brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. *J. Med. Vet. Mycol.*, 27: 71-82, 1989.
44. Soares, A.M.V.C.; Iwasso, M.T.; Oliveira, S.L.; Sugizaki, M.F.; Montenegro, M.R.; Musatti, C.C. Susceptibilidade a infecção pelo *Paracoccidiodomycose brasiliensis* em camundongos bons e maus produtores de anticorpos a eritrócitos humanos e de carneiro (seleção IV-A). *Rev. Arg. Micol.*, 15: 41, 1992.