

Avaliação de anticorpos fixadores de complemento para *Paracoccidioides brasiliensis* em soros de cães naturalmente e experimentalmente infectados

Evaluation of complement fixing antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in sera of dogs naturally and experimentally infected

*Tatiane Ferreira Petroni, Paola Fernanda Fedatto,
Andréia Aparecida Cofani Bianchini, Mario Augusto Ono*
Depto. de Ciências Patológicas, CCB, Universidade Estadual de Londrina

Resumo

O fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* causa uma das mais prevalentes micoses sistêmicas na América Latina. A paracoccidioidomicose (PCM), uma doença granulomatosa humana, pode atingir também animais domésticos e ainda não é bem estudada em cães. A infecção de cães por *P. brasiliensis* ocorre com frequência porém até o momento há apenas um relato da doença natural em cão sugerindo que esta espécie é resistente. Os mecanismos imunológicos envolvidos na proteção não estão definidos. Considerando que o sistema complemento é um importante mecanismo efetor da imunidade humoral, este estudo teve como objetivo avaliar a presença de anticorpos fixadores de complemento para o fungo *P. brasiliensis* em soros de cães naturalmente e experimentalmente infectados. Amostras de soros de cães negativos e positivos para gp43 de *P. brasiliensis* foram avaliados na reação de fixação de complemento utilizando exoantígeno do fungo. Na condições utilizadas no estudo a reação de fixação de complemento não mostrou-se adequada para detecção de anticorpos anti-*P. brasiliensis*, possivelmente devido à baixa concentração de anticorpos nas amostras de soro ou à competição entre sub-classes de IgG não fixadoras de complemento com IgM anti-*P. brasiliensis*.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, cão, complemento.

Abstract

Paracoccidioides brasiliensis is a thermodimorphic fungus that causes one of the most prevalent systemic mycosis in Latin America. Paracoccidioidomycosis (PCM), a human granulomatous disease, can also occur in domestic animals as the dog. The infection of dogs by *P. brasiliensis* is a frequent event although until now only one case of natural disease has been described, suggesting that the dog is resistant to the disease development. The immunological mechanisms involved in resistance are not well understood. Taking into account that complement system is an important mechanism of the humoral immune response, the aim of this study was to evaluate the presence of complement fixing antibodies to the fungus *P. brasiliensis* in sera of dogs naturally and experimentally infected. Serum samples positive and negative to *P. brasiliensis* gp43 were evaluated by complement fixing test. The complement fixing test, in the condition of this study, was not able to detect antibodies to *P. brasiliensis*, probably due to the low titers of antibodies in the serum samples or to competition between not fixing IgG sub-classes and IgM anti-*P. brasiliensis*.

Key words: *Paracoccidioides brasiliensis*, dog, complement.

INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose é a micose sistêmica mais importante da América Latina, sendo a maior casuística registrada no Brasil, Argentina, Colômbia e Venezuela. Há relatos da doença em todos os países da América Latina, com exceção do Chile e Nicarágua⁽¹⁾. No Brasil, a maioria dos casos tem sido reportada nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste^(2, 3).

O agente etiológico da paracoccidioidomicose é o fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* que se apresenta na forma de micélio à temperatura ambiente, enquanto que quando cultivado a 37°C e nos tecidos do hospedeiro encontra-se na forma de levedura.

A infecção provavelmente ocorre pela inalação de propágulos do fungo que nos pulmões, se transformam em leveduras podendo ocorrer posterior disseminação para outros

tecidos do organismo, por via hematogênica e/ou linfática. A infecção primária é assintomática na maioria dos casos. O fungo pode permanecer anos no hospedeiro e manifestar-se mais tarde provavelmente em decorrência de algum tipo de imunodeficiência^(4, 5, 6).

A paracoccidioidomicose pode ser classificada em PCM-infecção, que afeta indivíduos de ambos os sexos, aparentemente saudáveis, que residem ou residiram em áreas endêmicas e que tem reação intradérmica positiva para antígeno de *P. brasiliensis*, mas não desenvolvem a doença (nesses indivíduos não se observa depressão da imunidade celular); e em PCM-doença, que afeta preferencialmente trabalhadores rurais, do sexo masculino e com média de 45 anos de idade; tais indivíduos apresentam na sua maioria, reação intradérmica negativa e fragilização do sistema monocítico-fagocitário.

Embora avanços tenham sido alcançados em relação ao diagnóstico e patologia da PCM, pouco se conhece sobre a sua eco-epidemiologia.

O papel de animais na ecologia do *P. brasiliensis* é pouco conhecida. O fungo tem sido isolado de morcegos⁽⁷⁾, fezes de pingüim⁽⁸⁾, tatus^(9, 10, 11, 12). Em macacos, Johnson⁽¹³⁾ observou a presença do fungo em órgãos de um macaco doente por análise histopatológica. Em cavalos, Conti-Diaz⁽¹⁴⁾ obteve reação intradérmica positiva. Exceto no caso dos tatus, isolados animais de outras espécies não foram reprodutíveis. Costa *et al.*⁽¹⁵⁾ realizaram um estudo epidemiológico em bovinos, ovinos e eqüinos e observaram uma positividade de 44,8%, 42,8% e 77% respectivamente na intradermorreação à paracoccidioidina.

O cão devido ao hábito de escavar e farejar o solo, provável habitat do fungo^(16,17), poderia ser um bom indicador da presença do *P. brasiliensis* no meio ambiente. Mós e Fava

Netto⁽¹⁸⁾ utilizando a reação de Fixação do Complemento, observaram altos índices de infecção por *P. brasiliensis* em cães de São Paulo. Recentemente Ono *et al.*⁽¹⁹⁾ demonstraram que cães de área rural da Região Norte do Paraná apresentaram 89% de positividade em ensaio de ELISA, utilizando gp43 como antígeno.

Há poucos estudos sobre PCM experimental em cães. Pereira & Viana⁽²⁰⁾ inocularam um cão com pus de um paciente com PCM, e o animal morreu 21 dias após a inoculação com sinais clínicos de PCM. Mós *et al.*⁽²¹⁾, entretanto, falharam em induzir PCM em cães por inoculação intratesticular. Ono *et al.*⁽²²⁾ observaram a morte de 2 de 4 cães, de 3 meses de idade, uma semana pós infecção experimental com *P. brasiliensis* por via endovenosa. Eisele *et al.*⁽²³⁾ porém, não observou a morte de cães adultos inoculados por via endovenosa. A divergência nos resultados provavelmente resultam de diferenças de virulência em isolados de *P. brasiliensis*, da variabilidade genética entre animais e da influência da idade do cão na suscetibilidade ao desenvolvimento de PCM-doença.

Ricci *et al.*⁽²⁴⁾ relataram o primeiro caso de PCM-doença em cão. Uma fêmea da raça Doberman apresentou aumento dos linfonodos cervicais, porém a confirmação da doença foi feita após dois anos através da análise histopatológica, imunoquímica e PCR utilizando anticorpo monoclonal específico anti-*P. brasiliensis*, embora não tenha ocorrido isolamento do fungo.

Aparentemente, os cães adultos são resistentes ao desenvolvimento de PCM-doença, porém os mecanismos de resistência não estão elucidados.

O sistema complemento, importante componente da imunidade humoral, é um sistema biológico altamente sofisticado, que participa tanto da imunidade inata quanto da adaptativa^(25, 26). Em geral, pacientes com paracoccidiodomicose apresentam uma

hiperestimulação da resposta imune humoral e uma queda da resposta imune celular ^(27, 28, 29,30). Um estudo utilizando soros de pacientes com paracoccidiodomicose, mostrou níveis aumentados de C3, enquanto que complemento hemolítico total e C7 estavam normais⁽³¹⁾.

Calich *et al.*⁽³²⁾ demonstraram que anticorpos anti- *P. brasiliensis* têm atividade de opsonina quando testados com a fase leveduriforme do fungo, e que durante a opsonização, ocorre a cooperação entre anticorpos e o sistema complemento. Calich e Teixeira⁽³³⁾ também demonstraram a atividade fungicida do complemento quando ativado por anticorpos específicos.

Considerando que o sistema complemento é um importante mecanismo efetor contra agentes infecciosos, neste estudo propusemos avaliar a presença de anticorpos fixadores de complemento em soros de cães infectados com *P. brasiliensis*.

METODOLOGIA

Exoantígeno

O fungo *P. brasiliensis* (B-339) foi cultivado em tubos de ágar Sabouraud e incubado à 35°C por 3-4 dias e transferido para Erlenmeyer de 250ml com 50ml de meio de cultura contendo neo-peptona e incubado em agitação (50 rpm) à 35°C. Depois de três dias, esse pré-inóculo foi transferido para frasco contendo 500ml do mesmo meio e incubado por 7 dias à 35°C sob agitação constante. A cultura foi inativada por adição de Thimerosal, incubada por uma noite à 4°C e filtrada em papel de filtro. O filtrado foi concentrado à vácuo, dialisado por 48 horas em água destilada e liofilizado⁽³⁴⁾.

Antígeno gp43

O antígeno gp43 foi obtido a partir do exoantígeno, usando uma coluna cromatográfica de afinidade Affi-gel (Bio Rad, Hércules, CA, USA) ligado com anticorpo monoclonal anti-gp43. O antígeno foi eluído com 0,1M de ácido cítrico, pH 2,8 seguido de neutralização com Tris 1M pH 9,0⁽³⁵⁾. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford⁽³⁶⁾.

Animais

Foram utilizados cães sem raça definida, provenientes de diferentes locais (Hospital Veterinário e Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina e Santo Antônio da Platina/PR) dos quais foram obtidos amostras de sangue para extração dos soros utilizados para os experimentos propostos. Os soros foram previamente testados quanto à presença de anticorpos anti-gp43. Como controles negativos foram utilizados cães negativos para gp43.

Amostras de soros de cães

Foram utilizadas 12 amostras positivas (cães infectados naturalmente e experimentalmente com *P. brasiliensis*) e 5 negativas para gp43 no ensaio de ELISA.

Sensibilização de hemácias de carneiro com hemolisina

As hemácias de carneiro, coletadas e estocadas em solução Alsever, foram ressuspensas em solução salina 0,85% e centrifugadas por três vezes. Após essa lavagem, foi feita a sensibilização da hemácia 2,8% com hemolisina de coelho 1:1000 diluídos em tampão borato (CaCl_2 -1M / MgCl_2 - 2M) com pH entre 7,0 e 7,4 e incubadas por 30 minutos a uma temperatura de 37°C.

Ensaio Imunológico

ELISA – Detecção de IgM e IgG anti-gp43

Microplacas de poliestireno (Corning Costar Corporation, Corning, NY, USA) de 96 cavidades foram sensibilizadas com antígeno gp43 (250ng/orifício) em tampão carbonato bicarbonato 0,1 M (pH 9,6) por 18h a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com PBS contendo 0,05% de *Tween-20* e as cavidades foram bloqueadas com PBS-leite em pó desnatado 5% (PBS-L), por 1h à temperatura ambiente. Após lavar as placas três vezes com PBS-tween, as amostras de soro foram diluídas 1:100 em PBS-L 1%, adicionadas à placa em duplicata e incubadas à temperatura ambiente por 1 h. A seguir as placas foram lavadas como descrito acima e 100ml de conjugado (anti-IgM e anti-IgG de cão conjugado com peroxidase; Sigma, Saint Louis, MO, USA) diluídos 1:5000 e 1:2000 respectivamente em PBS-L 1% foram adicionados a cada cavidade. As placas foram em seguida incubadas a temperatura ambiente por 1h. Após lavadas as placas três vezes com PBS-T, 100ml de substrato (100ml de tetra-metil-benzidina em 10 ml de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0, + 100ml de H₂O₂ 30%) foram adicionadas a cada cavidade. Após o desenvolvimento de uma coloração azulada (15 min), a reação foi bloqueada com 50ml de H₂SO₄ 1N. A absorbância em 450 nm foi medida em leitor de ELISA Multiskan II (Flow Laboratories Inc., McLean, VA, USA). O soro de um cão previamente imunizado com *P.brasiliensis* foi usado como controle positivo. Como controle negativo foi usado soro obtido a partir de um pool de soros de cães urbanos. Soros com absorbância duas ou mais vezes maior do que a do controle negativo foram considerados positivos

ELISA – Detecção de IgM anti exoantígeno

O ELISA realizado para detecção de anticorpos IgM anti-exoantígeno foi realizado como descrito no ELISA com gp43, exceto que a concentração do exoantígeno foi de 16µg/ml. Foi feito o bloqueio da placa de ELISA com PBS-Leite 5%, seguido de bloqueio com metaperiodato de sódio 10mM, uma lavagem com acetato de sódio 0,05 M com posterior bloqueio com glicina 1% (ácido amino acético) em tampão Tris-HCl 0,1M/ Leite em pó 0,2%; todos os bloqueios com tempo de incubação de 1 hora. Para a determinação da melhor concentração de metaperiodato de sódio, foi feita uma padronização prévia com concentrações de 5, 10 e 20 mM.

Titulação do complemento de cobaia

Para titulação do complemento de cobaia, foram utilizadas hemácias de carneiro 2,8% sensibilizadas com hemolisina 1:1000 à 37°C por 30 minutos. Foi utilizada diluição do soro de cobaia 1:500, nos volumes 200, 250, 300 e 400 ml; estes volumes foram completados para 800 ml com tampão borato Ca⁺²/Mg⁺² pH 7,6. Em seguida foram adicionados 200ml da suspensão de hemácias sensibilizadas com hemolisina. Como controles de 100% e 0% de lise, aos dois tubos com 200ml da suspensão de hemácias sensibilizadas com hemolisina, foram adicionados 800ml de água destilada e 800 ml de tampão, respectivamente. Após incubação por 30 minutos à 37°C as amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes foram analisados à 541 nm.

As porcentagens de lise foram calculadas em relação ao controle 100%. Os dados foram plotados em um gráfico Absorbância *versus* Volume do complemento/ml e o volume que contém 1 CH50 foi determinado.

Para a determinação da diluição correspondente a 5 CH50, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Diluição do complemento usado na titulação} / \\ \text{Volume contendo } 5\text{CH}_{50} = x / 0,4 \text{ ml}$$

onde x é a diluição do complemento necessária para 5CH₅₀. Assim, foi obtido a diluição de 1:10 para o complemento de cobaia.

Padronização da concentração do Exoantígeno e da diluição do soro de cão

Para a padronização da microtécnica de fixação do complemento, foram testadas as concentrações de 64, 32 e 16 mg/ml do exoantígeno de Pb (B-339); bem como as diluições de 1:8, 1:16 e 1:32 dos soros dos cães. Foram feitos controles de todos os componentes: controle de cada um dos soros sem exoantígeno e sem complemento; controle exoantígeno, controle complemento, controle 100% e 0% de lise (água destilada e tampão respectivamente). A todos foi adicionado 25 ml da suspensão de hemácias sensibilizadas, exceto no controle complemento. A partir dos resultados obtidos neste experimento, ficou estabelecido a concentração do exoantígeno de 1,6 mg/poço.

Reação de fixação de complemento

As amostras de soros dos cães foram incubadas à 65°C para a inativação do complemento. O soro de cão inativado (25ml) diluição 1:16 e 50ml de 5CH₅₀ de complemento de cobaia foram incubados com 25ml de exoantígeno de *P.brasiliensis* B-339 durante 18 horas a 4°C em microplaca de poliestireno de 96 orifícios (Nunc). Após esse tempo, foi adicionado 25ml da suspensão de hemácias de carneiro 2,8% sensibilizadas e nova incubação de 30 minutos a 37°C foi realizada. Aguardada a sedimentação das hemácias não lisadas à 4°C durante 2 horas, o sobrenadante foi coletado e transferido

para outra microplaca para posterior análise em espectrofotômetro a 550 nm.

No controle 100% de lise foi utilizado 25µl da suspensão de hemácias sensibilizadas com hemolisina e 100µl de água destilada e para o controle 0% de lise foi utilizada a mesma quantidade da suspensão de hemácia e 100µl de tampão borato $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$. Foi necessário a realização de um controle do soro e um controle do antígeno, em que foram adicionados somente soro e antígeno respectivamente e o volume completado com tampão borato em uso. Foi feito também um controle do complemento, em que 50µl do complemento foram incubados com 75µl de tampão, sem que fosse adicionado a suspensão de hemácias.

Através dos valores de absorbância, foi obtido a porcentagem de lise em relação ao controle 100% (H_2O) de cada amostra e analisado em relação ao controle soro, se houve redução na lise.

Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram porcentagem de lise em relação ao controle soro de cada cão menor ou igual a 50%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1. Reatividade de soros de cães a antígenos de *P. brasiliensis* avaliada por ensaio de ELISA (IgG e IgM) e Reação de fixação de complemento

N ^o amostra (soro)	ELISA		ELISA	R.F.C
	gp43	gp43	Exoantígeno	Exoantígeno
	IgG	IgM	IgM	
1	+	+	+	-
2	+	+	+	+
3	+	+	+	-
4	+	+	+	-
5	+	+	+	+
6	-	-	-	-
7	+	+	+	-
8 *	-	-	-	-
9	+	+	+	-
10	+	+	+	-
11	-	+	+	-
12	-	-	-	-
13	-	+	+	+
14	+	+	+	-
15	+	+	+	-
16	+	+	+	-
17	+	+	+	-
18 **	+	+	+	-
19	-	+	-	+

* Controle Negativo ELISA

** Controle Positivo ELISA

Considerando que o sistema complemento pode ser um mecanismo protetor na paracoccidiodomicose canina neste estudo avaliamos a presença de anticorpos fixadores de complemento em cães infectados com *P. brasiliensis*.

O anticorpo da classe IgM é a principal classe ativadora da via clássica do complemento. Assim, as amostras de soro

foram avaliadas por ELISA quanto à presença de IgM para antígenos de *P. brasiliensis*.

Segundo Puccia e Travassos⁽³⁷⁾, em ensaio de ELISA, o tratamento da gp43 com metaperiodato de sódio, que por meio da oxidação da porção carboidrato do antígeno, diminui a possibilidade de reações cruzadas com soros de pacientes com histoplasmose e doença de Jorge Lobo. Taborda e Camargo⁽³⁸⁾ verificaram que nenhuma reação cruzada ocorreu com pacientes com histoplasmose, criptococose, candidíase, aspergilose e doença de Jorge Lobo após tratamento do antígeno gp43 com metaperiodato de sódio 10mM em dot-blot ELISA, demonstrando 100% de especificidade e sensibilidade no imunodiagnóstico da PCM humana.

Assim, neste estudo, para a detecção de anticorpos para exoantígeno de *P. brasiliensis* por ELISA o antígeno foi previamente tratado com metaperiodato de sódio para aumentar a especificidade do ensaio.

Todas as amostras positivas para IgG também apresentaram positividade para IgM; porém a maioria das amostras positivas para IgM apresentou reação negativa na reação de fixação de complemento (Tabela 1). Essa discordância entre os resultados do ELISA e da fixação de complemento poderia ser explicada pela diferença de sensibilidade dos ensaios, pois o ELISA é um método muito sensível. Outra possibilidade é que pode ter ocorrido competição de sub-classes de IgG não fixadoras de complemento com as IgM anti-*P. brasiliensis* presentes na amostra.

Estudo realizado por Nogueira e colaboradores⁽³⁹⁾ para detecção de anticorpos por meio da lise mediada pelo complemento em pacientes com paracoccidiodomicose, também não demonstraram nenhuma correlação significativa entre níveis de anticorpos líticos e títulos de precipitina ou IgG total anti-*P. brasiliensis* e títulos de anticorpos IgM.

É necessário analisar um número maior de amostras e melhorar o desempenho da reação de fixação de complemento para esclarecer a possível participação do complemento na paracoccidioidomicose canina.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, CAPES e UEL pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wanke B, Londero A. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. eds. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton, Florida, CRC Press, p. 109-120, 1994.
2. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: An update. Clin. Microbiol., 6: 89-117, 1993.
3. Blotta MH, Camargo ZP. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. J. Clin. Microbiol., 31: 671-676, 1993.
4. Restrepo A, De Bedout C, Cano LE, Arango MD, Bedoya V. Recovery of *Paracoccidioides brasiliensis* from a partially calcified lymph node lesion by microaerophilic incubation of liquid media. Sabouraudia, 19: 295-300, 1981.
5. Franco M, Peracoli MT, Soares A, Montenegro R, Mendes RP, Meira DA. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. Curr. Trop. Med. Mycol., 5: 115-49, 1993.
6. Manns BJ, Baylis BW, Urbanski SJ, Gibb AP, Rabin HR. Paracoccidioidomycosis: case report and review. Clin Infect Dis., 23: 1026-32, 1996.
7. Grose E, Tamsitt JR. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia. Sabouraudia, 4: 124-125, 1965.

8. Gezuele E. Aislamiento de *Paracoccidioides* sp de heces de pinguino de la Antártida. IV Encuentro International sobre Paracoccidioidomycosis. Caracas. Venezuela. April 10-14, 1989. Caracas, Venezuela, Instituto Venezolano de Investigaciones Cientificas (IVIC): 1989, Abstract B-2.
9. Naiff RD, Ferreira LCP, Barthe TV. et al. Paracoccidioidomycose enzoótica em tatus (*Dasytus novemcinctus*) no estado do Pará. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 28: 19-27, 1986.
10. Bagagli E, Sano A, Coelho KI. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasytus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 58: 505-512, 1998.
11. Corredor GG, Castaño JH, Peralta LA. et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasytus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. Rev. Iberoam. Micol., 16: 216-220, 1999.
12. Silva-Vergara ML, Martínez R, Camargo ZP. et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasytus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. Med. Mycol., 38: 193-199, 2000.
13. Johnson WD, Lang CM. Paracoccidioidomycosis (South American Blastomycosis) in a squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). Vet. Pathol., 14: 368-371, 1977.
14. Conti-Díaz IA, Alvarez BJ, Gezuele E, Marini HG, Duarte J, Falcón J. Encuesta mediante intradermoreacciones con paracoccidioidina y histoplasmina en caballo. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 14: 372-376, 1972.
15. Costa EO, Fava Netto C. Contribution to the epidemiology of paracoccidioidomycosis and histoplasmosis in the State of São Paulo, Brazil. Paracoccidioidin and histoplasmin intradermic tests in domestic animals. Sabouraudia, 16: 93-101, 1978.
16. Negroni P. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente en suelo argentino. Prensa Med. Argent., 53: 2831-2832, 1966.
17. Albornoz MB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. Sabouraudia, 9: 248-253, 1971.

18. Mós EN, Fava Netto C. Contribuição ao estudo da paracoccidiodomicose 1. Possível papel epidemiológico dos cães. Estudo sorotógico e anatomo-patológico. Rev Inst Med Trop São Paulo, 16: 154-159, 1974.
19. Ono MA, Bracarense APFRL, Morais H. Canine paracoccidiodomycosis: A seroepidemiologic study. Med Mycol., 39: 277-282, 2001.
20. Pereira M, Viana G. A propósito de um caso de blastomicose (*Pyohemia blastomycotica*). Arq. Bras. Med., 1: 63-83, 1911.
21. Mós EN, Fava Netto C, Saliba AM, Brito T. Contribuição ao estudo da paracoccidiodomicose. II. Infecção experimental do cão. Rev Inst Med Trop São Paulo, 16: 232-237, 1974.
22. Ono MA, Kishima MO, Itano EN. et al. Experimental paracoccidiodomycosis in dogs. Med. Mycol., 41: 265-268, 2003.
23. Eisele RC, Juliani LC, Belitardo DR, Itano EN, Estevão D, Bracarense, APFRL, Camargo ZP, Ono MA. Immune response in dogs experimentally infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. Med. Mycol., 42: 549-553, 2004.
24. Ricci G, Mota FT, Wakamatsu A, Serafim RC, Borra RC, Franco MF. Canine paracoccidiodomycosis. Med. Mycol., 42: 379-83, 2004.
25. Walport MJ. Complement. First of two parts. N. Engl. J. Med., 344: 1058-1066, 2001a.
26. Walport MJ. Complement. Second of two parts. N. Engl. J. Med., 344: 1140-1144, 2001b.
27. Correa LA, Giraldo MR. Cuantificación y identificación de las inmunoglobulinas en la paracoccidiodomycosis. Antioquia Médica, 24: 13-25, 1974.
28. Restrepo A. Inmunidad humoral. In: Del Negro G, Lacaz CS, Fiorillo AM. (Editors), Paracoccidiodomycose. Blastomicose Sul-americana. *Sarvier*; São Paulo, pp. 127-133, 1982.
29. Biagioni L, Souza MJ, Cama LG, Mendes RP, Marques SA, Mota NGS, Franco M. Serology of paracoccidiodomycosis. II. Correlation between class-specific antibodies and clinical forms of the disease. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 78: 617-621, 1984.

30. Mota NGS, Rezkallah-Iwasso T, Peraçoli MTS, Audi RC, Mendes RP, Marcondes J, Marques SA, Dillon NL, Franco MF. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 79: 765-772, 1985.
31. Ribeiro MAG, Fava Netto C. Complemento hemolítico total e os componentes C3 e C7 em pacientes com paracoccidioidomicose. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 23: 106-110, 1981.
32. Calich VLG, Kipnis TL, Fava Netto C, Silva WD. The activation of the complement system by *P. brasiliensis* in vitro: its opsonic effect and possible significance for an "in vivo" model of infection. *Clin. Immunol. and Immunopathol.*, 12: 20-30, 1979.
33. Calich VLG, Teixeira RCV. Antibody and complement-dependent cytotoxicity against *Paracoccidioides brasiliensis*. II Encontro sobre Paracoccidioidomicose. Botucatu, São Paulo. *Anais*, p.8, 1983.
34. De Camargo Z, Unterkircher C. et al. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. *J. Clin. Microbiol.*, 26(10): 2147-51, 1988.
35. Saraiva EC, Altemani A, Franco MF, Unterkircher CS, Camargo ZP. *Paracoccidioides brasiliensis*-gp43 used as paracoccidioidin. *J. Med. Vet. Mycol.*, 34: 155-61, 1996.
36. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-54, 1976.
37. Puccia R, Travasso LR. 43 kDa glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. *J. Clin. Microbiol.*, 29: 1610-1615, 1991.
38. Tabora CP, Camargo ZP. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by dot immunobinding assay for antibody detection using the purified and specific antigen gp43. *J. Clin. Microbiol.*, 32: 554-6, 1994.
39. Nogueira MES, Mendes RP, Marques SA, Franco M. Complement-mediated-lysis detection of antibodies in paracoccidioidomycosis: a preliminary study. *Brazilian J Med Biol Res.*, 19: 241-247, 1986.