

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas

Mariana Guimarães Coelho

HISTOPATOLOGIA DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE:

GRANULOMA SARCOIDE E FORMAS PEQUENAS DO PARACOCCIDIOIDES

Porto Alegre, 2015

Mariana Guimarães Coelho

**HISTOPATOLOGIA DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE:
GRANULOMA SARCOIDE E FORMAS PEQUENAS DO PARACOCCIDIOIDES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de mestre.

Orientador: Profº Dr. Luiz Carlos Severo

Co-orientador: Dra. Cecília Bittencourt Severo

Porto Alegre, 2015

CIP - Catalogação na Publicação

Coelho, Mariana Guimarães

Histopatologia da paracoccidioidomicose:
granuloma sarcoide e formas pequenas do
Paracoccidioides / Mariana Guimarães Coelho. -- 2015.
65 f.

Orientador: Luiz Carlos Severo.

Coorientador: Cecília Bittencourt Severo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2015.

1. Paracoccidioidomicose. 2. Paracoccidioides. 3.
granuloma sarcoide. 4. Sarcoidose. 5. formas
pequenas. I. Severo, Luiz Carlos, orient. II.
Severo, Cecília Bittencourt, coorient. III. Título.

Nunca ande pelo caminho traçado, pois ele conduz somente até onde os outros já foram.

Alexander Graham Bell

AGRADECIMENTOS

*Aos professores Luiz Carlos Severo e Cecília Bittencourt Severo,
pela oportunidade e orientação.*

*Aos demais professores e colegas do Programa de Pós-Graduação
em Ciências Pneumológicas da UFRGS, pelos ensinamentos e
experiências compartilhadas.*

*À Anajara Terra, pelo acompanhamento e escuta atenta em todas
as etapas desta jornada.*

A minha família e amigos, pelo incentivo, apoio e carinho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PCM – paracoccidiodomicose

µm – micrômetros

nº – número

GMS – Gomori-Grocott methenamine silver stain

ZN – coloração de Ziehl-Neelsen

KOH – hidróxido de potássio

°C – graus Celsius

BHI – ágar infusão cérebro-coração

M – Male

ID – immunodifusion

TMP/SMX – Trimethoprim/sulfamethoxazole

ND – Not done

F – Female

SAH – Systemic arterial hypertension

COPD – chronic obstructive pulmonary disease

H&E – hematoxylin and eosin

NA – not available

Ref – references

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

- Figura 1 (Caso 1).** **A**, Raio-X de tórax mostrando linfadenopatia e opacidades reticulonodulares em ambos os pulmões. **B**, Raio-X após tratamento imunossupressivo, mostrando um aumento nas opacidades micronodulares. **C**, Visão em menor aumento do *Paracoccidioides* no pulmão, mostrando granulomas não necrosantes confluentes substituindo o parênquima pulmonar. (H&E, x200). **D**, Fotomicrografia em maior aumento mostrando leveduras grandes e multibrotantes do *Paracoccidioides* sp (setas) sob visão em contraste de fase (H&E, x400)..... 15
- Figura 2 (Caso 2).** **A**, Radiografia revela infiltrado fibronodular em ambos os pulmões. **B**, Esta imagem mostra uma progressão significativa das lesões pulmonares após dois meses de corticoterapia. **C**, Corte histológico de pulmão mostrando múltiplos granulomas epitelioides sem necrose (H&E, x200). **D**, Cortes sucessivos mostrando uma célula fúngica com três brotamentos. Estes são ligados à célula-mãe por um istmo estreito (GMS, x200)..... 16
- Figura 3 (Caso 4).** **A**, Raio-X de tórax revelando infiltrado fibronodular bilateral. **B**, Sete anos após o início da corticoterapia, foi observada uma marcada progressão das lesões pulmonares, com consolidação. O exame do escarro foi positivo para bacilos álcool-ácido resistentes e *Paracoccidioides*..... 17
- ARTIGO 2**
- Figura 1.** Raio-X de tórax mostrando infiltrados bilaterais, principalmente nos campos centrais e superiores..... 30
- Figura 2.** **A**. Corte histológico de pulmão corado pela prata, revelando formas pequenas do *Paracoccidioides* (GMS, 400x). **B**. Ágar Sabouraud com colônias miceliais de *Paracoccidioides*, isoladas de biópsia pulmonar. 30
- Figura 3.** Em destaque, as formas multibrotantes características do *Paracoccidioides* (Calcoflúor branco, 400x), de espécime tecidual de testículo de cobaio..... 31

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1.	Características clínicas e achados laboratoriais dos 8 casos que inicialmente mimetizaram sarcoidose.....	14
------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

ARTIGO 2

Tabela 1.	Características clínicas e achados laboratoriais dos 12 casos de Paracoccidioidomicose que apresentaram formas pequenas do <i>Paracoccidioides</i>	27
------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

RESUMO

COELHO, Mariana Guimarães. **Histopatologia da paracoccidioidomicose: granuloma sarcoide e formas pequenas do *Paracoccidioides***. 2015. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma infecção sistêmica causada pelo fungo *Paracoccidioides* sp. A doença é endêmica na maior parte dos países da América Latina, sendo os pulmões os órgãos mais afetados. O diagnóstico de PCM é feito com base na história clínica e epidemiológica, e confirmado pela visualização microscópica das estruturas fúngicas do *Paracoccidioides* a partir de secreções ou tecidos. Por vezes, a apresentação clínica e os achados histopatológicos da PCM simulam os de outras doenças, como a sarcoidose, e ocasionalmente são encontradas nas lesões formas excepcionalmente pequenas do *Paracoccidioides*, que podem ser confundidas com outros fungos, como o *Histoplasma capsulatum*.

O presente trabalho objetivou identificar e caracterizar os casos que simularam sarcoidose e os que apresentaram formas pequenas de *Paracoccidioides* dentre os 856 casos de paracoccidioidomicose diagnosticados no Laboratório de Micologia do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, no período de 1981 a dezembro de 2013.

Foram identificados 8 casos mimetizando a sarcoidose e 12 apresentando formas pequenas de *Paracoccidioides*. Dos casos que simularam a sarcoidose, todos eram fumantes do sexo masculino, com idades variando entre 27 e 59 anos (média = 42,5 anos) e apresentaram tosse produtiva, infiltrado fibronodular bilateral aos exames de imagem e granulomas sarcoides na biópsia pulmonar, recebendo prednisona como tratamento inicial. O diagnóstico de PCM, nestes casos, foi realizado por meio de cortes histológicos corados ao GMS (n=8), exame direto do escarro (n=2) e imunodifusão (n=4). Dentre os casos que apresentaram formas pequenas do *Paracoccidioides*, todos eram fumantes, tinham idades variando entre 33 e 68 anos (média = 55,58 anos), 10 eram do sexo masculino, e 10 apresentavam sintomas consistentes com os da PCM (dois pacientes eram assintomáticos). O diagnóstico etiológico, em todos os casos, foi realizado por meio de cortes histológicos seriados corados ao GMS (que

revelaram as formas multibrotantes patognômicas do *Paracoccidioides*) e corroborado por exame direto do escarro (n=3), imunodifusão (n=6) e cultura (n=1).

Com isto, ressalta-se a importância da consideração dos diagnósticos diferenciais da paracoccidioidomicose. Visto que a sarcoidose é um diagnóstico de exclusão, o achado de granulomas epitelioides sem necrose deve incitar a busca ativa por agentes etiológicos com a utilização das colorações de ZN e GMS. E nos casos em que se encontram formas pequenas ou pouco usuais do *Paracoccidioides*, devem-se realizar cortes histológicos seriados e escalonados corados ao GMS e utilizar técnicas laboratoriais complementares, como imunodifusão e cultura, para assegurar o seu diagnóstico.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose; *Paracoccidioides*; granuloma sarcoide; Sarcoidose; formas pequenas.

ABSTRACT

COELHO, Mariana Guimarães. **Histopathology of paracoccidioidomycosis: sarcoid granuloma and small forms of *Paracoccidioides***. 2015. Dissertation (Master's) – Postgraduate Program in Respiratory Sciences. Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic infection caused by the fungus *Paracoccidioides* sp. The disease is endemic in most Latin American countries, and the lungs are the most affected organs. The diagnosis of PCM is based on clinical and epidemiological features, and confirmed by the microscopic visualization of yeasts of *Paracoccidioides* from clinical specimens. Sometimes the clinical presentation and histopathological findings of PCM mimic those of other diseases, such as sarcoidosis, and occasionally exceedingly small forms of *Paracoccidioides* are found in lesions, which can be confused with other fungi, such as *Histoplasma capsulatum*.

This study aimed to identify and characterize the cases that simulated sarcoidosis and those with small forms of *Paracoccidioides* among the 856 cases of paracoccidioidomycosis diagnosed in the Mycology Laboratory of the Hospital Complex Santa Casa de Porto Alegre, from 1981 to December 2013.

8 cases were identified mimicking sarcoidosis and 12 with small forms of *Paracoccidioides*. All the cases that mimicked sarcoidosis were male smokers, aged between 27 and 59 years (mean = 42.5 years) and had productive cough, bilateral fibronodular infiltrates on X-ray and sarcoid granulomas in the lung biopsy, receiving prednisone as initial treatment. The diagnosis of PCM in these cases was carried out by histological sections stained with GMS (n = 8), direct examination of sputum (n = 2) and immunodiffusion (n = 4). Among the cases with small forms of *Paracoccidioides*, all were smokers, aged between 33 and 68 years (mean = 55.58 years), 10 were male, and 10 had symptoms consistent with PCM (two patients were asymptomatic). The etiologic diagnosis in all the 12 cases was made by serial tissue sections stained with GMS (which revealed the multibudding pathognomonic forms of *Paracoccidioides*) and confirmed by direct examination of sputum (n = 3), immunodiffusion (n = 6) and culture (n = 1).

In conclusion, it is emphasized the importance of considering the differential diagnosis of paracoccidioidomycosis. Since sarcoidosis is a diagnosis of exclusion, the finding of epithelioid granulomas without necrosis should encourage the active search for etiologic agents with the use of ZN and GMS stains. And in cases in which small or unusual forms of *Paracoccidioides* are found, serial histological sections stained with GMS and complementary laboratory techniques such as immunodiffusion and culture should be performed to ensure their diagnosis.

Keywords: Paracoccidioidomycosis; *Paracoccidioides*; Noncaseating granuloma; Sarcoidosis; small forms.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE TABELAS.....	VIII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	XI
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Justificativa.....	4
2 OBJETIVOS.....	6
2.1 Objetivo geral.....	6
2.2 Objetivos específicos.....	6
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	7
3.1 Delineamento e período do estudo.....	7
3.2 População do estudo.....	7
3.3 Instituição.....	7
3.4 Aspectos Éticos.....	7
3.5 Diagnóstico de paracoccidiodomicose.....	8
3.5.1 Exame microscópico direto.....	8
3.5.2 Exame anatomopatológico.....	8
3.5.3 Cultura.....	9
3.5.4 Imunodifusão.....	9
3.6 Coleta de dados.....	9
4 ARTIGOS.....	10
4.1 Artigo 1.....	10
4.2 Artigo 2.....	23
5 CONCLUSÕES.....	38
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
8 ANEXOS.....	48
8.1. Anexo I – Declaração de confidencialidade do sujeito no estudo.....	48
8.2. Anexo II – Termo de compromisso para utilização de dados e prontuários.....	49
8.3. Anexo III – Declaração de uso e publicação de dados.....	50
8.4. Anexo IV – Declaração de riscos e benefícios.....	51

1 INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma infecção sistêmica causada pelo fungo sapróbio do solo e termicamente dimórfico *Paracoccidioides brasilienses*. Foi primeiramente descrita por Adolpho Luz, em 1908, na cidade de São Paulo, a partir do relato de dois casos de lesões orofaríngeas extensas, em que o microorganismo foi isolado (Lutz, 1908). Recentemente, o uso de métodos moleculares mostrou que o *P. brasiliensis* não é uma única espécie, mas um complexo que compreende ao menos três espécies: S1 (presente no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela); PS2 (*P. lutzii*; do Brasil e Venezuela); e PS3 (restrito da Colômbia) (Queiroz-Telles *et al.*, 2011). Desta forma, trataremos aqui o agente da paracoccidioidomicose somente por *Paracoccidioides*.

A doença é endêmica ou adquirida na maior parte dos países da América Latina, em área que se estende do México à Argentina, sendo por isso anteriormente denominada “Blastomicose Sul Americana”. Outras sinonímias incluem doença de Lutz-Splendore-Almeida e blastomicose brasileira. Não sendo doença de notificação compulsória, estima-se que cerca de 10 milhões de pessoas estão infectadas com o *P. brasiliensis*, das quais cerca de 1 a 2% irão desenvolver formas clínicas da doença (Colombo *et al.*, 2011).

A lesão primária costuma ocorrer em crianças e adolescentes, após a inalação de propágulos fúngicos que medem menos de 5µm de diâmetro e chegam facilmente aos alvéolos pulmonares, e manifesta-se assintomaticamente ou como uma infecção pulmonar autolimitada. Em adultos, a doença resulta geralmente da reativação endógena de lesões quiescentes. Os pulmões são os órgãos mais afetados pela PCM. Sítios extrapulmonares de lesões incluem membranas mucosas, linfonodos, glândula suprarrenal e pele (Brummer *et al.*, 1993; Colombo *et al.*, 2007; Restrepo *et al.*, 1976; Londero *et al.*, 1981; Montenegro *et al.*, 1994).

A doença costuma afetar indivíduos do sexo masculino, com idades entre 30 e 50 anos, atividades relacionadas ao solo (na maioria agricultores) e baixo nível socioeconômico (Bethlem *et al.*, 1991; Negroni, 1993). Outros fatores de risco comumente associados à PCM

são alcoolismo e desnutrição (Valle *et al.*, 1992). A predominância no sexo masculino dá-se em virtude da presença de um receptor de membrana para 17- β -estradiol no *Paracoccidioides*, que inibe a transição dos propágulos conídeo-miceliais a levedura, a forma patogênica do fungo (Restrepo *et al.*, 1984).

Dependendo da interação parasita-hospedeiro, a PCM apresenta-se com um curso progressivo ou regressivo (Wanke *et al.*, 1997). De acordo com o Consenso em Paracoccidioidomicose, a classificação das formas clínicas da PCM dá-se da seguinte maneira: PCM infecção (portador assintomático) e PCM doença: I- Forma aguda/subaguda ou tipo juvenil (3 a 5% dos casos da doença, predominando em crianças e adolescentes, com evolução rápida); II- Forma crônica ou tipo adulto (mais de 90% dos pacientes, com progressão lenta, envolvendo um – Unifocal – ou mais de um órgão simultaneamente – Multifocal –); III- Forma residual ou sequelar (manifestações cicatríciais que se seguem ao tratamento da micose) (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

O diagnóstico da PCM é feito com base na história clínica (sintomas respiratórios, emagrecimento, astenia, lesões cutâneas ou orais, linfonodomegalias, etc.) e epidemiológica (paciente proveniente de ou viajante em regiões endêmicas), e é confirmado pela visualização microscópica das estruturas fúngicas do *Paracoccidioides* a partir de secreções ou tecidos (Brummer *et al.*, 1993; Colombo *et al.*, 2007; Restrepo *et al.*, 1976; Londero *et al.*, 1981; Montenegro *et al.*, 1994).

A morfologia da levedura consiste em grandes células globosas envoltas por múltiplos brotamentos (lembrando uma “roda de leme”) ou células-mãe com apenas um ou dois brotamentos (lembrando uma “cabeça de Mickey Mouse”), as quais medem de 5 a 30 micrômetros de diâmetro. Os métodos de rotina mais utilizados para a visualização do fungo são o hidróxido de potássio a 10% (para secreções e líquidos) e a coloração de GMS (*Gomori-Grocott Methenamine Silver*) para esfregaços e tecidos (Queiroz-Telles *et al.*, 2011; Colombo *et al.*, 2007).

A resposta mais comum do hospedeiro ao fungo é granulomatosa ou mista granulomatosa e supurativa. Os granulomas epitelioides são tidos como a forma mais evoluída de reatividade tecidual e a arma de defesa biológica mais efetiva contra microrganismos invasores; e são formados com o objetivo de destruir, bloquear e cercar o parasita e, assim, impedir sua multiplicação (Motta, 1936; Montenegro et al., 1994). As características histopatológicas da PCM são similares às de outras micoses e doenças granulomatosas sistêmicas. Por isso, torna-se extremamente importante a pesquisa minuciosa, com a utilização de colorações especiais (Gomori-Grocott), para a identificação dos elementos fúngicos na lesão (Gonçalves *et al.*, 1998).

Os granulomas podem ser bem formados ou pouco definidos, isolados ou confluentes, e consistem em agregados de células epitelioides, células gigantes de tipo Langhans e corpo-estranho, macrófagos, linfócitos, plasmócitos e fibroblastos. Podem ser similares aos da tuberculose, apresentando-se com necrose central, ou serem sólidos, mimetizando os da sarcoidose (Angulo-Ortega *et al.*, 1971; Wanke *et al.*, 1998). Estas duas doenças, tuberculose e sarcoidose, são, conseqüentemente, os principais diagnósticos diferenciais da PCM, sendo que a tuberculose ocorre concomitantemente à PCM em 10 a 15% dos casos (Quagliato Júnior *et al.*, 2007).

A sarcoidose é uma doença inflamatória crônica multissistêmica, de etiologia desconhecida, cujo diagnóstico é feito por achados clínico-radiológicos e a evidência histológica de granulomas epitelioides não caseosos (“granulomas sarcoides”). Na definição da doença consta ainda que “granulomas de causas conhecidas e reações sarcoides locais devem ser excluídas” (Hunninghake *et al.*, 1999).

Há evidências diretas, provenientes de dados de infecções em humanos e em animais experimentais, de que o granuloma paracoccidioídico é relacionado à resposta imune celular do hospedeiro. Fava Netto foi o primeiro a chamar a atenção para este fato, classificando as formas clínicas da micose em dois tipos: I- Infecção benigna e localizada, com resposta imune celular persistente e histopatologia mostrando granulomas epitelioides compactos com poucos fungos; e II- Infecção disseminada, com inflamação mista supurativa e granulomatosa frouxa, mostrando extensas áreas de necrose e grande número de células fúngicas (Fava

Netto, 1961). Mais recentemente, estas duas formas foram redefinidas, respectivamente, como os polos hiperérgico e anérgico da doença (Lacaz, 1982).

Os elementos multibrotantes são a forma característica e patognomônica do *Paracoccidioides*. No entanto, ocasionalmente, poucas ou inúmeras formas excepcionalmente pequenas do fungo (medindo entre 1,5 e 4 μm de diâmetro) são encontradas em cortes histológicos, as quais podem ser interpretadas como leveduras de *Histoplasma capsulatum* ou *Cryptococcus* pobremente encapsulado (Almeida, 1954; Londero *et al.*, 1980). Foram relatados alguns casos de PCM com formas pequenas do fungo em lesões orais (Almeida *et al.*, 1940), laringeas (Almeida, 1954; Figueiredo, 1954) e pulmonares (Angulo-Ortega, 1972; Angulo-Ortega, 1975; Londero *et al.*, 1980).

Sendo a paracoccidioidomicose uma doença endêmica no nosso meio e de importante impacto social e econômico, visto que acomete indivíduos que usualmente encontram-se na fase mais produtiva da vida, faz-se imperativo o diagnóstico preciso da doença. Em casos particulares, porém não infrequentes, a apresentação histológica e microbiológica dificulta o diagnóstico diferencial com doenças de evolução e tratamentos completamente distintos.

O presente trabalho tem o intuito de identificar dentre os casos de PCM diagnosticados no Laboratório de Micologia do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, aqueles cuja apresentação clínica e histopatológica mimetizou, em algum momento da evolução da doença, a sarcoidose (“granulomas sarcoides”) e aqueles que apresentaram formas pequenas do *Paracoccidioides*. Assim, pretendemos chamar a atenção dos profissionais que atendem esta parcela de pacientes para os diagnósticos diferenciais da paracoccidioidomicose, quais sejam, outras doenças granulomatosas e micoses sistêmicas.

1.1 Justificativa

Há muito poucos estudos abordando a confusão diagnóstica entre a sarcoidose e as micoses sistêmicas, em especial a paracoccidioidomicose. Visto que são doenças com apresentação clínica e radiológica por vezes muito similar, porém com tratamentos muito

distintos, é fundamental que estes diagnósticos diferenciais sejam considerados. O tratamento com corticosteroides, indicado para os casos de sarcoidose, tem consequências catastróficas para um paciente com paracoccidioidomicose, com progressão e disseminação da doença. Por outro lado, também há poucos estudos documentando casos de formas pequenas do *Paracoccidioides*, que impõem um desafio diagnóstico quando ocorrem, pois se confundem com outras espécies fúngicas. O presente estudo justifica-se, portanto, para documentar casos de paracoccidioidomicose que simularam a sarcoidose e que apresentaram formas pequenas do *Paracoccidioides* e alertar os profissionais de saúde quanto à importância e necessidade de se considerar os diagnósticos diferenciais entre a paracoccidioidomicose, a sarcoidose e outras micoses sistêmicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar e caracterizar os casos que simularam sarcoidose e os que apresentaram formas pequenas de *Paracoccidioides* dentre os 856 casos de paracoccidioidomicose diagnosticados no Laboratório de Micologia do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, no período de 1981 a dezembro de 2013.

2.2 Objetivos Específicos

- Enumerar fatores epidemiológicos, radiológicos e histopatológicos dos casos clínicos, revisados através dos arquivos hospitalares;
- Analisar os comemorativos que possam diferenciar a sarcoidose da paracoccidioidomicose;
- Propor rotina diagnóstica para os casos de sarcoidose na busca de agentes etiológicos tratáveis;
- Diferenciar as formas pequenas do *Paracoccidioides* de outras leveduras, tais como: *Histoplasma*, *Cryptococcus* pobremente encapsulado;
- Propor técnicas laboratoriais para assegurar a etiologia da paracoccidioidomicose nos casos de elementos leveduriformes pequenos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento e período do estudo

Estudo retrospectivo e observacional, no período de 1981 a dezembro de 2013.

3.2 População do estudo

A população do estudo compreendeu todos os casos de paracoccidiodomicose diagnosticados no Laboratório de Micologia do Complexo Hospitalar Santa Casa no período de 1981 a 2013. A casuística foi constituída de 20 casos.

3.3 Instituição

A Santa Casa de Porto Alegre é um complexo hospitalar de atendimento terciário composto por sete hospitais, que ao todo somam mais de 1.100 leitos, 133 dos quais são de terapia intensiva. Ocorrem na Instituição cerca de 52.000 internações e 708.000 consultas ambulatoriais por ano. É uma Instituição com mais de 200 anos de existência, servindo como hospital-escola à Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Cerca de 60% dos leitos do hospital são destinados a pacientes do Sistema Único de Saúde, e 40% a pacientes particulares ou conveniados.

3.4 Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (Parecer nº 461.482 de 05/11/2013), com a garantia de anonimato dos sujeitos incluídos na pesquisa. Nos **Anexos I, II, III e IV** constam as declarações referentes aos aspectos éticos, encaminhadas ao referido Comitê.

3.5 Diagnóstico de paracoccidioidomicose

O diagnóstico da paracoccidioidomicose é feito pela visualização direta das leveduras multibrotantes do *Paracoccidioides* em fluidos biológicos e cortes histológicos ou pelo isolamento do fungo em cultura a partir de espécimes clínicos. Existem testes sorológicos que corroboram o diagnóstico, porém um resultado negativo não exclui a realidade da doença.

Desta forma, o diagnóstico foi realizado por meio de: exame microscópico direto, exame anatomopatológico com a utilização de colorações especiais (GMS), cultura e testes sorológicos (imunodifusão).

3.5.1 Exame microscópico direto

Foi realizado pela visualização dos elementos leveduriformes característicos do *Paracoccidioides* em preparado a fresco a partir de diversos espécimes clínicos, que incluíram: exsudato de lesões ulcerativas, escarro, lavados broncoalveolares e pequenos fragmentos de tecido esmagados. Todos esses foram examinados ao microscópio em uma gota de hidróxido de potássio a 10% (KOH).

Lavados ou escovados brônquicos e outros líquidos orgânicos foram centrifugados antes do exame. O escarro foi liquidificado com N-acetilcisteína e então centrifugado para obtenção do sedimento para exame microscópico. Esfregaços foram corados pelo GMS.

3.5.2 Exame anatomopatológico

À coloração de rotina para cortes histológicos (hematoxilina-eosina) o *Paracoccidioides* é frequentemente mal visualizado. Para aumentar a sensibilidade na detecção dos elementos fúngicos, utilizou-se a coloração de Gomori-Grocott, que consiste em uma impregnação pela prata em cortes de parafina, precedida por oxidação por ácido crômico. A impregnação mostra os parasitas em marrom ou preto, contrastando com as demais estruturas celulares, que adquirem a coloração verde. É corada pela prata apenas a parede celular do fungo, constituída de polissacarídeos.

3.5.3 Cultura

Os espécimes clínicos foram inoculados em ágar Sabouraud ou ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e cicloheximida (Mycosel®) e incubados em temperatura ambiente (25-30°C), e em ágar sangue ou ágar infusão cérebro-coração (BHI) e incubadas a 35-37°C. A 25°C, vêem-se hifas hialinas septadas, com alguns clamidoconídeos intercalares e terminais e raros microconídeos observados ao longo da hifa. A 35°C, observa-se o fenômeno do dimorfismo térmico, com a presença de leveduras com parede dupla, multibrotantes, características.

3.5.4 Imunodifusão

A reação de imunodifusão radial dupla é um exame indireto de imunoprecipitação em gel, no qual os componentes da reação se difundem radial e passivamente, formando linhas de precipitação no ponto de equilíbrio. Esta técnica fundamenta-se nas reações antígeno-anticorpo do *Paracoccidioides*. Todo soro suspeito que formou uma linha de precipitação com identidade total com a linha de precipitação do controle foi considerado positivo.

3.6 Coleta dos Dados

Os dados foram colhidos a partir de fichas clínicas do Laboratório de Micologia do Complexo Hospitalar Santa Casa, e informações adicionais foram obtidas nos prontuários médicos dos pacientes nos hospitais em que tiveram atendimento.

4 ARTIGOS

4.1 Artigo 1 (Publicado na revista Mycopathologia em 12 de setembro de 2015)

Paracoccidioidomycosis mimicking sarcoidosis: A review of 8 cases

Mariana Guimarães Coelho¹, Cecília Bittencourt Severo^{2,3}, Flávio de Mattos Oliveira², Bruno Hochhegger⁴ & Luiz Carlos Severo^{2,5}

ABSTRACT

Sarcoidosis is a multisystem disorder that is characterized by noncaseous epithelioid cell granulomas, which may affect almost any organ. Thoracic involvement is common and accounts for most of the morbidity and mortality associated with this disease. The diagnosis is based on exhaustive exclusion of differential diagnoses, particularly granulomatous infections. We report data on eight patients with paracoccidioidomycosis mimicking sarcoidosis. Five patients presented with a chronic pulmonary type infection and three had a disseminated form after immunosuppressive treatment. The mycological diagnosis in noncaseating granulomas is emphasized and reviewed.

Keywords Paracoccidioidomycosis; *Paracoccidioides*; Noncaseation granuloma; Sarcoidosis.

(1) Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil.

(2) Laboratório de Micologia, Hospital Santa Rita, Irmandade Santa Casa de Misericórdia Porto Alegre (ISCOMPA), RS, Brasil.

(3) Professora Adjunta, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA.

(4) Serviço de Radiologia, ISCOMPA, RS, Brasil.

(5) Professor do Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, UFRGS. Pesquisador 1B CNPq.

Correspondence to: Dr. Luiz Carlos Severo, Laboratório de Micologia, Hospital Santa Rita, Irmandade Santa Casa de Misericórdia Porto Alegre, Annes Dias 285, 90020-090 Porto Alegre, RS, Brasil. Phone: + 55 51 32285208. E-mail: severo@santacasa.tche.br; severo@pesquisador.cnpq.br

INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (PCM) is caused by species in the genus *Paracoccidioides*, which are thermodimorphic saprobic fungi. *Paracoccidioides* is one of the most common causes of fungal infection in South America, with a high incidence in Brazil. PCM is acquired by inhalation of mycelial fragments and microconidia. In the past, PCM was thought to be caused by *P. brasiliensis*, but a new species, *P. lutzii*, was recently discovered in the central-western region of Brazil [1-2].

The lungs are the initial focus of the disease [3-4]. The lesions are usually regressive and self-limited [5]. At times, however, primary pulmonary lesions may be progressive. PCM may cause a large variety of lesions with no single pathognomonic picture [5].

We report eight cases of PCM with prior histopathological diagnoses of sarcoidosis (noncaseating granulomas in lung biopsies). The aim of this paper is to call attention to the possibility of differential diagnosis for sarcoidosis.

PATIENTS AND METHODS

We reviewed the medical records of eight patients with PCM who were initially misdiagnosed with sarcoidosis at the Santa Casa Hospital Complex of Porto Alegre, RS, Brazil. This study was conducted with the permission of the Medical Research Ethics Committee of Santa Casa (Protocol number 461.482/2013).

The diagnosis of sarcoidosis was made on the basis of roentgenographic and histopathological findings (noncaseating granulomas and/or sarcoid granulomas) using a Hematoxylin and Eosin (H&E) stain. The Siltzbach classification system divides the progression of sarcoidosis into the following five stages: stage 0, with a normal appearance at chest radiography; stage 1, with lymphadenopathy only; stage 2, with lymphadenopathy and parenchymal lung disease; stage 3, with parenchymal lung disease only; and stage 4, with pulmonary fibrosis [6].

Direct examination of wet-mount preparations of sputum samples and/or tissue sections stained by H&E and Gomori methenamine silver (GMS) allowed mycological diagnosis, which was based on the finding of characteristic multibudding elements of *Paracoccidioides*. Fungal cultures could not be performed because biopsies were stored in formaldehyde. Serologic tests were performed by the agar-gel method immunodiffusion (ID) test.

The Ziehl–Neelsen (ZN) stain was used to determine whether acid-fast bacilli were present, giving a diagnosis of tuberculosis.

RESULTS

Eight patients had symptoms consistent with the sarcoid granulomas found in PCM. All cases occurred in adult male smokers who resided in an endemic area. Of these eight patients, five (62.5%) had disease limited to the lungs and three (37.5%) had disseminated disease. Patient ages ranged from 27 to 59 years old (mean age = 42 years). The presenting symptoms and physical characteristics of the patients are summarized in Table 1.

Histopathological examination of lung biopsies showed the presence of sarcoid granulomas in all eight patients (Figs. 1 and 2); one patient had concomitant granulomas with caseous necrosis due to miliary tuberculosis (Case 5, Fig. 3).

The diagnosis of PCM was done by specific staining using GMS on the lung biopsy samples (Cases 1–8), which revealed multibudding yeast elements consistent with *Paracoccidioides*. Two skin biopsies (Cases 5 and 6), two sputum samples (Cases 3 and 4), and one larynx biopsy (Case 7) were considered; one lung biopsy was stained with H&E (Case 1, Fig. 2D), which also revealed characteristic elements of PCM. Four patients (Cases 3–6) for whom immunodiffusion was performed showed positive reactions to a *Paracoccidioides* antibody.

All patients received prednisone before the diagnosis of PCM. For the treatment of PCM, all patients initially received trimethoprim/sulfamethoxazole (TMP/SMX), followed by itraconazole in five patients and amphotericin B and voriconazole in one patient. Seven patients recovered, whereas one died.

In a chest X-ray taken at the pretreatment phase, all patients showed lymphadenopathy and parenchymal lung disease (stage 2), with a reticulonodular pattern. During the postimmunosuppressive treatment imaging assessment, all patients showed an increase in micronodular opacities.

Table 1: Summary of clinical and laboratory findings of 8 cases that initially mimicked sarcoidosis

Case No	Sex, Age	Clinical findings	X-ray film	Associated conditions	Histopathologic findings	Mycology diagnosis	ID	Treatment	Outcome
1	M, 48	Productive cough	Bilateral fibronodular infiltrates	Prednisone - 2 months	Lung biopsy: sarcoid granuloma	Lung biopsy: GMS +	ND	TMP/SMX, itraconazol	Recovery
2	M, 37	Productive cough	Bilateral fibronodular infiltrates	Prednisone - 2 months	Lung biopsy: sarcoid granuloma	Lung biopsy: GMS +	ND	TMP/SMX, itraconazol	Recovery
3	M, 33	Productive cough, chest pain	Bilateral fibronodular infiltrates	Prednisone - 2 months	Lung biopsy: sarcoid granuloma	Lung biopsy: GMS+ Sputum +	+	TMP/SMX, itraconazol	Recovery
4	M, 43	Productive cough	Bilateral fibronodular infiltrates	Prednisone years, tuberculosis	Lung biopsy: sarcoid granuloma	Lung biopsy: GMS + Sputum +	+	TMP/SMX, itraconazol	Recovery
5	M, 27	Productive cough, fever and night sweats, anorexia, weight loss, skin lesion.	Bilateral fibronodular infiltrates	Prednisone - 2 months, AIDS, miliary tuberculosis	Lung biopsy: sarcoid granuloma and Tuberculoid granuloma with caseous necrosis	Lung biopsy: GMS + Skin biopsy: GMS +	ND	TMP/SMX, streptomycin, ethambutol and hydrazide.	Died
6	M, 51	Productive cough, dyspnea	Bilateral fibronodular infiltrates	Prednisone - 2 months, diabetes, tuberculosis, adrenal insufficiency	Lung biopsy: sarcoid granuloma	Lung biopsy: GMS + Skin biopsy: GMS +	+	TMP/SMX, itraconazol	Recovery
7	M, 42	Productive cough	Bilateral fibronodular infiltrates	Prednisone - 2 months	Lung biopsy: sarcoid granuloma	Lung biopsy: GMS + Larynx biopsy: GMS +	+	TMP/SMX, itraconazol	Recovery
8	M, 59	Productive cough, dyspnea	Bilateral fibronodular infiltrates	Prednisone - 2 months, kidney and adrenal insufficiencies	Lung biopsy: sarcoid granuloma	Lung biopsy: GMS +	ND	TMP/SMX, amphotericin B, voriconazole	Recovery

M indicates male; ID, immunodiffusion; GMS, Gomori-Grocott methenamine silver stain; TMP/SMX, Trimethoprim/sulfamethoxazole; ND, Not done

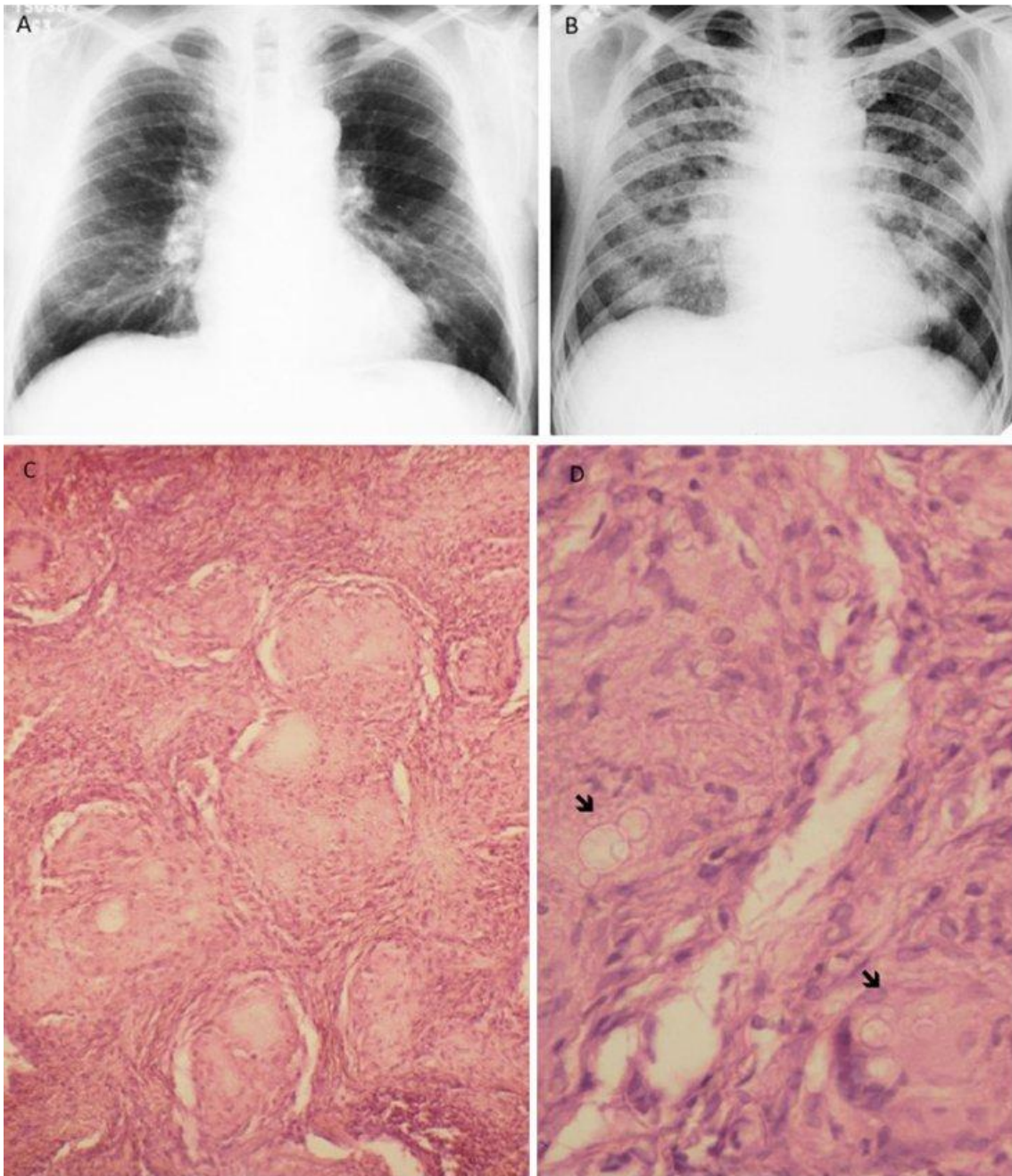


Figure 1, case 1. A, Chest X-ray demonstrating lymphadenopathy and reticulonodular opacities in both lungs. B, Postimmunosuppressive treatment X-rays show an increase in micronodular opacities. C, Low-magnification view of PCM in the lung, showing aggregated nonnecrotizing granulomas replacing the lung parenchyma (H&E, $\times 200$). D, High-magnification photomicrograph showing large budding yeasts of *Paracoccidioides* sp (arrows) under a phase-contrast view (H&E, $\times 400$).

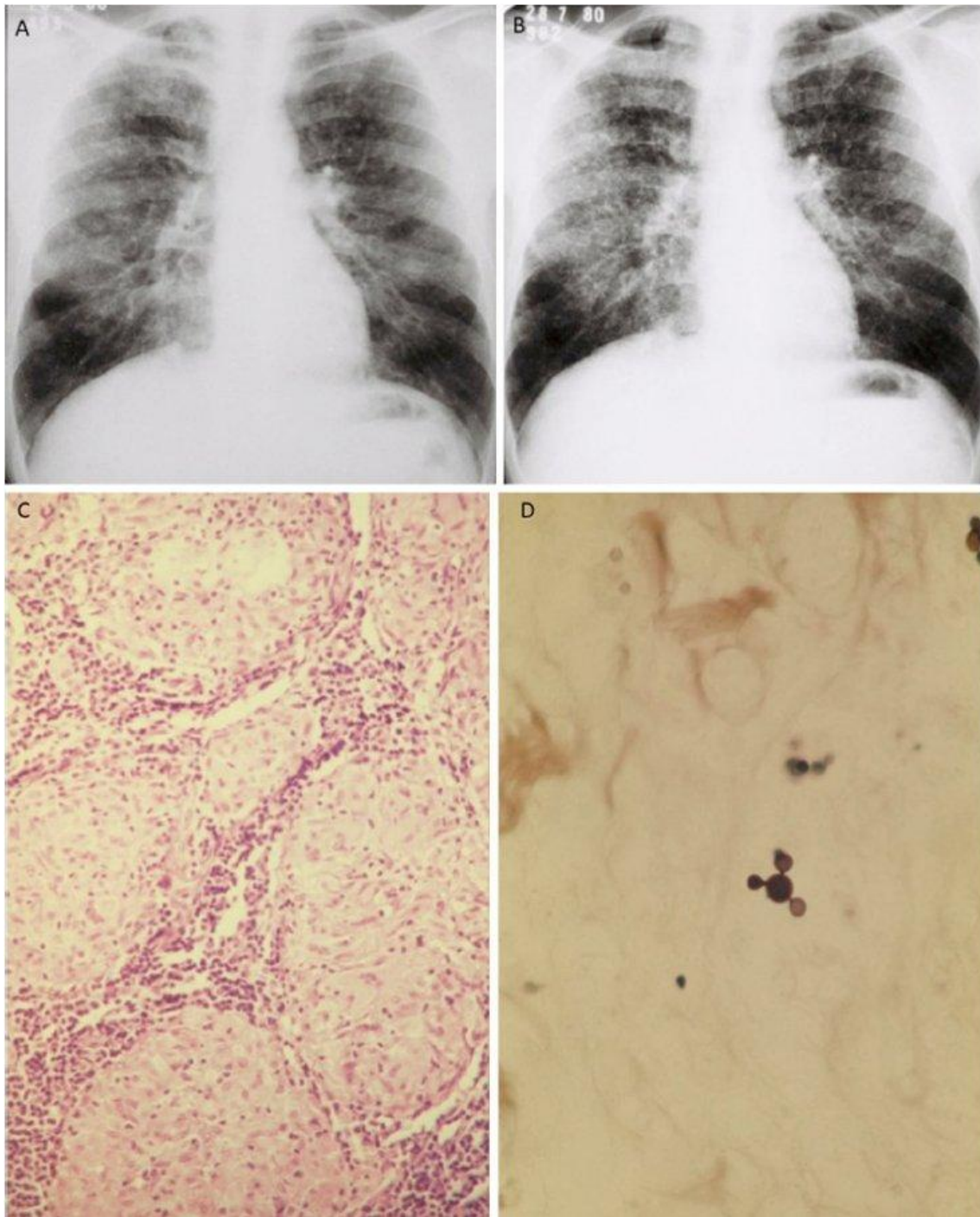


Figure 2, case 2: A, Roentgenogram reveals fibronodular infiltration in both lungs. B, this image shows a significant progression of lung lesions after 2 months of corticosteroid therapy. C, Lung section showing multiple noncaseating epithelioid cell granulomas (H&E, $\times 200$). D, Replicate section showing a cell with three buds. The buds are connected to the parent cell by a narrow neck (GMS, $\times 200$).

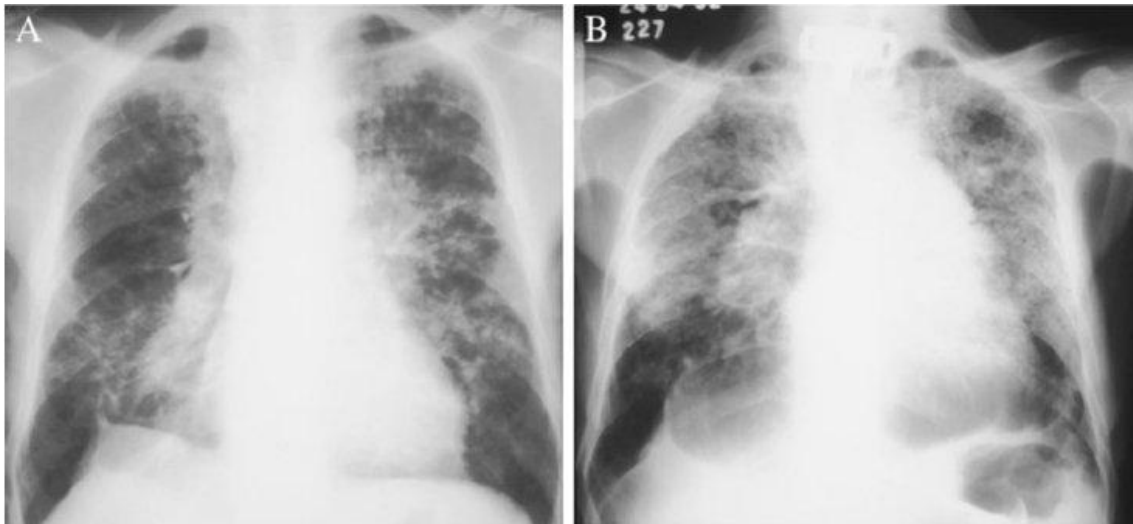


Figure 3, case 4. A, a roentgenogram of the chest reveals bilateral fibronodular infiltrates. B, seven years after the initiation of prednisone therapy, a remarkable progression of the lung lesions with consolidation was observed; the sputum was positive for acid-fast bacilli and *Paracoccidioides*.

DISCUSSION

The pathological diagnosis of sarcoidosis generally halts clinical attempts to search for specific causes, as observed in our series of cases. However, major conditions in the differential diagnosis of sarcoidosis include infections, and special stains for acid-fast bacilli and fungi are mandatory in these cases. Delays in the diagnosis of PCM result when alternative diagnoses are not considered and these stains are not performed. However, histopathological lesions are not enough evidence to base a diagnosis on, and further tests must be performed [7].

Sarcoidosis is a systemic granulomatosis disorder of uncertain etiology that principally affects the intrathoracic structure, with infiltrative lesions into the lungs. In a lung biopsy, areas of alveolar consolidation represent areas of interstitial disease. Histopathologically, sarcoidosis is characterized by compact, round or oval granulomas composed of epithelioid histiocytes. In these granulomas, caseous necrosis is absent [7,8].

The histologic hallmarks of sarcoidosis are noncaseous granulomas composed of a central core of histiocytes, epithelioid cells, and multinucleated giant cells surrounded by lymphocytes, scattered plasma cells, and varying quantities of fibroblasts and collagen in the periphery [6,9]. These giant cells may contain cytoplasmic inclusions such as asteroid bodies and Schaumann bodies. The central portion of the granuloma predominantly consists of lymphocytes that express the CD4 protein, whereas lymphocytes that express CD8 are found in the peripheral zone. Dense bands of fibroblasts, mast cells, collagen, and proteoglycans may encase the granulomas and lead to fibrosis, end-organ damage, and irreversible disruption of organ function [6,9]. Fibrotic changes usually begin at the periphery of a granuloma and extend centrally, leading to complete fibrosis, hyalinization, or both. Granulomas occasionally exhibit focal coagulative necroses, and it has been suggested that necrotizing sarcoid granulomatosis may be a variant of sarcoidosis [6,9].

In PCM, pathologic findings of an examination of H&E stained sections usually show a mixed suppurative and granulomatous inflammatory infiltrate composed primarily of

neutrophils admixed with epithelioid histiocytes [10]. On the other hand, a noncaseating epithelioid granuloma, similar to those in sarcoidosis, can be observed [11, 12]. Yeast forms can be difficult to visualize with routine staining (H&E), and a special stain should be used for screening tissue for the presence of fungal elements. In this way, the possibility of systemic fungal infections should be considered whenever there is a noncaseating granuloma in the tissue reaction. In such cases, at least a GMS stain should be performed because sarcoidosis is a multisystem immunological granulomatous disease of unknown cause and is well-recognized as a diagnosis of exclusion at the clinical, radiographic, and morphological levels [7].

Imaging has a prominent role in the assessment of sarcoidosis diagnosis and outcome, which are extremely variable. Chest radiography staining helps predict the probability of spontaneous remission, and stage IV is associated with high mortality [9]. However, the reproducibility of the staining results is poor, and the changes in radiography and lung function are inconsistently correlated, which may be problematic for monitoring the disease and treatment responses. Chest computed tomography (CT) scans can contribute to the diagnosis of difficult cases. A bilateral hilar lymphadenopathy with a peri-lymphatic micronodular pattern is highly specific for sarcoidosis [9,13]. Thus, a CT scan is important for the investigation of pulmonary complications, including aspergillomas and pulmonary hypertension [9]. CT scans improve the yield of bronchoscopies for obtaining a positive endobronchial or transbronchial biopsy. The findings of CT scans may also discriminate between active inflammation and irreversible fibrosis, with occasional influence on therapeutic decisions [9,13]. To achieve a timely diagnosis and help reduce morbidity and mortality, it is essential to (1) recognize both the typical and atypical radiologic manifestations of the disease, (2) take note of features that may be suggestive of diseases other than sarcoidosis, and (3) correlate imaging features with pathologic findings for narrowing the differential diagnosis [13].

Besides histopathological investigation, the diagnosis of PCM is also based on the demonstration of the fungus in sputum and/or other clinical specimens or cultures (as a gold standard). An ID test may be used to screen for PCM [14]. It is important to keep in mind that

the diagnosis of sarcoidosis cannot be made only on the basis of noncaseating sarcoid-type granulomas, because these may be encountered in the granulomatous lesions produced by microorganisms [7]. Negative GMS and ZN histochemical stains, as well as microbiological cultures for fungi and acid-fast organisms, are absolutely necessary to ensure the correct diagnosis [11]. Moreover, the standard treatment of sarcoidosis is corticotherapy, which could be deleterious for patients with fungal diseases, particularly when used for a long period of time. On the other hand, when an etiological agent is found in a granulomatous lesion, specific and early treatment usually leads to a good prognosis. Finally, one cannot diagnose infectious diseases if one does not think about them.

Appropriate treatment depends on clinical presentation of PCM. Specific therapy includes sulfonamides, amphotericin B, and azole antifungals [15]. IN our serie of cases the association of oral sulfomethoxazole-thrimethoprim was used as the first option because of the facility in their administrations. But, itraconazole is considered the standard treatment for mild and moderate clinical forms of PCM and convetional or lipid formulations of amphotericin B are indicated to treat severe disseminated cases in patients who are intolerant of other agents or who have refractory infections [16].

REFERENCES

1. Gegembauer G, Araujo LM, Pereira EF, Rodrigues AM, Paniago AMM, Hahn RC, Camargo ZP. Serology of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*. PLOS Neg Trop Dis. 2014;8:e2986.
2. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an Update. Clin Microbiol Rev. 1993;1993:89-117.
3. Severo LC, Geyer GR, Londero AT, Porto NS, Rizzon CFC. The primary pulmonary lymph node complex in paracoccidioidomycosis. Mycopathologia. 1979;61:115-118.
4. Martinez R, Moyá MJ. Primary complex of paracoccidioidomycosis and hypereosinophilia. J Bras Pneumol. 2009;35:1259-1262.
5. Severo LC, Londero AT. The gamut of progressive pulmonary paracoccidioidomycosis. Mycopathologia. 1981;75:65-74.
6. Churg A, Carrington CB, Gupta R. Necrotizing sarcoid granulomatosis. Chest 1979; 76; 406-13.
7. El-Zammar OA, Katzenstein ALS. Pathological diagnosis of granulomatous lung disease: a review. Histopathology. 2007;50:289-310.
8. Mukhopadhyay S, Gal AA. Granulomatous lung disease. An approach to the differential diagnosis. Arch Pathol Lab Med. 2010;134:667-690.
9. Newman LS, Rose CS, Maier LA. Sarcoidosis. N Engl J Med. 1997; 336: 1224-34.
10. Rosen Y. Sarcoidosis. In: Dail DH, Hammer SP (Eds.) Pulmonary pathology. New York: Springer. 1994: 13-645.

11. Britto T, Franco MF. Viewpoint, granulomatous inflammation. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1994; 36: 185-192.
12. Angulo OA, Pollack L. Paracoccidioidomycosis. In: Baker RD (Ed.). *The pathologic anatomy of Mycoses*. 1st edition. New York: Springer. 1971:507-576.
13. Pujol-Riqué, Ruiz S, Alonso-Tarrés C, Cañete C. Micosis pulmonar por *Paracoccidioides brasiliensis*: confusión peligrosa con sarcoidosis. *Radiol*. 2011;53:560-563.
14. Hillerdal G, Nöu E, Osterman K, Schmekel B. Sarcoidosis: epidemiology and prognosis - a 15-year European study. *Am Rev Respir Dis*. 1984; 130: 29-32.
15. Camargo ZP, Franco MF. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol*. 2000; 17:41-48.
16. Restrepo A, Bernard G, Castro CC, Agudelo CA, Tobón AM. Pulmonary Paracoccidioidomycosis. *Semin Resp Crit Care Med*. 2008; 29: 182-197.

4.2 Artigo 2 (Submetido para a Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo em 9 de outubro de 2015)

Paracoccidioidomycosis due to small forms of *Paracoccidioides*. A report of 12 cases and review of the literature

Mariana Guimarães COELHO (1), Cecília Bittencourt SEVERO (2,3), Flávio de Mattos

OLIVEIRA(2) & Luiz Carlos SEVERO(2,4)

SUMMARY

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis with geographic distribution limited to Latin America. PCM is caused by species in the genus *Paracoccidioides*, which usually appear in tissues as large yeasts, 5 to 30 μm in size. The daughter cells are attached to the parent cell by a narrow neck. Sometimes smaller forms occur (1 to 4 μm). These can be confused with other fungi, such as *Histoplasma capsulatum* and unencapsulated *Cryptococcus* variants. We report twelve cases of PCM with small forms of *Paracoccidioides*. The aim of this paper is to focus on the possibility of differential diagnosis with other systemic mycoses.

KEYWORDS: Paracoccidioidomycosis; *Paracoccidioides*; small forms.

(1) Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil.

(2) Laboratório de Micologia, Hospital Santa Rita, Irmandade Santa Casa de Misericórdia Porto Alegre (ISCOMPA), RS, Brasil.

(3) Professora Adjunta, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA.

(4) Professor do Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, UFRGS. Pesquisador 1B CNPq.

Correspondence to: Dr. Luiz Carlos Severo, Laboratório de Micologia, Hospital Santa Rita, Irmandade Santa Casa de Misericórdia Porto Alegre, Annes Dias 285, 90020-090 Porto Alegre, RS, Brasil. Phone: + 55 51 32285208. E-mail: severo@santacasa.tche.br; severo@pesquisador.cnpq.br

INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis with geographic distribution limited to Latin America⁵. PCM is caused by species in the genus *Paracoccidioides*. PCM was previously thought to be caused solely by *P. brasiliensis*, but a new species *P. lutzii*, was recently discovered in the central-western region of Brazil^{5,10}.

Paracoccidioides species exist in the mycelial form in nature but assumes the yeast phase at body temperature. Usually it appears in tissue as large, thin-necked budding yeasts, 5 to 30 μm in size. Multiple buds surround a parent cell resembling a “mariner’s wheel”.

Yeast cells of *Paracoccidioides* that do not demonstrate multiple budding may be occasionally confused with other fungi at first glance, but more thorough examination and other laboratory diagnostic findings can lead to the establishment of correct diagnosis. Small forms of *Paracoccidioides* (1 to 4 μm) have some resemblance to the yeast cells of *H. capsulatum*; larger and more irregular sized forms may be confused with the unencapsulated yeast of the *Cryptococcus* species.

We report twelve cases of PCM with small forms of *Paracoccidioides*. The aim of this paper is investigate the possibility of differential diagnosis with other systemic mycoses.

PATIENTS AND METHODS

We reviewed the medical records of twelve patients with PCM, that presented with small forms of *Paracoccidioides*, at the Santa Casa Hospital Complex of Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Six of the cases have not been published yet and the other six have been previously reported^{12,18,20-23}. This study was conducted with the permission of the Medical Research Ethics Committee of Santa Casa (Protocol number 461.482/2013).

Direct examination of wet-mount preparations of sputum samples and/or tissue sections stained by hematoxylin and eosin (H&E) and Grocott-Gomori's methenamine silver stain (GMS) allowed for mycological diagnoses which were based on the identification of multibudding elements of *Paracoccidioides* yeast cells. Fungal cultures could not be performed, except in one case, because the biopsies were stored in formaldehyde. Serologic tests were performed using the agar-gel immunodiffusion (ID) method.

RESULTS

Ten patients had symptoms consistent with those found in PCM. Two were asymptomatic. All cases occurred in adult smokers who resided in an endemic area. Ten patients were male. The two female patients were in menopause. Patient ages ranged from 33 to 68 years old (mean age = 55,58 years). The presenting symptoms and other characteristics for all patients are summarized in Table 1.

Histopathological examination of lung, oropharyngeal and laryngeal biopsies showed the presence of granulomas in nine patients, mostly with central necrosis. Small yeast cells were visualized in tissue sections stained with GMS but, at first glance, the fungal species could not be determined. Only with a more thorough examination of serial slides, the multibudding yeast elements consistent with *Paracoccidioides* were identified.

Six patients showed positive reactions to a *Paracoccidioides* antibody in the immunodiffusion test. Two cases were negative. Among the five patients that had sputum examinations, three cases were positive. A fungal culture was performed with a biopsy sample from one patient (Case1), which yielded a positive result.

In the chest X-ray, six patients showed bilateral fibronodular infiltrates, and one also had a cavity (Case 5). Two patients had solitary nodules (Cases 4 and 12); two had multiple nodules, calcified (Case 10) or with cavities (Case 11); one patient had consolidation and a calcified nodule (Case 9); and one patient had atelectasis with bronchial obstruction by a neoplasm (Case 7).

For the treatment of PCM, eight patients received medication (ketoconazole, n=2; sulfadiazine, n=4; itraconazole, n=3) and four underwent surgery.

Table 1: Summary of clinical and laboratory findings of 12 cases of Paracoccidioidomycosis due to small forms of *Paracoccidioides*

Case No. ^{Ref}	Sex, Age	Clinical findings	X-ray film	Associated conditions	Histopathologic findings	Mycology diagnosis	ID	Treatment	Outcome
1	F, 64	Dyspnea, asthenia, adynamia, thoracic pain	Bilateral fibronodular infiltrates	Menopause, smoker	Mycotic granulomas	Lung biopsy: GMS + Culture +	+	Ketoconazole	Recovery
2	F, 57	Anorexia, cough, dyspnea, wheezing	Bilateral fibronodular infiltrates	Menopause (with hormone therapy), smoker	Non-necrotizing granulomatous interstitial pneumonia	Lung biopsy: GMS +	+	Itraconazole	Recovery
3	M, 33	Dyspnea, cough, asthenia, headache, thoracic pain	Bilateral fibronodular infiltrates	Smoker	Granuloma, necrosis and neutrophilic exudate	Lung biopsy: GMS + Sputum +	+	Itraconazole	Recovery
4	M, 68	Asymptomatic	Solitary nodule	Smoker, diabetes, SAH	Granulomas with dystrophic calcification and central necrosis	Lung biopsy: GMS +	-	Surgery	Recovery
5	M, 54	Dysphagia, sore throat, weight loss, cough, asthenia, oropharyngeal ulcerated lesion	Bilateral fibronodular infiltrates and cavitated lesion (7.0 cm)	Smoker, alcoholism, SAH, COPD, tuberculosis	Ulcerative granuloma in squamous mucosa	Oropharynx biopsy: GMS +	-	Itraconazole	Recovery
6	M, 45	Cough, dysphonia, anorexia, asthenia, fever, night sweats, dyspnea	Bilateral fibronodular infiltrates	Smoker	Squamous epithelial hyperplasia and mixed inflammatory infiltrate with giant cells	Larynx biopsy: GMS + Sputum +	+	Sulfadiazine Ketoconazole	Reactivation of disease 15 years later Recovery

7 ¹⁹	M, 59	Cough, anorexia, dyspnea, weight loss	Atelectasis of the lung by bronchial obstruction	Smoker, lung carcinoma	Granulomas with necrosis and one area of calcification	Lung biopsy: H&E +	ND	Pneumonectomy	Recovery
8 ¹²	M, 53	Progressive dyspnea, asthenia, weight loss, productive cough	Bilateral fibronodular infiltrates	SAH, smoker	Confluent epithelioid granulomas	Lung biopsy: GMS + Sputum -	+	Sulfadiazine	Recovery
9 ²⁰	M, 48	Cough, fever	Consolidation, calcified nodule	Hodgkin's disease, smoker	NA	Lung biopsy: GMS +	ND	Sulfadiazine	Recovery
10 ²¹	M, 59	Dysphonia	Many calcified nodules scattered in both lungs	Lung carcinoma, smoker	Calcified nodule	Larynx biopsy: GMS + Lung biopsy: GMS + Sputum +	+	Pneumonectomy Sulfadiazine	Recovery
11 ²²	M, 63	Productive cough	Multiple nodules, some with cavities	Smoker, COPD	Necrotizing granulomas	Lung biopsy: GMS + Sputum -	ND	NA	Recovery
12 ¹⁸	M, 64	Asymptomatic	Solitary, ovoid nodule (1,5 cm)	Smoker	Necrotizing granulomas	Lung biopsy: GMS +	ND	Surgery	Recovery

M indicates male; F, female; SAH, Systemic arterial hypertension; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; ID, immunodiffusion; GMS, Grocott-Gomori's methenamine silver stain; ND, not done; H&E, hematoxylin and eosin; NA, not available; Ref, references.

REPRESENTATIVE CASE

A 64-year-old woman was referred and admitted to the Santa Casa Hospital Complex with a chronic cough. She had been a smoker for more than 30 years (two packs of cigarettes daily). Physical examination on admission revealed that her blood was pressure 140/80 mmHg, pulse rate was 96 beats/min., respiratory rate was 16 breaths/min., and temperature 37.7°C. The chest roentgenogram revealed bilateral infiltrates mainly towards the central and upper fields of the lungs and emphysema at the bases (Fig. 1). An open pulmonary biopsy was performed. The microscopic examinations of lung tissue revealed a granulomatous inflammation (H&E) and several small yeast forms (GMS - Fig. 2A). For this reason the tissue sections and serum were sent to the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) in Atlanta, GA (008610). In the serological tests for antibodies both immunodiffusion and complement fixation were positive, one line of precipitation and titers of 1:32, respectively. A fungal culture of lung tissue was performed and the *Paracoccidioides* species was isolated (Fig. 2B). Finally, for confirmation, an inoculation of the patient's lung tissue culture in a guinea pig revealed the characteristic forms of *Paracoccidioides* species (Fig. 3). The patient was treated with ketoconazole at a daily oral dose of 100 mg, which produced remission of symptoms in one month. Following an uneventful course in the hospital, the patient was discharged, and the therapy was continued for one year.



Figure 1. Chest X-ray showing bilateral infiltrates mainly towards the central and upper fields.

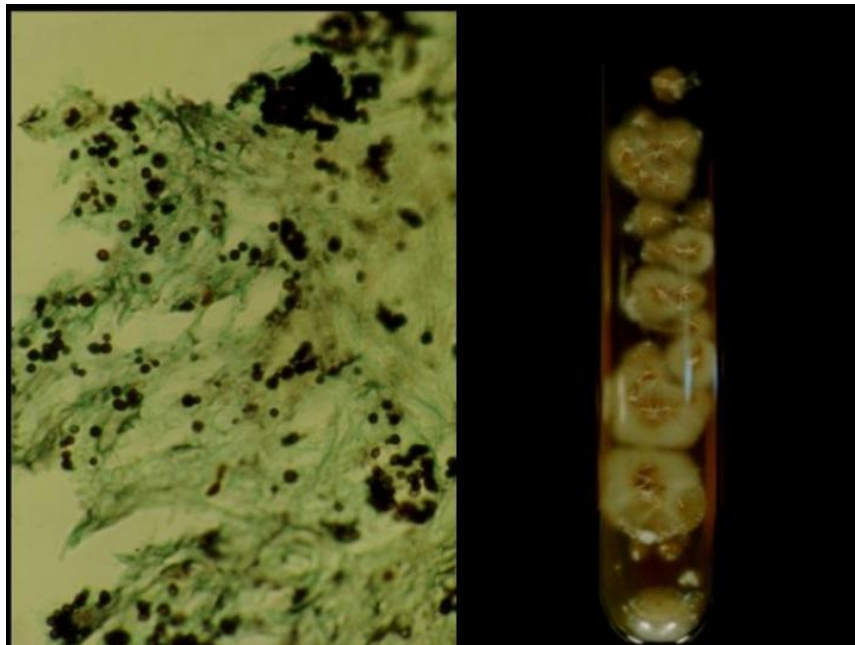


Figure 2. **A.** Methenamine silver-stained tissue section of lung revealing small forms of *Paracoccidioides* (GMS, 400x). **B.** Sabouraud dextrose agar with mycelial colonies of *Paracoccidioides* from lung biopsy.

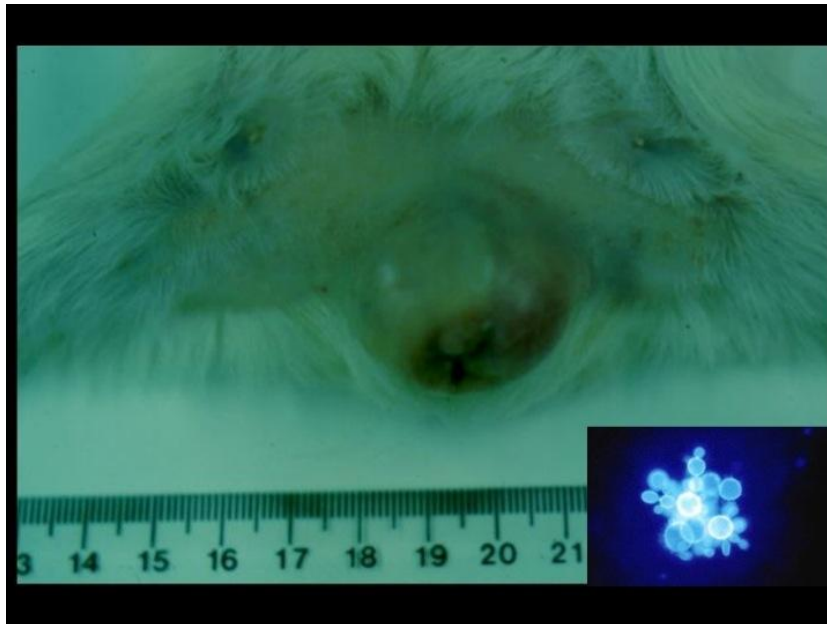


Figure 3. In the inset, the characteristic multiple budding forms of *Paracoccidioides* (Calcofluor white stain 400x), from the tissue specimen of guinea pig's testicle.

DISCUSSION

The tissue reaction against the *Paracoccidioides* is similar to those of other systemic mycoses, that is, granulomatous or mixed granulomatous and suppurative infiltrates^{7,15}. At times, pathologists may observe fungi occurring in highly different circumstances, such as fibrous, cretified and even calcified encapsulated necrotic nodules⁴.

In infected tissues, the size, number and form of the organisms vary considerably according to the organ involved, the duration of infection and host conditions⁶. Small forms of *Paracoccidioides*, as observed in this report, can appear in older patients and in women.

The reasons for the occurrence of small forms of *Paracoccidioides* are still unknown, but they may be related to host immune response. If the immune response is effective, with granuloma formation, it prevents the proliferation of the fungus⁶, which may be the reason that only a few multibudding forms were seen in this series of cases. In women, estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformations of *Paracoccidioides*, which provides an explanation for the resistance of females to the disease¹⁷. Such inhibition could effectively reduce the propagation of the initial inhaled inoculum, improving the capability of the host to prevent the infection's progression, or a delay in *Paracoccidioides* transformation could allow females preferentially to develop an immune response¹⁶.

Paracoccidioides infections can remain dormant for very long periods, after which they can be reactivated. Quiescent, residual or latent foci remain in the lungs after involution of the primary infection, as calcifications, encapsulated necrotic nodules or fibrous nodules. In these circumstances, the *Paracoccidioides* appears only very sporadically in its characteristic multiple budding forms. Instead it is seen more often in its small form, either without any buds or with just a single one^{1-3, 8,11,13,14,16}.

The identification of fungi in tissue sections is an important component of the laboratory diagnosis of mycoses, because they are usually large and morphologically distinct. After the routine H&E stained tissue sections, however, special staining may be required to identify some fungal species.

Small forms of *Paracoccidioides*, seen infrequently, may be confused with *H. capsulatum*^{2,15}, especially when they are intracellular. In this case, a GMS stain must be made; if it is *Paracoccidioides*, the yeast elements are less uniform in size than in *H. capsulatum* and, on examination of many sections in series, a few large elements, with or without buds, may be found. This difficulty is confronted more frequently in old, encapsulated, or necrotic foci. In these latter cases, the distribution of the fungi is helpful for orientation. In cases of PCM the fungi are located in the periphery of the lesion as well as in its center and, principally, in the limit between the capsule and the necrotic area. In histoplasmosis the fungal distribution is more central than peripheral^{2,7,15}.

The medium-sized forms of *Paracoccidioides* may be confused with *Cryptococcus* sp. in encapsulated necrotic lesions. Here distinguishing the species is easier: using Mayer's Mucicarmin or a Fontana-Masson stain, the mucinous capsule of the fungus or the melanine in the wall of the fungus are made visible^{9,13}.

Moreover, other methods can and should be used to complement the diagnosis of PCM, such as immunodiffusion and, particularly, fungal culture. To ensure fungal culture to be made, clinicians and surgeons should be aware of the differential diagnosis and be trained to avoid placing all samples in formaldehyde. With prompt diagnosis the prognosis of PCM is usually good, with recovery in most cases.

RESUMO

Paracoccidioidomicose por formas pequenas de *Paracoccidioides*. Relato de 12 casos e revisão da literatura.

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica com distribuição geográfica restrita à América Latina. PCM é causada por espécies do gênero *Paracoccidioides*, que geralmente aparecem nos tecidos como leveduras esféricas grandes e multibrotantes, medindo de 5 a 30 μm de diâmetro. As células filhas são ligadas à célula mãe por uma fina ponte citoplasmática. Algumas vezes, são encontradas formas pequenas do *Paracoccidioides* (medindo de 1 a 4 μm de diâmetro), que podem ser confundidas com outros fungos, como *Histoplasma capsulatum* e *Cryptococcus* não encapsulado.

Relatamos 12 casos de PCM que apresentaram formas pequenas de *Paracoccidioides*. O objetivo deste trabalho é chamar a atenção para o diagnóstico diferencial da paracoccidioidomicose com outras micoses sistêmicas.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to Dr. Leo Kaufman (CDC) for the confirmation of the small forms of *Paracoccidioides* and for performing the serologic tests of the representative case.

REFERENCES

1. Almeida F, Lacaz CS. Sobre um caso de granuloma paracoccidioidico com curiosos aspectos morfológicos do parasito no tecido. *Fol Clin Biol.* 1940;1:1-14.
2. Angulo OA, Pollack L. Paracoccidioidomycosis. In: Baker RD (Ed.). *The pathologic anatomy of Mycoses.* 1st edition. New York: Springer. 1971:507-576.
3. Angulo AO. Lesiones numulares pulmonares de origen inflamatorio. *Torax Biol Pos-Grado.* 1975;2:25-34.
4. Angulo-Ortega A. Calcification in paracoccidioidomycosis: Are they the morphological manifestation of subclinical infections? In: *Paracoccidioidomycosis. Proc. First Pan Am Symp. PAHO, Washington (Scientific Pub No 254)* 1972:129-133.
5. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev.* 1993;6:89-117.
6. Camargo ZP, Franco MF. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol.* 2000;17:41-48.
7. El-Zammar OA, Katzenstein ALS. Pathological diagnosis of granulomatous lung disease: a review. *Histopathology.* 2007;50:289-310.
8. Figueiredo MA. Formas pequenas de blastomicetos em lesões humanas. *Rev Paul Med.* 1954;45:178-184.
9. Gazzoni AF, Severo CB, Salles EF, Severo LC. Histopathology, serology and cultures in the diagnosis of cryptococcosis. *Rev Inst Med trop S Paulo.* 2009;51: 266-259.

10. Gegembauer G, Araujo LM, Pereira EF, Rodrigues AM, Paniago AMM, Hahn RC, *et al.* Serology of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*. PLOS Neg Trop Dis. 2014;8:e2986.
11. Gonçalves JR A, Londero AT, Vieira ARM, Carvalho FG. A importância da impregnação argêntea no diagnóstico da paracoccidioidomicose. J Pneumol. 1988;14:27-31.
12. Londero AT, Severo LC, Ramos CD. Small forms and hyphae of *Paracoccidioides brasiliensis* in human tissue. Mycopathologia. 1980;72:17-19.
13. Londero AT, Chandler FW. Paracoccidioidomycosis. In: Connor DH (Ed.). Pathology of infectious diseases. Stamford: Appleton & Lange; 1997. p. 1045-53.
14. Melo IS, Londero AT. Spontaneously resolving pulmonary lesions in paracoccidioidomycosis. Mycopathologia 1983;82:57-9.
15. Queiroz-Telles F, Escussiato DL. Pulmonary paracoccidioidomycosis. Semin Resp Crit Care Med. 2011;32:764-774.
16. Restrepo A, Robledo M, Giraldo R, Hernández H, Sierra F, Gutiérrez F *et al.* The gamut of paracoccidioidomycosis. Am J Med. 1976; 61:33-41.
17. Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit mycelium-to-Yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: Implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. IAI. 1984;46:346-353.
18. Santos JWA, Michel GT, Londero AT. Paracoccidioidoma: Case record and review. Mycopathologia. 1997;137:83-85.
19. Santos JWA, Debiasi RB, Miletho JN, Bertolazi NA, Bertolazi AL, Michel GT. Asymptomatic Presentation of Chronic Pulmonary Paracoccidioidomycosis: Case Report and Review. Mycopathologia. 2004;157:53-57.

20. Severo LC, Geyer GR, Londero AT, Porto NS, Rizzon CFC. The primary pulmonary lymph node complex in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. 1979;67:115-118.
21. Severo LC, Palombini BC, Utz E, Braun SN. Paracoccidioidomicose pulmonar resultante de reativação de lesão quiescente, em paciente imunossuprimido. *J Bras Pneumol*. 1980;6:21-22.
22. Severo LC, Londero AT. The gamut of progressive pulmonary paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. 1981;75:65-74.
23. Severo LC, Porto NS, Camargo JJ, Geyer GR. Multiple paracoccidioidomas simulating Wegener's granulomatosis. *Mycopathologia*. 1985;91:117-119.

5 CONCLUSÕES

- No período entre 1981 e 2013 foram diagnosticados 856 casos de paracoccidioidomicose no Laboratório de Micologia do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, sendo que, destes, 8 simularam sarcoidose na apresentação inicial (Artigo 1) e 12 apresentaram formas pequenas do *Paracoccidioides* (Artigo 2).

- Os pacientes que tiveram o diagnóstico inicial de sarcoidose eram todos do sexo masculino, fumantes, com média de idade de 42,5 anos e apresentavam tosse produtiva, infiltrado fibronodular bilateral aos exames de imagem e granulomas epitelioides sem necrose (granulomas sarcoides) na biópsia pulmonar. Para o diagnóstico de paracoccidioidomicose, utilizou-se a coloração de GMS nos cortes histológicos, exame direto do escarro e imunodifusão. Dos 12 pacientes que apresentaram formas pequenas do *Paracoccidioides*, todos eram fumantes, com média de idade de 55,58 anos, sendo a maioria do sexo masculino, apresentando sintomas consistentes com os achados na PCM e granulomas predominantemente com necrose central ao exame histopatológico. Os elementos fúngicos foram identificados ao GMS e o diagnóstico de PCM foi corroborado com imunodifusão, exame direto do escarro e cultura.

- A apresentação clínica e os exames de imagem por si sós não permitem a diferenciação entre a sarcoidose e a paracoccidioidomicose. O uso de tomografia computadorizada pode auxiliar em alguns casos.

- A sarcoidose é uma doença inflamatória crônica multissistêmica que cursa com a formação de granulomas epitelioides sem necrose e cujo diagnóstico só pode ser feito após a exclusão de causas conhecidas. Nesses casos, é mandatória a busca ativa por agentes etiológicos com a utilização de colorações especiais, em especial ZN e GMS, para exclusão de micobacterioses e micoses endêmicas e frequentes no nosso meio.

- As formas pequenas do *Paracoccidioides* tendem a ocorrer com mais frequência em lesões regressivas e em mulheres. A sua diferenciação com outras espécies fúngicas deve ser feita pela realização de cortes histológicos seriados e escalonados, corados pelo GMS, com o objetivo de surpreender algumas formas usuais, multibrotantes, patognomônicas do *Paracoccidioides*. Existem ainda algumas características de forma e distribuição dos fungos na lesão, que podem ajudar na diferenciação entre eles. Em comparação aos elementos leveduriformes do *Histoplasma capsulatum*, os do *Paracoccidioides* são menos uniformes em

tamanho e estão localizados tanto na periferia como no centro da lesão. Na histoplasmose, a distribuição do fungo tende a ser mais central. Para a diferenciação com o *Cryptococcus* sp. não encapsulado, utilizam-se as colorações Mucicarmin de Mayer ou Fontana-Masson, que evidenciam, respectivamente, a cápsula mucinosa do *Cryptococcus* sp. ou a melanina da parede do fungo.

- Técnicas laboratoriais complementares devem ser utilizadas para assegurar o diagnóstico etiológico. Nesta série de casos, utilizou-se imunodifusão, exame direto do escarro e cultura. Na suspeita de uma doença granulomatosa ou ao encontro de formas pouco usuais de um fungo, é de suma importância que não se acondicione todo o material biológico em formol, para assim possibilitar o isolamento do agente etiológico em cultura.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A paracoccidioidomicose pode ocorrer com a formação de granulomas epitelioides sem necrose (granulomas sarcoides) e, com isso, ser confundida com a sarcoidose.

A sarcoidose é um diagnóstico de exclusão e, portanto, devem-se procurar causas conhecidas de doenças granulomatosas, com a utilização de colorações especiais (ZN e GMS) nos cortes histológicos.

Em algumas situações, notadamente nas lesões regressivas, o *Paracoccidioides* não se apresenta na sua forma habitual, ocorrendo nas formas pequenas.

Para o diagnóstico etiológico nesses casos, cortes histológicos seriados corados ao GMS e técnicas laboratoriais complementares (imunodifusão e cultura) devem ser realizados para a diferenciação entre o *Paracoccidioides*, o *Histoplasma* e o *Cryptococcus* não encapsulado.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida F, Lacaz CS. **Sôbre um caso de granuloma paracoccidioidico com curiosos aspectos do parasito no tecido.** Folia Clinica et Biologica, v.12, p.11-14, 1940.

Almeida F. **Formas pequenas do *P. brasiliensis*, *B. dermatitidis* e *H. capsulatum* nos tecidos.** Anais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, v.28, p.141-148, 1954.

Angulo-Ortega A, Pollak L. **Paracoccidioidomycosis.** In: Baker, RD *et al.* The Pathologic Anatomy of Mycoses. Human Infection with Fungi, Actinomycetes and Algae. Berlin: Springer-Verlag, p.507-576, 1971.

Angulo-Ortega A. **Calcifications in paracoccidioidomycosis: Are they the morphological manifestation of subclinical infections?** In: Paracoccidioidomycosis. Proceedings First Panamerican Symposium, PAHO, Washington, Scientific Publications n.254, p.129-133, 1972.

Angulo-Ortega A. **Lesiones numulares pulmonares de origen inflamatório: Paracoccidioidomas.** Tórax (Venezuela), v.11, p.25-34, 1975.

Bethlem NM, Lemle A *et al.* **Paracoccidioidomycosis.** Seminars in Respiratory Medicine, v.12, p.81-97, 1991.

Brito T, Sandhu GS, Kline BC, Aleff RA, Sandoval MP, Santos RT, Brandão AAH, Lacaz CS. **In situ hybridization in paracoccidioidomycosis.** Medical Mycology, v.37, p.207-211, 1999.

Britto T, Franco MF. **Viewpoint, Granulomatous inflammation.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v.36, p.185-192, 1994.

Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. **Paracoccidioidomycosis: an update.** Clinical Microbiology Reviews, v.6, p.89-117, 1993.

Camargo ZP, Franco MF. **Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis.** Revista Iberoamericana de Micología, v.17, p.41-48, 2000.

Churg A, Carrington CB, Gupta R. **Necrotizing sarcoid granulomatosis.** Chest, v.76, p.406-13, 1979.

Colombo AL, Tobón A, Restrepo A, Queiroz-Telles F, Nucci M. **Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America.** Medical Mycology, v.49(8), p.785-798, 2011.

El-Zammar AO, Katzenstein A-LA. **Pathological diagnosis of granulomatous lung disease: a review.** Histopathology, v.50, p.289-310, 2007.

Fava Netto C. **Contribuição ao estudo imunológico da blastomicose de Lutz.** Revista do Instituto Adolpho Lutz, v.21, p.99-114, 1961.

Figueiredo MA. **Formas pequenas de blastomicetos em lesões humanas.** Revista Paulista de Medicina, v.45, p.178-184, 1954.

Gazzoni AF, Severo CB, Salles EF, Severo LC. **Histopathology, serology and cultures in the diagnosis of cryptococcosis.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v.51, p.266-259, 2009.

Gegembauer G, Araujo LM, Pereira EF, Rodrigues AM, Paniago AMM, Hahn RC, *et al.* **Serology of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii***. PLOS Neglected Tropical Diseases, v.8, e2986, 2014.

Gonçalves AJR, Londero AT, Vieira ARM, Carvalho FG. **A importância da impregnação argêntea no diagnóstico da paracoccidioidomicose**. Jornal de Pneumologia, v.14(1), p.27-31, 1998.

Hillerdal G, Nöu E, Osterman K, Schmekel B. **Sarcoidosis: epidemiology and prognosis. A 15-year European study**. American Review of Respiratory Disease, v.130, p.29-32, 1984.

Hunninghake GW, Costabel U *et al.* **Statement on Sarcoidosis**. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, v.160, p.736-755, 1999.

Lacaz CS. **Aspectos clínicos gerais. Formas polares de paracoccidioidomicose**. In: Del Negro, G; Lacaz, CS; Fialho, AM editores. Paracoccidioidomicose. São Paulo: Savier-EDUSP, cap.13, 1982.

Londero AT, Chandler FW. **Paracoccidioidomycosis**. In: Connor, DH; Chandler, FW; Manz, HJ; Schwartz, DA; Lack, EE editors. Pathology of infectious diseases. Stamford, CT: Appleton and Lange, p.1045-1053, 1997.

Londero AT, Severo LC, Ramos CD. **Small forms and hyphae of *Paracoccidioides brasiliensis* in human tissue**. Mycopathologia, v.72, p.17-19, 1980.

Londero AT, Severo LC. **The gamut of progressive pulmonary paracoccidioidomycosis**. Mycopathologia, v.75, p.65-74, 1981.

Lutz A. **Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das Hyphoblastomycoses americanas.** O Brazil-Medico, v.22(15), p.141-144, 1908.

Martinez R, Moyá MJ. **Primary complex of paracoccidioidomycosis and hypereosinophilia.** Jornal Brasileiro de Pneumologia, v.35, p.1259-1262, 2009.

Melo IS, Londero AT. **Spontaneously resolving pulmonary lesions in paracoccidioidomycosis.** Mycopathologia, v.82, p.57-59, 1983.

Montenegro MR, Franco M. **Pathology.** In: Franco, M; Lacaz, CS; Restrepo-Moreno, A; Del Negro, G editors. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton, FL: CRC Press, p.131-150, 1994.

Motta LC, Pupo JA. **Granulomatose paracoccidioidica (blastomycose brasileira).** Anais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, v.12, p.407-426, 1936.

Mukhopadhyay S, Wilcox BE, Myers JL *et al.* **Pulmonary Necrotizing Granulomas of Unknown Cause – Clinical and Pathologic Analysis of 131 Patients With Completely Resected Nodules.** CHEST, v.144(3), p.813-824, 2013.

Mukhopadhyay S, Gal AA. **Granulomatous Lung Disease – An Approach to the Differential Diagnosis.** Archives of Pathology and Laboratory Medicine, v.134, p.667-690, 2010.

Negróni R. **Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis, Lutz's mycosis).** International Journal of Dermatology, v.32, p.847-859, 1993.

Newman LS, Rose CS, Maier LA. **Sarcoidosis**. New England Journal of Medicine, v.336, p.1224-34, 1997.

Pujol-Riqué M, Ruiz S, Alonso-Tarrés C, Cañete C. **Micosis pulmonar por *Paracoccidioides brasiliensis*: confusión peligrosa con sarcoidosis**. Radiología, v.53(6), p.560-563, 2011.

Quagliato Júnior R, Grangeia TA, Massucio RA, De Capitani EM, Rezende SM, Balthazar AB. **Association between paracoccidioidomycosis and tuberculosis: reality and misdiagnosis**. Jornal Brasileiro de Pneumologia, v.3, p.295-300, 2007.

Queiroz-Telles F, Escuissato DL. **Pulmonary Paracoccidioidomycosis**. Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine, v.32, p.764-774, 2011.

Restrepo A, Robledo M, Giraldo R, Hernández H, Sierra F, Gutiérrez F, Londoño F, López R, Calle G. **The Gamut of Paracoccidioidomycosis**. The American Journal of Medicine, v.61, p.33-42, 1976.

Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. **Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis**. Infection and Immunity, v.46(2), p.346-353, 1984.

Rosen Y. **Pathology of Sarcoidosis**. Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine, v.28, p.36-52, 2007.

Santos JWA, Michel GT, Londero AT. **Paracoccidioidoma: Case record and review**. Mycopathologia, v.137, p.83-85, 1997.

Severo LC, Geyer GR, Londero AT, Porto NS, Rizzon CFC. **The primary pulmonary lymph node complex in paracoccidioidomycosis.** Mycopathologia, v.67, p.115-118, 1979.

Severo LC, Palombini BC, Utz E, Braun SN. **Paracoccidioidomicose pulmonar resultante de reativação de lesão quiescente, em paciente imunossuprimido.** Jornal Brasileiro de Pneumologia, v.6, p.21-22, 1980.

Severo LC, Londero AT. **The gamut of progressive pulmonary paracoccidioidomycosis.** Mycopathologia, v.75, p.65-74, 1981.

Severo LC, Porto NS, Camargo JJ, Geyer GR. **Multiple paracoccidioidomas simulating Wegener's granulomatosis.** Mycopathologia, v.91, p.117-119, 1985.

Severo LC, Roesch EW, Oliveira EA, Rocha MM, Londero AT. **Paracoccidioidomycosis in women.** Revista Iberoamericana de Micología, v.15, p.88-89, 1998.

Shikanai-Yasuda MA, Filho FQT, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML *et al.* **Consenso em paracoccidioidomicose.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.39(3), p.297-310, 2006.

Valle ACF, Wanke B et al. **Tratamento da paracoccidioidomicose, estudo retrospectivo de 500 casos. I- Análise clínica, laboratorial e epidemiológica.** Anais Brasileiros de Dermatologia, v.67, p.251-254, 1992.

Wake B, Londero AT. **Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection.** In: Franco, M; Lacaz, CS; Restrepo-Moreno, A; Del Negro, G editors. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton, FL: CRC Press, p.109-117, 1994.

Wanke B, Londero AT. ***Paracoccidioides Brasiliensis.*** In: Collier, L; Balows, A; Sussman, M editors. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 9th edition. London: Edward Arnold, v.4, p.395-407, 1997.

8 ANEXOS

8.1. Anexo I – Declaração de confidencialidade do sujeito no estudo

DECLARAÇÃO DE CONFIDENCIALIDADE DO SUJEITO NO ESTUDO

Protocolo: “Histopatologia da Paracoccidiodomicose: granuloma sarcoide e formas pequenas do *Paracoccidioides*”

Pesquisador Responsável: Mariana Guimarães Coelho

Asseguramos que os sujeitos de pesquisa incluídos no protocolo **“Histopatologia da Paracoccidiodomicose: granuloma sarcoide e formas pequenas do *Paracoccidioides*”** terão a sua confidencialidade resguardada pela equipe envolvida na condução do projeto de pesquisa e que em nenhum momento a identidade será revelada, conforme disposto na Resolução 466/2012 seus complementares, e demais normas legislativas vigentes.

Pesquisadores envolvidos:

- Mariana Guimarães Coelho
- Luiz Carlos Severo
- Cecília Bittencourt Severo

8.2. Anexo II – Termo de compromisso para utilização de dados e prontuários

TERMO DE COMPROMISSO PARA UTILIZAÇÃO DE DADOS E PRONTUÁRIOS

“Histopatologia da Paracoccidioidomicose: granuloma sarcoide e formas pequenas do *Paracoccidioides*”

Os autores do projeto de pesquisa comprometem-se a manter o sigilo dos dados coletados em prontuários e banco de dados referentes aos pacientes atendidos no Laboratório de Micologia (ISCOMPA). Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente com finalidade científica, preservando-se integralmente o anonimato dos pacientes. Irão cumprir todos os termos das Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde).

Pesquisadores envolvidos:

- Mariana Guimarães Coelho
- Luiz Carlos Severo
- Cecília Bittencourt Severo

8.3. Anexo III – Declaração de uso e publicação de dados

DECLARAÇÃO DE USO E PUBLICAÇÃO DE DADOS

Protocolo: “Histopatologia da Paracoccidioomicose: granuloma sarcoide e formas pequenas do *Paracoccidioides*”

Pesquisador Responsável: Mariana Guimarães Coelho

Conforme estipulado na Resolução 466/12 CNS/MS, venho por meio desta, declarar que estou comprometido em publicar a pesquisa clínica supracitada assegurando que os resultados serão reportados de maneira ética, responsável e coerente, sejam eles favoráveis ou não.

Pesquisadores envolvidos:

- Mariana Guimarães Coelho
- Luiz Carlos Severo
- Cecília Bittencourt Severo

8.4. Anexo IV – Declaração de riscos e benefícios

DECLARAÇÃO DE RISCOS E BENEFÍCIOS

Protocolo: “Histopatologia da Paracoccidioidomicose: granuloma sarcoide e formas pequenas do *Paracoccidioides*”

Pesquisador Responsável: Mariana Guimarães Coelho

Declaramos que serão instituídos os cuidados necessários para minimizar todos os riscos relativos à violação ou quebra do sigilo dos dados envolvendo a pesquisa clínica com seres humanos conforme previsto na Resolução 466/2012 CNS/MS, gerando para seus participantes o mínimo de riscos possíveis, tudo no sentido de que o risco se justifique pelo benefício esperado com o desenvolvimento da pesquisa. Na pesquisa experimental o benefício será maior ou no mínimo igual às alternativas já estabelecidas para a prevenção, o diagnóstico e o tratamento existentes.

Pesquisadores envolvidos:

- Mariana Guimarães Coelho
- Luiz Carlos Severo
- Cecília Bittencourt Severo