

MARCUS MIRANDA LESSA

**Aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos da
leishmaniose mucosa**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Professor
Livre-Docente junto ao Departamento de
Otorrinolaringologia e Oftalmologia
(Disciplina de Otorrinolaringologia)

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lessa, Marcus Miranda

Aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos da
leishmaniose mucosa / Marcus Miranda Lessa. -- São
Paulo, 2021.

Tese (livre-docência) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Departamento de Otorrinolaringologia e
Oftalmologia. Disciplina de Otorrinolaringologia.

Descritores: 1. Leishmania braziliensis
2. Leishmaniose 3. Leishmaniose mucocutânea 4. Mucosa
nasal 5. Anticorpos 6. Anticorpo IgG 7. Terapêutica

USP/FM/DBD-286/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

A minha querida e amada esposa, **Patrícia**, que, ao longo de todos esses anos, sempre me apoiou e demonstrou o quanto é grande seu amor, carinho e compreensão.

A meus filhos, **Felipe, Gabriel e Bernardo**, razão maior de minha existência.

A meu saudoso pai, **Hélio Lessa** (in memoriam), exemplo de dignidade, ética e competência, que sempre tento seguir em todos os seus passos.

A minha querida mãe **Tânia** que, com tanto amor e dedicação, é uma das maiores responsáveis por tudo que represento hoje.

A meus irmãos, **Ricardo e Tatiana** que, com muito carinho, sempre acreditaram e estiveram a meu lado em todos os momentos de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento, Professor Titular da Disciplina de Otorrinolaringologia da FMUSP, por ter nos proporcionado a oportunidade de ingressar no mundo da otorrinolaringologia com uma base acadêmica sólida, por meio deste serviço de excelência, sempre oferecendo estímulos e apoio irrestritos.

Ao Prof. Dr. Richard Voegels, orientador não apenas de minha tese de Doutorado, mas também de toda minha formação dentro da Rinologia, pela amizade sincera e por sempre ter nos incentivado e mostrado os caminhos a serem perseguidos para atingir nossas metas.

Ao Prof. Dr. Ossamu Butugan, grande mestre que está sempre presente por meio de seus ensinamentos em nossa prática clínica e na pesquisa, somos eternamente gratos pelo exemplo de ética e sabedoria.

Ao Prof. Edgar Marcelino de Carvalho Filho, toda nossa admiração pela conduta ética, capacidade profissional e importante papel desempenhado em nossa formação como pesquisador, assim como por ter aberto as portas do mundo da pesquisa para nossa Otorrinolaringologia do HUPES/UFBA.

Ao Dr. Paulo Machado, pelos importantes momentos na discussão clínica dos casos dos pacientes em Corte de Pedra e por sempre apoiar a atuação de nossa Otorrinolaringologia nas pesquisas. Somos eternamente gratos pelo apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. Luiz U. Sennes, Prof. Dr. Domingos Tsuji, Dr. João F. Mello Jr., Dr. Olavo Mion, Dr. Rubens Brito Neto, Dr. Rui Imamura, Dr. Michel Cahali, Dra. Tanit Sanchez e Dra. Roseli Bittar, nossos mais sinceros agradecimentos pelo muito que aprendemos na nossa formação como Otorrinolaringologista e pelo exemplo de comprometimento com o ensino e a pesquisa.

Aos colegas e amigos do grupo de Rinologia do HC-FMUSP, Dr. Fábio Pinna, Dr. Fabrício Romano e Dra. Tatiana Abdo. Não esquecerei a amizade, o incentivo e o apoio durante todos esses anos.

Aos amigos, técnicos e funcionários do Laboratório de Imunologia do HUPES/UFBA, em especial, Dr. Albert Schriefer, Dr. Luiz Henrique Guimarães, Olívia Bacellar e a todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para a realização de todos nossos trabalhos em Corte de Pedra e não tiveram seus nomes aqui citados.

A todos nossos orientandos do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da UFBA, em especial, às Dras. Carolina Cincurá e Clara Lima, pela preciosa ajuda prestada durante todos esses anos em nosso grupo de pesquisa em Leishmaniose Mucosa.

A todos os colegas e Professores que contribuem de forma importante para manter a qualidade e o alto nível da produção científica de nosso Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da UFBA.

Aos residentes do Serviço de Otorrinolaringologia do HUPES/UFBA, pela importante atuação no atendimento dos pacientes em Corte de Pedra, colaborando de forma decisiva na assistência e na realização de inúmeros trabalhos.

A todos os colegas e funcionários do Serviço de Otorrinolaringologia do HUPES-UFBA, que direta ou indiretamente colaboraram na realização de nossos trabalhos.

Aos funcionários do Posto de Saúde de Corte de Pedra, especialmente, o Sr. Ednaldo Lago, pela permanente dedicação no encaminhamento dos pacientes atendidos com Leishmaniose Tegumentar.

Aos amigos, irmãos Cláudio Sobral, Frederico Teixeira Jr., Leonardo Canedo e Marcos Leal, colegas de infância e de faculdade, pelo incentivo dentro da medicina e por terem representado uma verdadeira família ao longo de todos esses anos de convivência.

A Adilson Montefusco e Rute Tomida, pela imprescindível contribuição na elaboração e formatação deste estudo e de nosso Memorial.

A todos os pacientes que participaram de nossos estudos, meu eterno agradecimento.

NORMALIZAÇÃO

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. – São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação - DBD/FMUSP, 2011.

Abreviaturas dos títulos de periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS..... | x |
| LISTA DE FIGURAS | xii |
| LISTA DE TABELAS | xiii |
| RESUMO | xiv |
| ABSTRACT | xvi |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2 OBJETIVOS..... | 8 |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA | 10 |
| 3.1 ASPECTOS GERAIS..... | 11 |
| 3.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E TAXONOMIA..... | 12 |
| 3.3 ASPECTOS CLÍNICOS..... | 15 |
| 3.3.1 Leishmaniose mucosa e disfonia..... | 20 |
| 3.4 DIAGNÓSTICO..... | 21 |
| 3.5 IMUNOLOGIA E LEISHMANIOSE MUCOSA | 23 |
| 3.6 TRATAMENTO | 25 |
| 3.6.1 Antimônio Pentavalente..... | 25 |
| 3.6.2 Anfotericina B | 27 |
| 3.6.3 Pentamidina..... | 28 |
| 3.6.4 Miltefosina | 28 |
| 3.6.5 Pentoxifilina | 29 |
| 4 MÉTODOS | 32 |
| 4.1 ASPECTOS DA METODOLOGIA EM COMUM AOS QUATRO ESTUDOS | 33 |
| 4.1.1 Descrição da área endêmica e seleção dos pacientes | 33 |
| 4.1.2 Exame otorrinolaringológico | 34 |
| 4.1.3 Avaliação complementar | 35 |
| 4.1.3.1 Teste de Montenegro | 35 |
| 4.1.3.2 Teste histopatológico | 36 |
| 4.1.4 Critérios para avaliação da eficiência terapêutica..... | 36 |

| | |
|--|------------|
| 4.2 ASPECTOS DA METODOLOGIA ESPECÍFICOS DE CADA ESTUDO..... | 37 |
| 4.2.1 Estudo 1..... | 37 |
| 4.2.2 Estudo 2..... | 37 |
| 4.2.2.1 Antígeno solúvel de Leishmania | 38 |
| 4.2.2.2 Detecção de anticorpos anti-Leishmania IgG por ELISA | 38 |
| 4.2.2.3 Análise estatística | 39 |
| 4.2.3 Estudo 3..... | 39 |
| 4.2.3.1 Tratamento..... | 40 |
| 4.2.3.2 Avaliação de eficácia..... | 40 |
| 4.2.3.3 Análise estatística | 41 |
| 4.2.4 Estudo 4..... | 41 |
| 4.2.4.1 Análise vocal | 42 |
| 4.2.4.2 Análise estatística | 44 |
| 5 RESULTADOS | 45 |
| 5.1 ESTUDO 1 | 46 |
| 5.2 ESTUDO 2 | 56 |
| 5.3 ESTUDO 3 | 58 |
| 5.4 ESTUDO 4 | 63 |
| 6 DISCUSSÃO | 66 |
| 7 CONCLUSÕES..... | 74 |
| 8 ANEXOS..... | 76 |
| ANEXO A - ESTUDO 1 | 77 |
| ANEXO B - ESTUDO 2..... | 90 |
| ANEXO C - ESTUDO 3..... | 96 |
| ANEXO D - ESTUDO 4..... | 102 |
| 9 REFERÊNCIAS | 114 |

LISTAS

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|---------------|--|
| CI | Concha Inferior |
| DP | Desvio-Padrão |
| DO | Densidade Óptica |
| Ed. | Edição |
| et al. | e outros |
| F | Feminino |
| FMUSP | Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo |
| h | hora |
| HC | Hospital das Clínicas |
| HUPES | Hospital Universitário Professor Edgard Santos |
| ICAM-1 | Molécula de adesão intracelular 1 |
| IDRM | Intradermoreação de Montenegro |
| IFN- γ | Interferon gama |
| IgA | Imunoglobulina A |
| IgE | Imunoglobulina E |
| IgG | Imunoglobulina G |
| IL | Interleucina |
| Kg | Quilograma |
| LC | Leishmaniose Cutânea |
| LCD | Leishmaniose Cutânea Difusa |
| LD | Leishmaniose Disseminada |
| LM | Leishmaniose Mucosa |
| LTA | Leishmaniose Tegumentar Americana |
| LV | Leishmaniose Visceral |
| M | Masculino |
| mg | miligrama |
| ml | mililitro |

| | |
|-----------------|--|
| mm | milímetro |
| µg | micrograma |
| PCR | Reação de Cadeia de Polimerase |
| PpGCS | Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde |
| Prof. | Professor |
| S | Septo |
| SARA | Síndrome de Angústia Respiratória Aguda |
| Sb ^v | Antimônio pentavalente |
| SLA | Antígeno Solúvel de Leishmania |
| TC | Tomografia Computadorizada |
| TGF-β | Fator de Transformação de Crescimento beta |
| TMB | Tetrametilbenzidina |
| TNF | Fator de Necrose Tumoral |
| TNF-α | Fator de Necrose Tumoral alfa |
| UFBA | Universidade Federal da Bahia |

FIGURAS

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 1 - | Distribuição dos municípios, conforme classificação de risco da Leishmaniose Tegumentar Americana, Bahia, 2012-2014..... | 14 |
| Figura 2 - | Aspectos clínicos da leishmaniose mucosa em diferentes estágios da doença em fossas nasais à direita..... | 48 |
| Figura 3 - | Estágio V da leishmaniose mucosa | 49 |
| Figura 4 - | Correlação entre o tempo do sintoma (escala logarítmica) e o estágio da leishmaniose mucosa..... | 53 |
| Figura 5 - | Análise histopatológica de biópsias de pacientes com leishmaniose mucosa (LM) | 55 |
| Figura 6 - | Produção de anticorpos IgG contra antígenos de <i>Leishmania braziliensis</i> em pacientes com LM e LC..... | 56 |
| Figura 7 - | Títulos de anti-SLA de IgG total (A), IgG1 (B) e IgG2 (C) de pacientes com LM em diferentes estágios da doença, realizados pela técnica de ELISA..... | 57 |
| Figura 8 - | Cicatrização total da mucosa e perfuração septal dentro de 90 dias, após o início da terapia com pentoxifilina mais antimônio pentavalente (Sb ^v)..... | 60 |
| Figura 9 - | Estimativas de Kaplan-Meier da proporção de pacientes não curados com tratamento com pentoxifilina mais antimônio pentavalente (Sb ^v) ou placebo mais tratamento com Sb ^v | 61 |

TABELAS

| | | |
|-------------------|--|----|
| Tabela 1 - | Um novo sistema de estadiamento clínico proposto para pacientes com leishmaniose mucosa..... | 46 |
| Tabela 2 - | Características da doença mucosa em 50 pacientes com diagnóstico de leishmaniose | 51 |
| Tabela 3 - | Características e resposta clínica de pacientes com leishmaniose mucosa, por grupo de tratamento | 59 |
| Tabela 4 - | Localização das lesões de pacientes com leishmaniose, antes do tratamento medicamentoso | 63 |
| Tabela 5 - | Comparação dos parâmetros perceptivos-auditivos entre os grupos com leishmaniose mucosa e cutânea, antes e depois da aplicação da técnica vocal..... | 65 |

RESUMO

Lessa MM. *Aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos da leishmaniose mucosa* [tese livre-docência]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

A leishmaniose mucosa (LM) é causada predominantemente por *Leishmania braziliensis*. A doença é caracterizada pelo desenvolvimento de lesões sobretudo na mucosa nasal e, nas formas mais graves, pode levar à destruição significativa do tecido. Não existe um método padrão para classificar a gravidade da doença. Uma resposta inflamatória exacerbada foi associada à presença de lesões destrutivas e desfigurantes. Como a *Leishmania* é um parasita intracelular, a maioria dos estudos imunológicos enfatiza a resposta imune mediada por células, enquanto relativamente poucos estudos objetivam investigar o papel dos anticorpos na proteção ou na patologia da LM. A falha terapêutica ocorre em até 42% dos casos. Os pacientes que apresentam falha no tratamento precisam de mais de um curso de antimônio pentavalente (Sb^V) ou medicamentos alternativos para obter a cura. Apesar da intervenção fonoterapêutica poder ajudar pacientes com seqüela de LM e disfonia, há apenas um estudo sobre a terapia fonoaudiológica nesses casos. Quatro diferentes estudos foram realizados com os objetivos de: propor um estadiamento clínico para a doença nasal; correlacionar os títulos de anticorpos com a gravidade da doença da mucosa; avaliar o papel da pentoxifilina associada à terapia convencional com antimônio pentavalente no tratamento da LM; caracterizar a voz e verificar a resposta vocal à intervenção fonoterapêutica nos pacientes com seqüela de LM. No estudo 1, foram categorizados cinquenta pacientes com LM, de acordo com um sistema de estadiamento clínico proposto; os diferentes graus de evolução da doença da mucosa, desde a fase inicial até os casos mais graves a longo prazo permitiram que a LM fosse graduada em cinco estágios. No estudo 2, 27 pacientes com diagnóstico confirmado de LM foram classificados, de acordo com os critérios de estadiamento clínico; os níveis séricos de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 específicos para *Leishmania* foram determinados por ELISA; os pacientes nos estágios IV e V produziram maiores concentrações de anticorpos IgG total e IgG1 quando comparados aos dos estágios I e II. No estudo 3, um ensaio duplo-cego controlado por placebo envolvendo 23 pacientes com LM avaliou a eficácia da pentoxifilina quando administrada em associação com Sb^V, em comparação com o tratamento com Sb^V isolado; 11 pacientes foram randomizados para receber Sb^V mais pentoxifilina oral por 30 dias, e 12 pacientes receberam Sb^V mais placebo oral, pelo mesmo período; o critério de cura foi a cicatrização total das lesões; todos os pacientes do grupo da pentoxifilina tiveram cura com um ciclo de Sb^V, enquanto cinco (41,6%) dos 12 pacientes do grupo placebo necessitaram de um segundo ciclo de Sb^V (P

= 0,037); o tempo de cura \pm desvio-padrão no grupo da pentoxifilina foi 83 ± 36 dias, em comparação com 145 ± 99 dias no grupo do placebo ($P = 0,049$). No estudo 4, foi realizada a coleta da fonação /a:/ de 44 pacientes com LM e LC para análise perceptual da voz e acústica computadorizada; foi evidenciada a associação estatisticamente significativa da astenia de grau 2 (27,7%) nos pacientes com LM. O estadiamento clínico proposto para a doença mucosa em 5 estágios pode ser útil na caracterização da gravidade da lesão e na otimização do resultado terapêutico. Nossos dados demonstram uma associação entre os títulos de anticorpos IgG e a gravidade da doença da mucosa. A adição de pentoxifilina ao Sb^V na LM reduz significativamente o tempo de cicatrização e evita a necessidade de novos cursos de Sb^V . Por fim, mesmo sem a presença de sequelas de lesões laríngeas, pacientes com LM podem apresentar distúrbios vocais causados por sequelas de lesões nasais ou em outros locais e a intervenção fonoterapêutica beneficia a voz desses pacientes.

Descritores: *Leishmania braziliensis*; Leishmaniose; Leishmaniose mucocutânea; Mucosa nasal; Distúrbios da voz; Fonoterapia; Anticorpos; Anticorpo IgG; Terapêutica.

ABSTRACT

LESSA MM. *Clinical, immunological and therapeutic aspects of mucous leishmaniasis* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

Mucosal leishmaniasis (ML) is predominantly caused by *Leishmania braziliensis*. The disease is characterized by the development of lesions mainly in the nasal mucosa and, in more severe forms, can lead to significant tissue destruction. There is no standard method for grading the severity of disease. An exacerbated inflammatory response has been associated with the presence of destructive and disfiguring lesions. As *Leishmania* is an intracellular parasite, most immunological studies have emphasized the cell-mediated immune response, while relatively few studies aimed to investigate the role of antibodies in protection against, or the pathology of ML. Therapeutic failure occurs in up to 42% of cases. Patients who experience treatment failure will require more than one pentavalent antimony (Sb^V) course or alternative drugs to achieve a cure. Although speech therapy intervention can help patients with ML sequelae and dysphonia, there is only one study on speech therapy in these cases. Four different studies were carried out with the objectives of: proposing a clinical staging for nasal disease; correlating antibody titers with mucosal disease severity; evaluating the role of pentoxifylline associated with conventional therapy with pentavalent antimony in the treatment of ML; characterize the voice and verify the vocal response to speech therapy intervention in patients with sequelae of ML. In study 1, we categorised fifty patients with ML according to a proposed clinical staging system; the different degrees of evolution of mucosal disease, from the initial stage to the more severe long-term cases, enabled ML to be graded into five stages. In study 2, twenty-seven patients with a confirmed diagnosis of ML were classified according to clinical staging criteria; serum levels of *Leishmania*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibodies were determined by ELISA; patients in stages IV and V produced higher concentrations of total IgG and IgG1 antibodies when compared to those in stage I and II. In study 3, a double-blind, placebo-controlled trial involving 23 patients with ML evaluated the efficacy of pentoxifylline when administered in association with Sb^V, compared with Sb^V treatment alone; eleven patients were randomized to receive Sb^V plus oral pentoxifylline for 30 days, and 12 patients received Sb^V plus oral placebo during the same period; the criterion for cure was a complete healing of lesions; all patients in the pentoxifylline group experienced a cure with 1 course of Sb^V, whereas 5 (41.6%) of 12 patients in the placebo group required a second course of Sb^V (P=0,037); the healing time \pm standard deviation in the pentoxifylline group was 83 \pm 36 days, compared with 145 \pm 99 days in the placebo group (P=0,049). In study 4, phonation /a:/ was collected from 44 patients with ML and CL for

perceptual voice analysis and computed acoustic; it was observed a statistically significant association of grade 2 asthenia (27.7%) in patients with ML. These proposed stages may be useful in characterising the severity of the lesion and optimising the therapeutic outcome. Our data demonstrate an association between IgG antibody titers and the severity of mucosal disease. The addition of pentoxifylline to Sb^v in ML reduces the healing time significantly and prevents the need for further courses of Sb^v. Finally, even without the presence of laryngeal lesions sequelae, patients with ML may present vocal disorders caused by sequelae of nasal lesions or in other locations, and the speech therapy intervention benefits the voice of these patients.

Descriptors: *Leishmania braziliensis*; Leishmaniasis; Mucocutaneous leishmaniasis; Nasal mucosa; Voice disorders; Speech therapy; Antibodies; Antibody, IgG; Therapeutics.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) representa um conjunto de doenças com características clínicas imunológicas e patológicas distintas, cuja expressão depende de fatores relacionados ao hospedeiro e ao parasita. Mais de uma dezena de espécies de *Leishmania* são capazes de causar a leishmaniose tegumentar. No Brasil, os principais agentes causais da LTA são a *Leishmania Viannia braziliensis* (*L. braziliensis*), a *Leishmania Viannia guyanensis* (*L. guyanensis*) e a *Leishmania Mexicana amazonensis* (*L. amazonensis*), apresentando quatro formas clínicas bem reconhecidas: a leishmaniose cutânea, a leishmaniose mucosa, a leishmaniose cutânea difusa e a leishmaniose disseminada (Zajtchuk et al., 1989; Guimarães et al., 2005).

A Organização Mundial de Saúde considera a leishmaniose uma das seis mais importantes doenças infecciosas, não só pela alta incidência e ampla distribuição geográfica da doença, mas, pela possibilidade de assumir formas que determinem lesões destrutivas, desfigurantes e até incapacitantes com grande impacto na qualidade de vida do indivíduo (OMS, 2015).

Estima-se em 12 milhões o número de pessoas acometidas pela leishmaniose em 88 países de quatro continentes distintos, como: Ásia, África, Europa e América (Alvar et al., 2012). A leishmaniose mucosa é considerada uma forma grave de leishmaniose tegumentar, estima-se que,

aproximadamente que dentre 1 a 10% dos casos de *Leishmania braziliensis* desenvolvam lesões mucosas, seja concomitantemente ou após resolução da doença cutânea (Costa et al., 2014). Habitualmente, a transmissão se faz por meio da picada de várias espécies de flebotomídeos, e a propagação da doença, desde a lesão cutânea até a mucosa nasal, pode verificar-se por via linfática, hematogênica ou por inoculação provocada pelo toque digital, acometendo predominantemente adultos do sexo masculino (Marsden et al., 1994; Lessa et al., 2007; Costa et al., 2014).

No Brasil, a LTA é registrada em todos os estados, sendo endêmica na Bahia, onde é causada sobretudo por *Leishmania braziliensis*, com um espectro de manifestações clínicas, imunológicas e histopatológicas, que vão desde lesões cutâneas localizadas a lesões destrutivas em mucosa. A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum de LTA e é caracterizada pela presença de úlcera na pele, com bordos elevados e base granular, dolorosa, que cura espontaneamente ou após tratamento com antimoniais (Costa et al., 2014). A lesão mucosa caracteriza-se por destruição tecidual e resposta inflamatória abrangente. Uma característica peculiar às lesões mucosas na leishmaniose tegumentar é a dificuldade em identificar o parasito *in situ*, em razão da baixa quantidade, ainda menor que a encontrada em lesões cutâneas (Gutierrez et al., 1991; Jara et al., 2013), o que pode dificultar o diagnóstico, ou mesmo serem equivocadamente diagnosticadas, como outras lesões benignas ou malignas que acometem tecidos mucosos (Costa et al., 2014).

A forma clássica da leishmaniose mucosa (LM) ocorre secundariamente à lesão cutânea, em cerca de 85% dos casos, geralmente após semanas ou anos da lesão cutânea, mesmo que essa tenha sido curada. Mas nos outros 15%, o acometimento mucoso é primário, ou seja, sem história prévia ou concomitante de lesões cutâneas (Lessa et al., 2007; Costa et al., 2014). Nesses casos, é possível que tenha ocorrido uma forma subclínica da doença cutânea anteriormente, ou que a penetração da *Leishmania* tenha ocorrido no plano do lúmen, na transição cutaneomucosa (Lessa et al., 2007). A leishmaniose com manifestação mucosa acomete primordialmente a mucosa nasal, em mais de 90% dos casos (Lessa et al., 2007), porém é possível encontrar lesões em outras regiões de mucosa do trato aéreo superior, isoladas ou concomitantes às lesões nasais, em até 37,9% dos casos, especialmente na mucosa oral, comprometendo sobretudo o palato, úvula e tonsilas (Costa et al., 2014).

As principais manifestações otorrinolaringológicas caracterizam-se por: lesões granulomatosas em porção anterior do septo nasal cartilaginoso, cabeça de concha inferior e assoalho da fossa nasal; crostas hemáticas; perfuração do septo cartilaginoso; infiltração edematosa da pirâmide nasal, conferindo o aspecto de “nariz de tapir” ou “anta”; destruição total da columela e queda da ponta do nariz (Lessa et al., 2007).

Em razão da diversidade de envolvimento da mucosa e da variabilidade da extensão deste envolvimento, pacientes com leishmaniose mucosa (LM) têm apresentação clínica diferente e respostas terapêuticas distintas na dependência do grau das lesões. Desta forma, tanto para

estudos clínicos e histopatológicos, como para avaliação de resposta ao tratamento, faz-se necessário que sejam padronizados os diversos estágios da doença.

Os sintomas mais precoces na LM são de obstrução nasal, crostas hemáticas e epistaxe. Queixas como odinofagia, disfagia e disfonia dependem da área acometida pela LM, como o nariz, a boca, a faringe e a laringe (Lessa et al., 2007; Ruas et al., 2014). A disfonia, uma das queixas relatadas por esses pacientes, pode impactar significativamente na qualidade de vida em razão do comprometimento da comunicação, o que, conseqüentemente, afeta as relações sociais e profissionais (Spina et al., 2009). Embora a intervenção fonoterapêutica possa ajudar nesses pacientes com LM e disfonia, há apenas um estudo sobre a terapia fonoaudiológica nesses casos (Ruas, 2014).

A resposta imunológica na leishmaniose mucosa (LM) vem sendo amplamente estudada. Sabe-se que a resposta imune tanto na LM como na LC é predominantemente Th1, com uma produção exacerbada de IFN- γ e TNF. A modulação dessas citocinas pela ação do IL-10 ou TGF- β ou pelos anticorpos neutralizantes de IL-12 e IL-15, parece falhar (Bacellar et al., 2002; Faria et al., 2005; Carvalho et al., 2007). As citocinas IFN- γ e TNF são importantes para ativação de macrófagos e controle de multiplicação de parasitos, porém a produção exacerbada destas citocinas não é capaz de controlar a infecção e contribui para o dano tecidual patológico (Ribeiro-de-Jesus et al., 1998; Carvalho et al., 2012). Estudos vêm mostrando a

importância da resposta inflamatória na destruição tecidual na leishmaniose tegumentar.

Ao contrário do grande número de estudos que vêm avaliando o papel das células T e de macrófagos na patogênese da leishmaniose tegumentar, os estudos com relação à resposta imune humoral são sobretudo relacionados com a utilização da sorologia para o diagnóstico da LTA (Singh, 2006). Estudos prévios têm mostrado uma forte resposta imune e mal modulada do tipo Th1 na LM, com alta produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IFN- γ , porém com redução da habilidade de citocinas, como IL-10 e TGF- β , em modular a resposta imune (Bacellar et al., 2002). Todavia não há estudos avaliando o papel dos anticorpos na patogênese e gravidade da LM.

O antimônio pentavalente (Sb^v) é a droga de escolha no Brasil para o tratamento das leishmanioses por *L. braziliensis*. É administrado por via parenteral com potencial efeito cardiotoxico, toxicidade renal e comprometimento ósseo-articular (Franke et al., 1990). A droga alternativa em pacientes idosos, nos casos de resistência ou intolerância ao Sb^v, é a Anfotericina B.

A pentoxifilina é uma droga imunomoduladora e com efeitos hemorreológicos cuja ação supressora de TNF vem sendo amplamente estudada. A pentoxifilina mostrou-se efetiva no tratamento do eritema nodoso hansênico (de Carsalade et al., 2003). Em um estudo com pacientes infectados com HTLV-1, o uso da pentoxifilina reduziu os níveis *in vitro* de TNF e IFN- γ (Luna et al., 2011). Em pacientes com LM e LC, a associação

da pentoxifilina ao antimônio pentavalente reduziu o tempo de cura e as taxas de falha terapêutica (Sadeghian; Nilforoushzadeh, 2006) e curou pacientes previamente refratários ao tratamento com antimônio isolado (Lessa et al., 2001). Possivelmente, a eficácia da pentoxifilina esteja vinculada a seu efeito modulador na resposta imune. Baseado nas informações que sugerem que o TNF- α participa da patogênese da leishmaniose mucosa (LM), faz-se necessário um estudo combinando a terapia convencional com antimônio pentavalente e o uso da pentoxifilina em pacientes com LM.

No presente estudo, foi feito uma compilação de estudos realizados e publicados por nosso grupo de pesquisa em LTA ligado ao Laboratório de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia (HUPES/UFBA), com a finalidade de sistematizar criticamente parte de nossa produção científica.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

- A) Caracterizar clinicamente os pacientes com leishmaniose mucosa e propor um estadiamento clínico à doença nasal.

- B) Correlacionar os títulos de anticorpos com a gravidade da doença mucosa.

- C) Avaliar o papel da Pentoxifilina associada à terapia convencional com antimônio pentavalente no tratamento da leishmaniose mucosa.

- D) Caracterizar a voz e verificar a resposta vocal à intervenção fonoterapêutica nos pacientes com seqüela de leishmaniose mucosa.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ASPECTOS GERAIS

O termo leishmaniose refere-se à infecção de hospedeiros vertebrados com os protozoários do gênero *Leishmania*, os quais, como os outros tripanossomatídeos da ordem Kinetoplástida apresentam, caracteristicamente, um DNA extranuclear em seu citoplasma em uma organela mitocondrial, o cinetoplasto. Este gênero caracteriza-se por apresentar duas formas evolutivas durante seu ciclo biológico nos organismos hospedeiros: amastigota, que é parasito obrigatório intracelular em vertebrados, e promastigota, desenvolvendo-se no tubo digestivo dos vetores invertebrados ou em meios axênicos de cultura (Lessa et al., 2007). Primeiramente, as leishmanioses são infecções zoonóticas, afetando outras espécies que não o homem, o qual pode ser envolvido secundariamente, podendo mesmo a transmissão inter-humana ser eventualmente predominante ou exclusiva. Habitualmente, a transmissão se faz pela picada de várias espécies de flebotomídeos, pertencentes a diferentes gêneros (*Phlebotomus*, *Lutzomya*), dependendo da localização geográfica (Lessa et al., 2007).

3.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E TAXONOMIA

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) encontra-se situada entre as grandes endemias existentes no Brasil e na América Latina. As leishmanioses têm ampla distribuição, sendo documentadas na África, Europa, Ásia e América (OMS, 2015). Existe uma grande variedade de espécies do gênero da *Leishmania*, e que as espécies envolvidas na LTA são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) peruniana*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) naiffi*, *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) pífanói*, *L. (L.) venezuelensis*.

No Brasil, já foram identificadas sete das espécies acima descritas, sendo seis do subgênero *Viannia* e um *Leishmania*, e as três principais espécies mais encontradas no País são: *L. (Leishmania) amazonenses*, *L. (Viannia) braziliensis* e *L. (Viannia) guyanensis*. A maioria das espécies encontradas no Brasil está limitada à Região Norte do País; enquanto *L. braziliensis* e *L. amazonensis* apresentam ampla distribuição pelo território nacional (Grimaldi et al., 1987; Lainson, Shaw, 1992).

O perfil da LTA está mudando no Brasil em razão da expansão do homem para áreas endêmicas florestais de uma zoonose transmitida acidentalmente ao homem para uma doença de interface rural-urbana. Além disso, vem se observando que a LTA cada vez mais deixa de ser uma endemia que se concentrava apenas em áreas rurais, com expansão e avanço para áreas periurbanas e urbanas, como áreas de desmatamentos

florestais e matas fechadas para construção de estradas, extração de madeira e ecoturismo (Basano, Camargo, 2004; Shaw, 2007).

A LTA vem sendo registrada em todas as regiões do País e, atualmente, todos os estados já apresentam registros dessa enfermidade, sendo as regiões Norte e Nordeste as que concentram a maior parte dos casos registrados, em torno de 75%. O Norte do Brasil foi a região que apresentou o maior coeficiente, 99,8/100.00 habitantes (Brasil, Ministério da Saúde, 2007). O Nordeste representa 39% dos casos de LTA no País, sendo os estados da Bahia, Ceará e Maranhão os mais acometidos (Oliveira; Lacerda, 2004).

No Estado da Bahia, a LTA incide em todas as regiões, estando presente em 231 municípios (Brito et al., 2009). As espécies de *Leishmania* causadoras de LTA na Bahia são a *L. (L.) amazonensis* e a *L. (V.) braziliensis*, sendo esta última a espécie mais encontrada (Gontijo; Carvalho, 2003).

A média anual de casos no período entre 2012 e 2014 no estado da Bahia foi 3.281,7 notificações e o coeficiente de detecção médio de 19,5 casos/100.000 habitantes. Os maiores coeficientes de detecção de cada 100.000 habitantes nesse período foram observados nos municípios de Taperoá (1881), Wenceslau Guimarães (976) e Teolândia (963) (Bahia, Secretaria de Saúde, 2015). A população dessas cidades com esses maiores índices é atendida em um centro de referência em leishmaniose tegumentar, denominado Corte de Pedra, que atende a pacientes de mais

de 20 municípios da região, com uma área de, aproximadamente, 10.000 km².

O posto de saúde de Corte de Pedra está situado no município de Tancredo Neves, sendo um centro de referência para atendimento de pessoas com LTA, e recebe cerca de 500 a 1.300 pacientes com essa doença anualmente (Jirmanus et al., 2012).

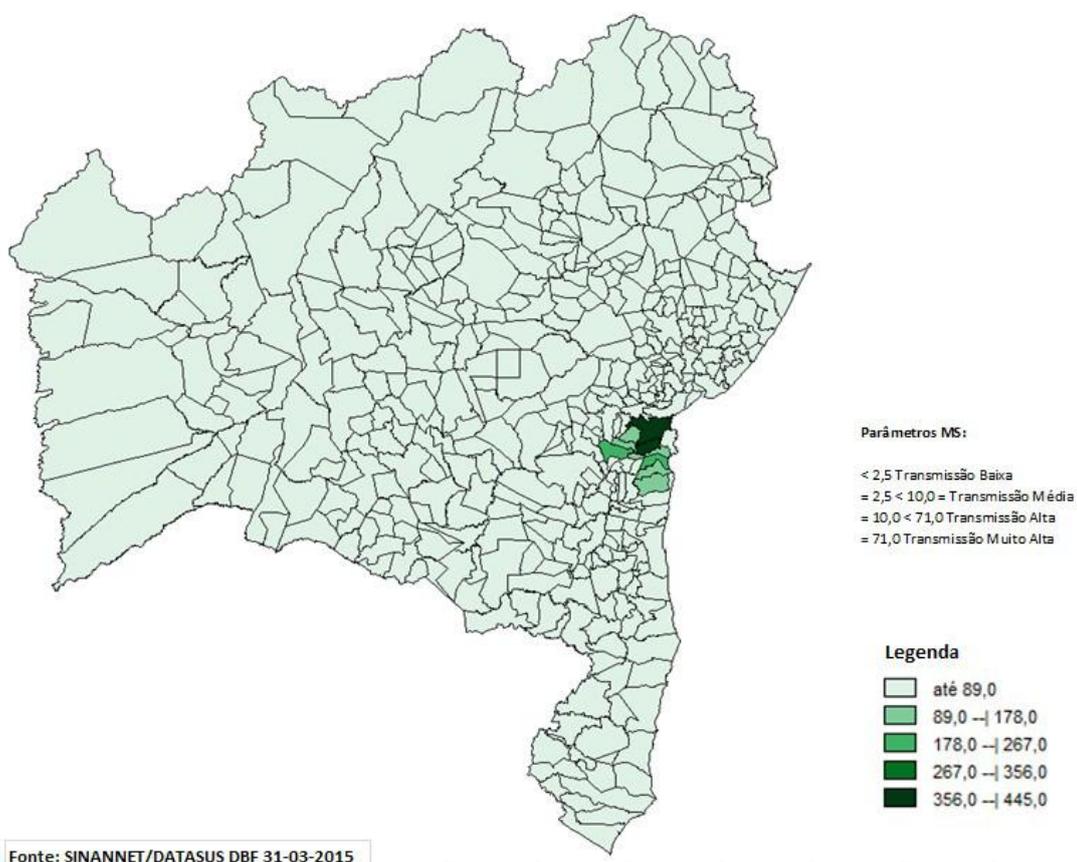


Figura 1 - Distribuição dos municípios, conforme classificação de risco da Leishmaniose Tegumentar Americana, Bahia, 2012- 2014

3.3 ASPECTOS CLÍNICOS

O resultado da infecção por *Leishmania* depende de várias características biológicas do hospedeiro e da cepa infectante do parasita. Vários estudos epidemiológicos indicam que a leishmaniose ocorre com mais frequência entre homens adultos do que entre mulheres (Jones et al., 1987; Weigle et al. 1993; Armijos et al., 1997). Não está claro se essa diferença deve-se apenas a riscos diferentes de exposição em razão das atividades distintas de homens e mulheres ou se as diferenças relacionadas ao gênero na resposta imune do hospedeiro desempenham um papel na resistência e suscetibilidade à infecção (Travi et al., 2002). A taxa de doença por leishmaniose tegumentar, em uma área do Brasil, onde a doença é endêmica mostrou-se 50% maior em homens do que mulheres em todas as faixas etárias, incluindo crianças, que devem ter riscos comparáveis de exposição para ambos os sexos (Jones et al., 1987).

A LC é a forma mais comum de apresentação da LTA. Após um período de incubação, que pode variar de 2 semanas a 2 anos (média de 2 a 3 meses), os pacientes com LC em sua forma clássica desenvolvem uma úlcera indolor, bem delimitada, arredondada, com bordas elevadas e fundo com granulações grosseiras. As lesões podem ocorrer em qualquer lugar do corpo, mas, habitualmente, aparecem no local de inoculação do parasito, comumente membros inferiores ou superiores, podendo curar espontaneamente (Llanos Cuentas et al., 1984; Bittencourt, Barral, 1991). Na LTA causada pela *L. braziliensis*, pode ocorrer um aumento de gânglios

linfáticos próximos ao local de inoculação do parasito, dias ou semanas antes do aparecimento das lesões cutâneas. Como a maioria das úlceras causadas pela *L. braziliensis* são em membros inferiores, a maioria destes linfonodos é detectada em região inguinal, crural e menos, frequentemente, em região poplíteia. Em membros superiores, são comuns os gânglios epitrocleanos e axilares. A linfadenopatia é, habitualmente, indolor e, normalmente, regride em semanas, porém em pacientes com úlceras cutâneas com mais de 2 meses de duração, a linfadenopatia pode ainda ser observada (Barral et al., 1995). Aproximadamente, 12% dos indivíduos são assintomáticos ou subclínicos em áreas endêmicas (Follador et al., 2002). Em média, entre 3 e 5% dos pacientes com LC causadas pela *L. braziliensis* desenvolvem a forma mucosa da doença (Jones et al., 1987; Marsden et al., 1994; Gontijo, Carvalho, 2003).

Além da forma cutânea clássica e da forma mucosa, duas outras formas clínicas de leishmaniose tegumentar são bem conhecidas: a leishmaniose cutânea disseminada e a leishmaniose cutânea difusa. Em ambas as formas, existem múltiplas lesões; mas, as diferenças clínicas, histopatológicas e imunológicas diante destas condições são nítidas.

A leishmaniose disseminada (LD) é uma forma relativamente rara da LTA, sendo observada em, aproximadamente, 2% dos pacientes com infecção causada pela *L. braziliensis*. Esta apresentação é caracterizada pela presença de, pelo menos, 10 lesões cutâneas acneiforme, papular ou ulceradas, em, pelo menos, duas partes do corpo (Turetz et al., 2002). Nesta forma peculiar da LTA, lesões de mucosa são observadas entre 30 e 40%

dos pacientes. Estes pacientes apresentam características clínicas e imunológicas peculiares (Carvalho et al., 1994; Turetz et al., 2002).

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) é uma forma clínica rara e grave da LTA, causada no Brasil apenas pela *L. amazonensis*. Ocorre em pacientes com deficiência na resposta imune celular contra os antígenos da leishmania, sendo, portanto, negativo o teste de intradermoreação. O paciente com LCD apresenta placas extensas e múltiplas lesões não ulceradas. Habitualmente, esses pacientes não apresentam lesão mucosa associada (Sher et al., 1992; Ministério da Saúde do Brasil, 2007; OMS, 2010). O achado histopatológico é caracterizado por um infiltrado de macrófagos repletos de Leishmania (Bryceson, 1970).

A leishmaniose mucosa (LM) é uma forma agressiva de apresentação da LTA, podendo cursar com importante deformidade facial e repercussões funcionais, como alteração da deglutição, fonação e até mesmo respiração (Marsden, 1986, Grant et al., 1994; Di Lella et al., 2006; Amato et al., 2008). A LM clássica manifesta-se, habitualmente, secundária a lesões cutâneas, ocorrendo meses ou até mesmo anos, após uma lesão cutânea primária (Marsden, 1986), ou concomitante a ela (Boaventura et al., 2006). Em alguns casos, a LM pode ser primária, sem antecedente de lesão prévia ou lesão cutânea concomitante (Marsden et al., 1994; Lessa et al., 2007; Al-Qahtani, et al., 2012). A maioria dos pacientes com LC (90%) que evoluem para LM, desenvolvem as lesões mucosas dentro de 10 anos. Destes, 50% ocorrem nos primeiros 2 anos após a cicatrização das lesões cutâneas (Marsden et al., 1994; Brasil, Ministério da Saúde, 2007). Os principais fatores de risco

para o desenvolvimento da LM em pacientes com lesões cutâneas são: presença de lesões acima da cintura pélvica, sobretudo na face, úlceras cutâneas de grande tamanho e tratamento inadequado da leishmaniose cutânea (Llanos-Cuentas et al., 1984; Weigle, Saravia, 1996; Machado-Coelho et al., 2005).

A leishmaniose mucosa (LM) acomete sobretudo a mucosa nasal (90% dos pacientes), seguida da mucosa faríngea, laringe e boca. Entretanto, a frequência de acometimento desses sítios mucosos varia a depender do estudo (Marsden, 1984; Jones et al., 1987; Grant et al., 1994; Falqueto et al., 2003; Costa et al., 2014). Outros sítios mais raros de envolvimento mucoso são os órgãos genitais (Osorio et al., 2009).

Em 1936, Barbosa já chamava a atenção para esta doença, com o levantamento de dados estatísticos sobre os casos de leishmaniose da mucosa das vias aéreas superiores, observados no Serviço de Otorrinolaringologia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. Tendo localização preferencial a nível da mucosa do septo nasal cartilaginoso e porções mais anteriores das fossas nasais, conchas inferiores e por contiguidade o próprio assoalho, os sinais e sintomas mais precoces na LM são de obstrução nasal, crostas hemáticas, epistaxe e o estabelecimento de granuloma no septo nasal anterior (Lessa et al., 2007). A princípio, há hiperemia e edema da mucosa do septo anterior, com o estabelecimento de nodulações. Nesta fase, o paciente apresenta corrimento nasal (coriza) e, em poucos dias ou meses, pode ocorrer a perfuração do septo. A pele do nariz torna-se espessada, edemaciada e hiperemiada, acarretando o

aumento de volume da pirâmide nasal. O paciente passa a apresentar uma face leishmaniótica, conhecida como "nariz de tapir" ou "nariz de anta". Posteriormente, pode haver comprometimento de todo o nariz, lábio superior, palato e faringe, provocando graves deformidades e mutilações, impedindo a alimentação, dificultando a respiração e a fonação (Lessa, 1999). Habitualmente, o ouvido não é afetado na leishmaniose mucosa. Entretanto o envolvimento da mucosa da rinofaringe leva ao comprometimento do orifício faríngeo da trompa de Eustáquio, situada em sua parede lateral. Nestes casos, pode-se estabelecer um processo de otite média com efusão (otite média secretora crônica). A sensação de ouvido tapado, zumbidos e disacusia são queixas nestes casos (Lessa, 1994).

A razão pela qual indivíduos infectados por *Leishmania* podem apresentar envolvimento da mucosa, não é de todo conhecida. A associação da infecção por *L. braziliensis* com esta forma da doença sugere que, além do hospedeiro, fatores relacionados ao parasito sejam relevantes ao desenvolvimento da doença mucosa. A frequência da doença mucosa é variável dentro da mesma área endêmica. Enquanto, em 1987, a leishmaniose mucosa foi descrita, somente, em 3% dos pacientes em Três Braços-Ba, com doença cutânea (Jones, 1987), Netto et al. (1990) documentaram doença mucosa em 19% dos pacientes desta mesma região. Acredita-se que a ocorrência de leishmaniose clinicamente manifesta esteja na dependência de fatores inerentes ao parasito, da resistência natural do hospedeiro e da magnitude de sua resposta imunológica (Carvalho et al., 1994). No homem, a propagação da doença, desde a lesão cutânea até o

nariz, pode verificar-se por via linfática, hematogênica ou por autoinoculação provocada pelo toque digital sobre a mucosa nasal. Sabe-se, por outro lado, que a área do novelo vascular no plano do septo nasal anterior, zona de Kiesselbach, oferece condições favoráveis ao desenvolvimento das formas amastigotas e, conforme alguns autores, a temperatura mais baixa no plano do nariz e das zonas de passagem do bolo alimentar favorecem ainda mais a instalação da leishmania nestas regiões (Scott, 1985). A associação de baixa temperatura com leishmaniose pode, em parte, ser explicada pela documentação *in vitro* de que macrófagos cultivados na temperatura de 29°C têm menor capacidade de destruir leishmania do que macrófagos cultivados a 33°C (Scott, 1985).

3.3.1 Leishmaniose mucosa e disfonia

Sequelas das lesões de LM como retração da pirâmide nasal, perfuração do septo nasal, perfuração e/ou retração do palato e destruição da úvula podem interferir nas funções de deglutição, respiração, fala e vocalização (Ruas et al., 2014). Durante o Quadro de LM, as pregas vocais podem apresentar boa movimentação, entretanto a fonação pode ser fraca e o controle muscular de tensão pode estar prejudicado por fibrose cicatricial. Mesmo o tratamento da LM ocorrendo de forma satisfatória, muitas vezes, a voz pode não retornar ao normal (Neto et al., 2008), sendo de suma importância a atuação com a reabilitação fonoaudiológica (Marsden, 1986; Ruas et al., 2014).

Ruas et al. (2014), mostraram que 88,5% dos participantes com LM apresentaram alteração da qualidade vocal. Tanto os pacientes com lesão

na laringe como os com lesão na cavidade oral e faringe tinham queixa de disfonia e apresentavam alteração vocal. Também foi realizada fonoterapia, após a resposta favorável ao tratamento medicamentoso da leishmaniose, em que se verificou melhora estatisticamente significativa nos parâmetros de grau geral da rouquidão, rugosidade, soprosidade, tensão, *Shimmer* e Tempo Máximo de Fonação (TMF). Contudo, cinco pacientes continuaram com alteração vocal após a terapia, e os autores creditaram isso à associação de mais um sítio de lesão mucosa. Além disso, entre os pacientes do estudo havia tabagistas e etilistas, participantes com hipertensão, diabetes, tuberculose, hanseníase e com síndrome de imunodeficiência humana, o que pode ter sido fator de contribuição para manutenção da disfonia.

3.4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da leishmaniose é baseado em dados epidemiológicos, exame clínico e resultados de exames laboratoriais. O diagnóstico parasitológico pode ser realizado por meio de métodos diretos ou indiretos. A pesquisa direta das formas amastigotas em material obtido da biópsia ou aspirado das lesões é realizada pela coloração Giemsa ou Leishman. Os fragmentos cutâneos obtidos por biópsia ou por punção podem ser inoculados em meios de cultivo NNN – Neal, Novy e Nicolle (agar sangue modificado). A pesquisa direta pela microscopia e a cultura isoladamente

apresentam relativa baixa sensibilidade (Goto; Lindoso, 2010), porém a combinação dos métodos aumenta a sensibilidade diagnóstica em até 85% (Murray et al., 2005). A reação em cadeia de polimerase (PCR) é um método molecular com boa sensibilidade para os diagnósticos de LM e LC, que detectam o DNA da leishmania mesmo com a carga parasitária baixa e que, assim como a cultura, permitem a identificação da espécie da Leishmania (Goto; Lindoso, 2010). Por serem exames laboratoriais tecnicamente mais difíceis, cultura e PCR não são utilizados rotineiramente na prática clínica de países em desenvolvimento (Murray et al., 2005). Na avaliação indireta, métodos imunológicos são usados. A intradermoreação de Montenegro (IDRM) fundamenta-se na visualização da resposta de hipersensibilidade celular retardada. É realizada por meio da aplicação intradérmica do antígeno da Leishmania (0,1-0,2 ml) e a leitura é feita após 48-72 h. Caracteriza-se positivo, quando há formação de pápula maior que 5 mm. Não diferencia infecção prévia de atual, e pode ser positiva em quase 100% dos pacientes com LM (Shaw, Lainson, 1975; Goto, Lindoso, 2010). Os testes sorológicos detectam anticorpos anti-Leishmania circulantes no soro dos pacientes com títulos geralmente baixos. As técnicas de ELISA (Ensaio Imuno Enzimático) e a Imunofluorescência indireta não são rotineiramente utilizadas em razão da variável e relativa baixa sensibilidade e da possibilidade de reação cruzada com outras infecções. As lesões mucosas apresentam títulos mais altos e persistentes que as lesões cutâneas (Murray et al., 2005; Brasil, Ministério da Saúde, 2007; Goto; Lindoso, 2010).

O diagnóstico diferencial da LM pode ser feito com outras doenças granulomatosas, tais como a blastomicose (*Paracoccidioides braziliensis*), lepra (doença de Hansen) e tuberculose, todas estas também localizadas no plano do septo nasal anterior. O grau de reação do tecido conectivo na infecção pela *L. braziliensis* é digno de nota. A fibrose cicatricial marcada por cordões esbranquiçados no processo de cicatrização das lesões mucosas distingue esta das demais granulomas nasais anteriores (Lessa, 1999).

3.5 IMUNOLOGIA E LEISHMANIOSE MUCOSA

Por ser a *Leishmania* um parasita intracelular, o papel das respostas inatas e das células T na patogênese da doença vem sendo amplamente estudado. Os linfócitos de pacientes com LM mostraram-se mais proliferativos do que os de pacientes com LC, quando estimulados com antígenos de *Leishmania* (Carvalho et al., 1985). Foi observado que a produção de citocinas/quimiocinas por macrófagos e células T, como TNF, IFN- γ e CXCL9 é maior na LM em comparação com a LC (Bacellar et al., 2002; Pedras et al., 2003).

O comprometimento dos mecanismos regulatórios que podem atenuar a resposta imune também desempenha um papel importante na resposta inflamatória exagerada observada na LM, uma vez que as células dos pacientes com LM produzem menos IL-10 a seu receptor do que as dos pacientes com LC (Bacellar et al., 2002). Agentes que afetam sobretudo o

sistema imunológico, como o fator estimulador de colônias de granulócitos/macrófagos e pentoxifilina, aceleram o tempo de cicatrização da leishmaniose cutânea (Almeida et al., 1999; Santos et al., 2004)

As células Th1 induzem respostas de anticorpos dominadas pela imunoglobulina IgG2, enquanto as células Th2 favorecem a síntese de imunoglobulinas IgG1, IgE e IgA (Coffman, Carty, 1986; Finkelman et al., 1988).

Pacientes com LC localizada apresentam uma resposta do tipo Th1, com produção de IFN- γ e IL-12, com predominância das imunoglobulinas do tipo IgG1, IgG2, IgG3 e alta frequência de células B (O'Neil et al., 1993). Nos pacientes com LM, a proliferação linfocitária com produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , INF- γ é mais elevada que na LC (Bacellar et al., 2002).

O papel dos anticorpos na leishmaniose não foi completamente elucidado (Trujillo et al., 1999; Souza et al., 2005). Altos níveis de anticorpos são produzidos em todas as formas clínicas de leishmaniose, e altos níveis de anticorpos IgG e IgE são encontrados na LM (Pedras et al., 2003). Anticorpos podem participar da patologia das leishmanioses por dois mecanismos. Pela opsonização do parasito e, conseqüentemente, aumento da penetração de parasitas nos macrófagos, com conseqüente aumento da carga parasitária, ou pela citotoxicidade mediada por anticorpos, destruindo macrófagos e células teciduais expressando antígeno de *Leishmania* (Barral-Netto et al., 1995).

3.6 TRATAMENTO

3.6.1 Antimônio pentavalente

Os antimoniais pentavalentes (Sb^V) são as drogas de escolha no tratamento das leishmanioses. Atualmente, existem dois tipos de antimoniais pentavalentes, o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostan®) (Franke et al., 1990). Na maioria das regiões do Brasil, a droga de escolha é o Glucantime® (Brasil, Ministério da Saúde, 2007). Os mecanismos de ação dos antimoniais pentavalentes ainda não foram completamente esclarecidos. A droga parece penetrar nas células parasitárias, após redução intracelular para antimonial trivalente e exerce seu efeito leishmanicida (Ephros et al., 1999). Os efeitos colaterais mais comuns são artralgia, mialgia, náuseas e vômitos, elevação das escórias nitrogenadas e das enzimas hepáticas e alterações eletrocardiográficas (Amato et al., 2007). Tontura vem sendo reportada, como um possível efeito colateral do Glucantime®, sobretudo em mulheres, acima de 60 anos ou em pacientes com lipase sérica aumentada (Araújo Melo et al., 2010). A dose recomendada na LM é de 20 mg/kg/dia do antimônio pentavalente (no máximo 1.215 mg/dia), via endovenosa ou intramuscular (Berman, 1988). As taxas de falha terapêutica variam entre 10 e 40% na LC e entre 10 e 70% na LM, a depender do país do estudo e da dosagem utilizada (Franke et al., 1990; Franke et al., 1994; Oliveira-Neto et al., 1997a, b, 2000; Romero et al., 1998; Amato et al., 2007). Em um estudo epidemiológico realizado pelo nosso grupo, com 327 pacientes provenientes da área endêmica para *L.*

braziliensis de Corte de Pedra, com diagnóstico de LM, a taxa de falha terapêutica para o tratamento com o antimônio pentavalente foi 28,5% (Cincurá et al., 2017). Nos pacientes com LM, se não houver cicatrização completa em até 12 semanas, após o término do tratamento, o esquema deverá ser repetido apenas uma vez. Em caso de não resposta, deve ser utilizada uma das drogas de segunda escolha (Brasil, Ministério da Saúde, 2007). A maioria dos casos de falha terapêutica deve-se a utilização de subdoses (<10 mg/kg/dia), tratamento por um curto período de tempo e a impossibilidade de exceder a dose máxima de três ampolas em pacientes pesando mais de 68kg (Rodrigues et al., 2006).

A despeito do uso adequado do antimonial, outros fatores relacionados ao hospedeiro e ao parasito influenciam na resposta terapêutica (Rojas et al., 2006). A resposta ao antimonial varia, de acordo com a espécie da leishmania (Arevalo et al., 2007). Os mecanismos associados à resistência primária podem ser diversos e ainda estão sob investigação, mas parece existir variações nas concentrações inibitórias mínimas da droga a depender da espécie do parasito (Berman et al., 1989; Amato et al., 2008). Um grupo de glicoproteínas chamado proteoglicanos é superexpressado na superfície de promastigotas e amastigotas de *L. donovani* resistentes ao antimonial na Índia (Das Gupta et al., 1991; Samant et al., 2007). O exato papel dos proteoglicanos no mecanismo de resistência ao antimonial ainda é desconhecido. Fatores do hospedeiro também influenciam na resistência. Pacientes com LCD, a forma anérgica da LTA, apresentam redução da resposta Th1 com falha a qualquer tipo de terapia

(Carvalho et al., 2012). A associação de IFN- γ ao antimonial aumenta o índice de cura nos casos de leishmaniose visceral (LV) (Badaró et al., 1990).

3.6.2 Anfotericina B

A anfotericina B é considerada droga de segunda escolha no Brasil, sendo usada na falha de tratamento ao antimonial pentavalente ou quando o paciente apresenta alguma contraindicação para o uso dessa droga (Brasil, Ministério da Saúde, 2007). A anfotericina B age no ergosterol presente na membrana da *Leishmania*, aumentando a permeabilidade na membrana celular, tanto nas formas promastigotas e amastigotas, levando à morte parasitária (Ellis, 2002). Existem quatro formulações da Anfotericina B: Anfotericina lipossomal (Ambisome®), Anfotericina colessterol sulfato (Amphocil®), Anfotericina complexo lipídico (Abelcet®) e a Anfotericina desoxicolato (Fungizon®) (Golenser, Domb, 2006). Esta última formulação é a clássica e a mais utilizada no Brasil, em razão de sua eficácia e relativo baixo custo (Goto, Lindoso, 2010). As formulações apresentam eficácia semelhante, porém a Anfotericina B desoxicolato apresenta mais efeitos colaterais, podendo levar à insuficiência renal (Adler-Moore, Proffitt, 2002; Amato et al., 2008; Goto, Lindoso, 2010). A dose sugerida da Anfotericina desoxicolato no tratamento da LM é, em média, 1mg/kg/dia até uma dose total cumulativa entre 2,5 e 3g (Brasil, Ministério da Saúde, 2007; Goto, Lindoso 2010; OMS, 2010). Já as formulações lipídicas possuem boas respostas terapêuticas para doses entre 2 a 3mg/kg/dia por pelo menos, 20 dias. (Nonata et al.,1997). Os efeitos colaterais associados sobretudo à

fórmula desoxicolato são hipertermia, calafrios, inapetência, náuseas, flebite, anemia, alteração da função renal, hipocalcemia e alterações eletrocardiográficas. Na LM, a Anfotericina B apresenta índice de cura maior que o antimonial (Amato et al., 2007).

3.6.3 Pentamidina

A pentamidina interfere na síntese de DNA da Leishmania, levando a uma fragmentação da membrana mitocondrial e, conseqüentemente, à morte do parasita. Alguns estudos demonstraram boa resposta ao tratamento da LC causada pela *L. guyanensis* (Nacher et al., 2001). Na LTA causada pela *L. braziliensis*, a pentamidina foi menos efetiva que o antimônio pentavalente (Andersen et al., 2005). Na LM, os dados quanto ao uso da pentamidina são limitados, mas essa droga pode ser utilizada como tratamento alternativo (OMS, 2010).

3.6.4 Miltefosina

A miltefosina é um fosfolípido sintético utilizado inicialmente para tratamento do câncer. Seu mecanismo de ação se dá pela inibição de enzimas implicadas na síntese da membrana celular e da homeostasia do cálcio. A miltefosina é a primeira droga oral utilizada com sucesso no tratamento da LV, com taxa de cura média de 95% com uma dose de 2,5 mg/kg/dia por 4 semanas (Jha et al., 1999; Sundar; Rai, 2002). Um estudo multicêntrico placebo controlado avaliou o uso da Miltefosina na LC em regiões da Colômbia, região endêmica da *L. panamensis*, com taxa de cura

de 91% e em regiões da Guatemala, áreas endêmicas de *L. braziliensis* e *L. mexicana*, com taxa de cura de 53%, quando comparado ao placebo (Soto et al., 2004). Em um estudo na Bolívia utilizando a miltefosina em pacientes com LM causada *pela L. braziliensis*, a taxa de cura foi 83% em pacientes com doença leve e 58% em pacientes com doença mais extensa (Soto et al., 2007).

3.6.5 Pentoxifilina

Pentoxifilina é uma metilxantina que possui efeito hemorreológico, aumentando a deformidade das hemácias, reduzindo a viscosidade sanguínea e reduzindo o potencial de agregação plaquetária (Ward, Clissold, 1987). Em razão dessa propriedade, a pentoxifilina, inicialmente, foi usada clinicamente para o tratamento de doenças vasculares (Ward, Clissold, 1987). A pentoxifilina também apresenta uma atividade imunomoduladora, inibindo a liberação de citocinas, como o TNF- α (Doherty et al., 1991; Neuner et al., 1997). A pentoxifilina inibe a fosfodiesteras IV, impedindo a degradação de AMP-cíclico (AMP-c) e prostanóides. O aumento do AMP-c regula negativamente a expressão dos fatores de transcrição Nf-kb e NF-AT, inibindo a transcrição RNA-m de macrófagos, reduzindo a síntese de TNF- α (Eigler et al., 1997). O TNF- α está envolvido na fisiopatologia de diversas patologias inflamatórias, sendo, portanto, a pentoxifilina uma droga potencial no tratamento dessas patologias, tendo sido usada experimentalmente para uma série de condições inflamatórias (Das et al., 2003; Ustunsoy, 2006). A pentoxifilina mostrou-se efetiva no tratamento do eritema nodoso hansênico

(de Carsalade et al., 2003) e também vem sendo utilizada em outras doenças inflamatórias como a mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM/TSP) (Shirabe et al., 1997), osteomielite (Blam et al., 2001) e SARA (Síndrome de Angústia Respiratória Aguda) (Martim et al., 2003). Além do TNF- α , a pentoxifilina parece inibir outras citocinas como o IFN- γ (Luna et al., 2011), a IL-1- β , IL-6, IL-8 in vivo e in vitro (Neuner et al., 1994) e diminui também a expressão de moléculas de adesão intracelular 1 (ICAM-1) em monócitos (Neuner et al., 1997).

A associação da pentoxifilina ao antimônio pentavalente (Sb^v) também vem sendo avaliada em pacientes com LC e LM. A dose da pentoxifilina utilizada nos estudos é de 1.200 mg/dia em associação ao antimonial pelo mesmo período de tempo do Sb^v: 20 dias na LC e 30 dias na LM. Em um ensaio clínico randomizado, duplo-cego e placebo controlado, com 64 pacientes com diagnóstico de LC causado pela *L. major*, a associação da pentoxifilina ao Sb^v aumentou a taxa de cura quando comparada ao uso isolado do antimonial, sem efeitos colaterais causados pela pentoxifilina (Sadeghian; Nilforoushzadeh, 2006). Em 2003, Bafica et al. relataram o uso da associação da pentoxifilina ao Sb^v em dois pacientes com LC previamente refratários ao tratamento com antimonial isolado, com cura após o uso da associação. Em um outro ensaio piloto, randomizado e duplo-cego conduzido com 20 pacientes com LC, apesar da associação da pentoxifilina ao Sb^v não ter modificado estatisticamente a taxa de cura, houve uma redução significativa nos níveis de TNF- α e IFN- γ no 15º dia de tratamento nesse grupo da associação (Brito et al., 2014). Faria et al. (2019),

ao avaliarem a resposta celular in situ, sugerem que o tratamento com Sb^v associada à pentoxifilina atua nas células CD68+, reduzindo a expressão do TNF-alfa, mas não da IL-10, resultando em uma modulação mais eficiente da resposta inflamatória, acelerando o processo de cicatrização.

Em um estudo aberto com 10 pacientes com diagnóstico de LM refratários ao tratamento prévio com antimônio pentavalente isolado, nove pacientes apresentaram cura com a associação da pentoxifilina ao antimonial em até 90 dias de tratamento, mostrando também redução significativa na produção de TNF- α nos dias 60, após o início do tratamento (Lessa et al., 2001).

4 MÉTODOS

4 MÉTODOS

Para alcançar os quatro objetivos propostos, foram feitos quatro estudos distintos, com metodologia específica para o propósito de cada um deles (Anexos A, B, C e D). O Comitê de Ética das Instituições envolvidas aprovou todos os procedimentos relacionados a cada um dos estudos.

4.1 ASPECTOS DA METODOLOGIA EM COMUM AOS ESTUDOS

4.1.1 Descrição da área endêmica e seleção dos pacientes

Participaram dos estudos os pacientes com diagnóstico de leishmaniose mucosa que compareceram ao Posto de Saúde de Corte de Pedra, município de Tancredo Neves, Bahia, ou ao Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos da UFBA. O Posto de Saúde de Corte de Pedra, vila situada no sudeste do estado da Bahia a 280 Km de Salvador, é um centro de referência para diagnóstico e tratamento das leishmanioses, desde 1980, ocasião em que um surto da doença foi documentado nesta vila. Anualmente, cerca de 500 casos de leishmaniose cutânea e 20 novos casos de leishmaniose mucosa são vistos neste posto de saúde.

Nos estudos, o diagnóstico da leishmaniose mucosa foi feito com base na presença de uma lesão típica da doença e de, pelo menos, dois dos

seguintes achados: reação de Montenegro positiva, isolamento do parasito e achado histopatológico compatível com leishmaniose. Os pacientes que apresentavam doença ativa e que foram acompanhados em Corte de Pedra ou no Hospital Universitário Prof. Edgard Santos foram incluídos no estudo, até a documentação da cura da doença. Todos os pacientes eram voluntários, e o consentimento informado foi obtido de todos indivíduos, antes da coleta dos exames e realização dos procedimentos de cada estudo. Em todos os casos, foi colhida uma história clínica e realizado exame físico geral e exame otorrinolaringológico.

4.1.2 Exame otorrinolaringológico

Nos estudos, o exame otorrinolaringológico foi realizado em todos os pacientes com leishmaniose cutânea que apresentavam queixas nasais, como coriza, epistaxe ou obstrução nasal e, em todos os pacientes que apresentavam leishmaniose disseminada ou aqueles com lesões cutâneas faciais, já que uma associação foi demonstrada entre a LM e as formas disseminadas de LC, envolvendo a face (Guerreiro et al., 2000).

O exame otorrinolaringológico completo foi realizado em cada paciente, foram utilizados para iluminação um fotóforo (Headlights 460003 - Welch Allyn) e um otoscópio (Welch Allyn – Modelo 71000C). Foram realizadas rinoscopia anterior, orofaringoscopia e otoscopia. A inspeção de toda a fossa nasal, foi feita, bem como da nasofaringe, utilizando endoscópio rígido de 0°/4mm (Karl Storz - HOPKINS II Telescope - 7210 AA) ou flexível de 3,2 mm (Machida - Modelo ENT-30PIII). Para pacientes com suspeita de

lesões mais disseminadas, avaliação da hipofaringe e laringe foram realizadas com endoscópio rígido de 70°/8 mm (Karl Storz - HOPKINS Laryngoscope – 8700 CKA) ou flexível de 3,2 mm (Machida - Modelo ENT-30PIII).

4.1.3 Avaliação complementar

Após a obtenção do consentimento informado, procedeu-se a avaliação clínica do paciente. Coleta de sangue para sorologia, realização de teste cutâneo para verificação da hipersensibilidade tardia ao antígeno de leishmania (reação de Montenegro), aspirado da lesão mucosa para isolamento do parasito e biopsia para histopatologia foram utilizados de rotina para o diagnóstico de leishmaniose. Todos os pacientes incluídos nos estudos tiveram o diagnóstico confirmado pelos seguintes critérios: lesão típica de leishmaniose com isolamento do parasito na cultura ou biópsia, ou positividade do teste sorológico ou de hipersensibilidade tardia.

4.1.3.1 Teste de Montenegro

Este teste foi realizado com antígeno solúvel de *Leishmania amazonensis* (250 µg/ml), produzido no Serviço de Imunologia do HUPES, pela técnica anteriormente descrita por Reed et al. (1986). O teste foi feito com a inoculação de 0,1ml de antígeno (25 µg) injetado na face ventral do antebraço. Após 48h, foi realizada leitura, sendo o teste considerado positivo, quando o diâmetro de induração formada foi maior do que 5 mm (Cuba-Cuba et al., 1985).

4.1.3.2 Teste histopatológico

Biópsia da mucosa nasal foi realizada para comprovação diagnóstica em todos os pacientes com suspeita de leishmaniose mucosa. A biópsia foi feita com pinça saca-bocado sob anestesia local; parte do material foi fixado em formol e parte congelado para os estudos de imuno-histoquímica.

4.1.4 Critérios para avaliação da eficácia terapêutica

Exame clínico otorrinolaringológico completo foi realizado antes, durante e após o tratamento mensalmente por 12 meses a avaliação da resposta terapêutica foi feita, utilizando-se os seguintes critérios:

- Lesões ativas: Presença de infiltração importante da mucosa nasal, sem sinais de cicatrização;
- Cicatrização parcial: Melhora parcial da área da mucosa nasal afetada, com diminuição da infiltração e hiperemia, mas com persistência de áreas com atividade inflamatória discreta; e
- Cicatrização total: Quando a lesão da mucosa nasal encontrava-se completamente cicatrizada sem crostas de qualquer natureza, com membrana pituitária rósea, sem ulceração e com áreas fibrosas com cordões esbranquiçados característicos.

Foi definido como falha terapêutica, quando, após 90 dias findo o tratamento, a lesão inicial da mucosa nasal permanecia ativa, obrigando o uso de uma nova série de antimônio pentavalente ou outro medicamento; bem como o aparecimento de novas lesões mucosas durante o esquema primário ou até 6 meses após a terapêutica. A ocorrência de reativação da

lesão ou aparecimento de nova lesão da mucosa nasal no período de 6 meses, após o tratamento foi também considerada falha terapêutica.

4.2 ASPECTOS DA METODOLOGIA ESPECÍFICOS DE CADA ESTUDO

4.2.1 Estudo 1 (Anexo A)

Estudo realizado para propor um estadiamento clínico para a doença nasal que contou com a participação de 50 pacientes com diagnóstico de LM. Os participantes desse estudo foram inscritos entre janeiro de 1996 e dezembro de 1998 e também entre janeiro de 2005 e dezembro de 2008. Após a obtenção do consentimento informado assinado, cada paciente foi avaliado clinicamente. Em todos os casos, foram coletadas informações de antecedentes clínicos e realizados exames físico geral e otorrinolaringológico. Durante o exame físico geral, atenção especial foi dada à identificação de cicatrizes compatíveis com LC pregressa.

4.2.2 Estudo 2 (Anexo B)

Estudo realizado para investigar a associação entre os títulos de IgG e a gravidade da doença mucosa, 27 pacientes com LM foram incluídos nesse estudo. Os estágios clínicos foram determinados em exame otorrinolaringológico, seguindo a classificação em estágios I a V de acordo com os critérios estabelecidos por Lessa et al. (2012). Para avaliar a especificidade do teste sorológico, um antígeno solúvel de *Leishmania*

braziliensis (SLA) em pacientes com LM e soro de 25 pacientes com leishmaniose cutânea (LC) foram usado como controle.

4.2.2.1 Antígeno solúvel de Leishmania

Uma cepa de *L. braziliensis* (MHOM/BR/2001), isolada de um paciente com LM foi usada para preparar o antígeno solúvel de Leishmania por sonicação e centrifugação, como anteriormente descrito (Reed et al., 1986). SLA foi usado em uma concentração de 5mg/ml, após teste negativo para endotoxinas, usando o teste de lisado de amebócito *Limulus*.

4.2.2.2 Detecção de anticorpos anti-Leishmania IgG por ELISA

Amostras de sangue periférico (5 mL) de pacientes com LM foram adicionadas a um tubo seco para separação do soro e armazenadas a -20°C para posterior dosagem das imunoglobulinas pela técnica de ELISA indireta. Placas de poliestireno com 96 poços foram sensibilizadas com 10 µg/ml de antígeno solúvel de leishmania em tampão carbonato/bicarbonato e incubadas por 18 horas a 4°C. Em seguida, as placas foram bloqueadas com PBS 0,1% de albumina bovina (BSA) por 1 hora a 37°C. Soros de pacientes e controles sadios na diluição 1/50 foram adicionados e incubados por 1 hora a 37°C. Anticorpos de detecção policlonais anti-IgG humana (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) ou monoclonais anti-IgG1 e IgG2 humanas (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) ligados à peroxidase, foram adicionados e incubados por uma hora a 37°C. Após cada etapa acima

descrita, foram realizadas de quatro a sete lavagens com solução salina tamponada com fosfato, contendo 0,05% de Tween 20.

Em seguida, o substrato enzimático Tetrametilbenzidina (TMB) foi adicionado e, após 15 minutos, a reação foi interrompida com H₂SO₄ 2N. A leitura foi efetuada em leitor de microplaca a um comprimento de onda de 450 nm e os resultados foram expressos em densidade óptica (DO). Os valores de corte (IgG total é 0,395; IgG1 0,042; IgG2 0,159) foram estabelecidos, levando em consideração a média +3 desvios-padrão das leituras de absorbância de indivíduos saudáveis.

4.2.2.3 Análise Estatística

Os testes não paramétricos envolveram o Kruskal-Wallis e o teste de classificação sinalizada de Wilcoxon, para comparações de variáveis, usando GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). As diferenças estatísticas foram consideradas, quando os valores de p eram menores que 0,05.

4.2.3 Estudo 3 (Anexo C)

Estudo realizado para avaliar a eficácia da terapia combinada de antimônio pentavalente com pentoxifilina para o tratamento da leishmaniose mucosa. Foi realizado um estudo randomizado, duplo cego, controlado por placebo e que envolveu 23 pacientes com leishmaniose mucosa.

4.2.3.1 Tratamento

Depois que o consentimento foi obtido, os pacientes foram randomizados, por meio do uso de uma tabela de randomização, para o grupo de tratamento combinado ou o grupo de controle. Tanto o otorrinolaringologista e os participantes estavam cegos para a atribuição do tratamento durante todas as etapas do estudo, incluindo o período de acompanhamento. Pacientes com leishmaniose mucosa receberam antimônio pentavalente intravenoso (antimônio de meglumina; Aventis), em uma dosagem de 20 mg por kg de peso corporal por dia, mais pentoxifilina oral (Pentox; Farmasa) na dosagem de 400 mg três vezes ao dia por 30 dias. Os pacientes alocados para o grupo controle receberam o mesmo tratamento com antimônio pentavalente intravenoso (antimônio de meglumina; Aventis) mais pílulas de placebo oral, que foram formuladas para parecerem idênticas à pentoxifilina três vezes ao dia durante 30 dias. Um comitê de monitoramento de segurança de dados teve acesso à atribuição do paciente no caso de eventos adversos. Nenhum paciente havia recebido tratamento prévio para leishmaniose.

4.2.3.2 Avaliação de eficácia

Todos os pacientes foram avaliados a cada 30 dias por um otorrinolaringologista cego para o estudo. O desfecho primário foi a cura, definida, como cicatrização total da mucosa e nenhuma evidência de atividade inflamatória com 150 dias, após o início da terapia. Uma análise provisória foi realizada 90 dias, após o início da terapia. Pacientes que pioraram ou que não tiveram alteração nas características de suas lesões

receberam um segundo curso de antimônio pentavalente. Pacientes que apresentaram cicatrização parcial, mas não completa em 90 dias, após início da terapia, foram avaliados posteriormente por mais 30 a 60 dias, e aqueles que não experimentaram a cicatrização total foram submetidos a outro ciclo de tratamento. Desfechos secundários foram o tempo de cicatrização da lesão da mucosa e nenhuma evidência de recidiva após 2 anos de acompanhamento.

4.2.3.3 Análise Estatística

Testes não paramétricos foram adotados para todas as análises estatísticas, porque o tamanho de nossa amostra não era grande o suficiente para justificar as teorias assintóticas-padrão. Características dos pacientes e perfis médicos na randomização, bem como durante o período de acompanhamento, foram resumidos por mediana, média \pm desvio-padrão, ou porcentagem, e foram comparados entre os dois grupos usando o teste exato de Fisher (para variáveis categóricas) e o teste de Wilcoxon ou o teste U de Mann-Whitney (para variáveis contínuas). Uma curva de Kaplan-Meier, acompanhada do teste de log-rank, foi usada para avaliar as taxas de cura.

4.2.4 Estudo 4 (Anexo D)

Foi realizado um estudo transversal analítico, de natureza experimental, no período entre fevereiro de 2016 e maio de 2017. Após os critérios de exclusão, foram selecionados 44 pacientes que foram divididos em dois grupos, 22 participantes com sequela de LM e 22 participantes com

sequela de LC, com o objetivo de caracterizar suas vozes e verificar as alterações vocais ocorridas após a aplicação da técnica vocal. Para tanto, a técnica foi aplicada em apenas uma sessão, onde foram realizadas três séries de sons nasais, recolhendo a voz dos participantes antes e após a técnica. Todos os participantes selecionados para o estudo já haviam concluído o tratamento para leishmaniose e apresentavam cicatrização total das lesões. Após as avaliações fonoaudiológicas, os participantes que apresentavam alterações vocais foram encaminhados para tratamento vocal.

4.2.4.1 Análise vocal

Para a coleta da emissão da vogal /a:/, os pacientes foram orientados a ficar em posição ortostática e emitir o som de forma sustentada em pitch e loudness usuais, no tempo máximo de fonação e sem o uso da reserva respiratória. A emissão foi registrada em gravador profissional de voz e vídeo digital Zoom Modelo Q3 Handy Recorder, com formato de áudio PCM, quantização de 16bits, frequência de captura de 96kHz, mantendo a distância de boca-gravador de 4 centímetros e 90°, em ambiente silencioso.

A coleta foi realizada imediatamente antes e após a execução completa da técnica vocal “Som Nasal”, em apenas uma sessão, realizada pelos participantes em tempo máximo de fonação, em três séries de 15 repetições, com 30 segundos de repouso entre as séries, com os pacientes sentados e em completo silêncio. A técnica foi demonstrada e acompanhada por fonoaudiólogo para evitar execução incorreta.

Em relação à emissão da vogal /a:/, foi realizada avaliação perceptivo-auditiva por meio da escala RASATI que avalia rouquidão (R), grau de aspereza (A), soproidade (S), astenia (A), distensão (T) e instabilidade (I), utilizando a seguinte escala de avaliação: 0 = normal: quando nenhuma alteração vocal é percebida pelo ouvinte; 1 = leve, quando a alteração é evidente e 3 = para alterações extremas da voz. Esta avaliação foi realizada por quatro avaliadoras fonoaudiólogas, com experiência na área de voz. As informações que as avaliadoras receberam foram sobre a idade e o sexo dos pacientes.

Para a análise, foi feita uma concordância interobservador por meio do coeficiente Kappa. A interpretação do teste foi a seguinte: valores menores que 0 correspondem a nenhuma concordância; valores entre 0 e 0,19 representam concordância pobre; valores entre 0,20 e 0,39 correspondem a boa concordância; valores entre 0,40 e 0,59 correspondem a concordância moderada; valores entre 0,60 e 0,79 correspondem a concordância forte; e valores entre 0,80 e 1 correspondem a uma concordância quase perfeita. Observou-se forte concordância entre as avaliadoras, com índice de 0,78. Apenas as respostas dessas avaliadoras foram selecionadas e agrupadas para a análise dos dados, em razão de uma maior confiabilidade.

4.2.4.2 Análise Estatística

O SPSS 17.0 foi usado para a análise estatística, incluindo dados sociodemográficos e características clínicas. Além disso, para comparar as medidas auditivas antes e após a aplicação da técnica vocal ao grupo com sequelas de LM e a comparação entre o grupo com sequelas de LM e LC, foi aplicado o teste não paramétrico de Wilcoxon, tendo em vista que 80% das distribuições não foram normais, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Por outro lado, o teste exato de Fisher foi utilizado para comparar os dados da escala RASATI, antes e após o tratamento vocal entre os grupos LM e LC.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 ESTUDO 1 (ANEXO A)

A análise clínica dos 50 pacientes, levando em consideração o tipo e a extensão da lesão, permitiu classificar a leishmaniose mucosa em cinco estágios. O estágio das lesões variou, desde nodulação nasal sem ulceração até ulceração superficial, ulceração profunda e perfuração do septo (Tabela 1). Dos 50 pacientes do estudo dois (4%) estavam no Estágio I, 18 (36%) no Estágio II, seis (12%) no Estágio III, 22 (44%) no Estágio IV e dois (4%) no Estágio V.

Tabela 1 - Um novo sistema de estadiamento clínico proposto para pacientes com leishmaniose mucosa

| Estadiamento | Observações clínicas na doença da mucosa nasal |
|--------------|---|
| Estágio I | Nodulação sem ulceração |
| Estágio II | Ulceração superficial |
| Estágio III | Ulceração profunda |
| Estágio IV | Perfuração do septo |
| Estágio V | Deformidades na estrutura externa da pirâmide nasal |

Na fase inicial, a doença é caracterizada por lesões nodulares sem ulcerações, normalmente, ao longo do septo cartilaginoso (área de Kiesselbach), assoalho nasal e parede lateral (especificamente, na cabeça

das conchas nasais inferiores) (Figura 2A). Os pacientes com doença em estágio I podem ser assintomáticos ou apresentar sintomas leves. Neste estudo, os pacientes classificados como estágio I apresentaram sintomas leves, como rinorreia não sanguinolenta e obstrução nasal. Pacientes assintomáticos são, frequentemente, identificados apenas por causa do exame otorrinolaringológico sistemático de pacientes com LC disseminada e de pacientes com lesões na face.

Dezoito pacientes (36%) apresentavam lesões granulosas finas, caracterizadas por lesões com ulcerações superficiais observadas no septo anterior, conchas inferiores e no assoalho da fossa nasal (Figura 2B). No estágio II, algumas lesões hemorrágicas foram observadas. Clinicamente, os pacientes queixavam-se de rinorréia com sangue e obstrução nasal.

No estágio III (estágio de ulceração profunda), a reação tecidual é mais intensa, com tecido de granulação aberrante e infiltração da mucosa, tornando o septo nasal alargado (Figura 2C). Crostas hemáticas foram observadas sobre o septo, conchas inferiores e assoalho das fossas nasais. Estas lesões caracterizaram-se pela excessiva fragilidade, sangrando com muita facilidade ao toque da mucosa. Clinicamente os pacientes queixavam-se de sensação dolorosa em plena pirâmide nasal, rinorreia de característica sanguinolenta e eliminação de crostas hemáticas. Obstrução nasal foi um sintoma frequente nesse estágio da doença. Do ponto de vista externo, em virtude do processo inflamatório que envolve as cartilagens e o tecido celular subcutâneo, infiltração edematosa da região da pirâmide nasal pode ser

observada e o nariz pode adquirir o aspecto conhecido pelo nome de nariz de tapir ou anta.

O estágio IV é caracterizado por necrose da cartilagem no septo nasal anterior. É, nesta fase, que o septo cartilaginoso está perfurado com infiltração acentuada do rebordo septal posterior (Figura 2D). Clinicamente, os pacientes queixavam-se de rinorreia de característica sanguinolenta, eliminação de crostas hemáticas e obstrução nasal.

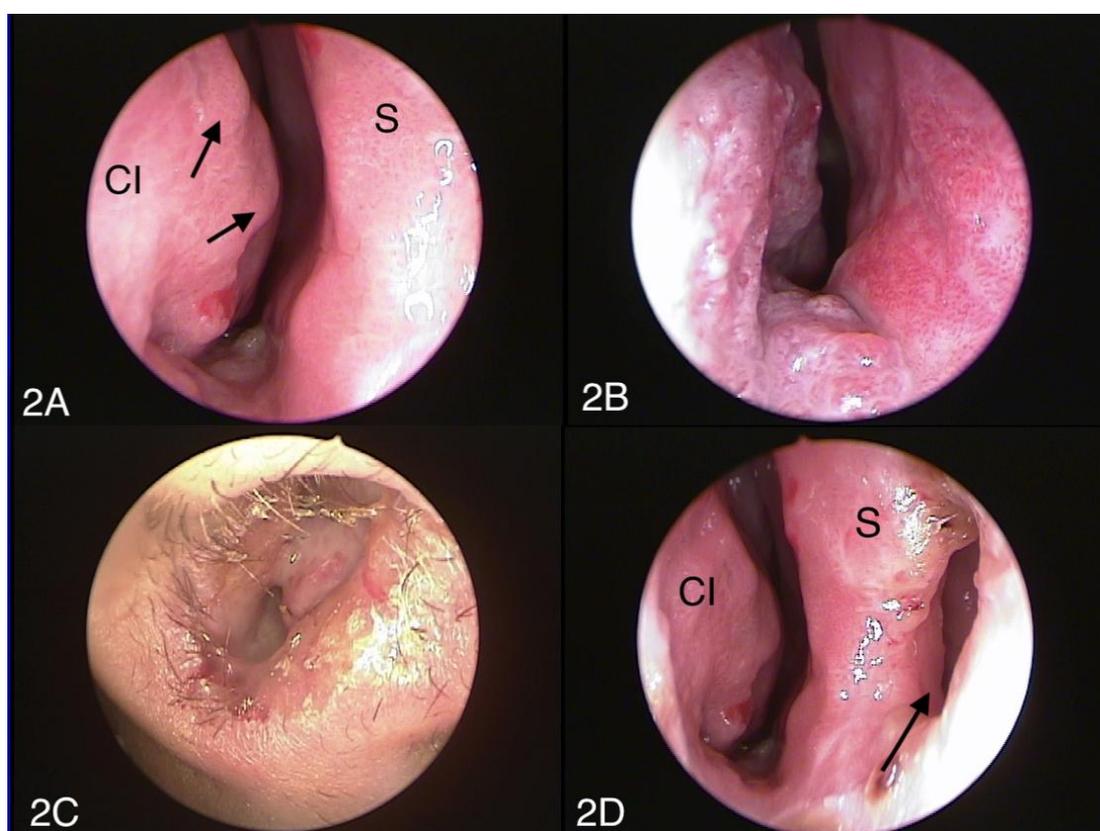


Figura 2 - Aspectos clínicos da leishmaniose mucosa em diferentes estágios da doença em fossas nasais à direita. (A) Lesões nodulares (setas) sem ulcerações ao longo da cabeça da concha nasal inferior e septo nasal (estágio I). (B) Lesões granulomatosas finas, caracterizadas por ulcerações superficiais observadas na concha inferior e no assoalho da fossa nasal (estágio II). (C) Estágio de ulceração profunda com reação tecidual mais intensa e granulação do tecido claramente visível e infiltração da mucosa (estágio III). (D) O septo nasal cartilaginoso é perfurado (seta) com uma visível granulação do tecido e infiltração da mucosa do septo nasal posterior e concha inferior (forma ativa em estágio IV). CI: concha inferior; S: septo

Em formas mais avançadas (Estágio V), pode ocorrer destruição total da columela e queda da ponta do nariz. A região dorsal da pirâmide nasal, às vezes, é perfurada. Em alguns casos, pode ocorrer destruição total do septo anterior, restando ainda a columela inteira, ficando o nariz selado (Figuras 3A e 3B). Crostas extensas de aspecto hemorrágico ou mesmo decorrentes do ressecamento da secreção mucosa provocada pelo alargamento da estrutura nasal interna, podem ser observadas em consequência da lesão tecidual, representada pela destruição do septo cartilaginoso e conchas inferiores. A intensidade do processo inflamatório e a consequente destruição tecidual podem, portanto, interferir de forma importante na estética facial. Curiosamente, não foi observada miíase, apesar da extensa exposição das estruturas internas das fossas nasais. Clinicamente, os pacientes queixavam-se de rinorreia com sangue, crostas hemáticas, obstrução nasal e destruição da arquitetura nasal.



Figura 3 - Estágio V da leishmaniose mucosa. (A) Acometimento do septo anterior levando à destruição da arquitetura nasal e alteração da estrutura facial. (B) Destruição total da columela

Neste estudo, todos os pacientes tinham lesões ativas. No entanto, é importante ressaltar que os estágios IV e V podem estar presentes, tanto na doença mucosa ativa como também na inativa, ou seja, representando o resultado de lesões destrutivas no passado.

A localização característica da lesão e o estágio da doença nos 50 pacientes com LM estudados são apresentados nos dados da Tabela 2. A idade dos pacientes variou entre 10 e 86 anos com média e DP de 36 ± 16 anos. A maioria (94%) era adulta; dois pacientes tinham 12 anos e um tinha 10 anos. 43 pacientes (86%) eram do sexo masculino e sete (14%) do feminino. Das três crianças com a doença, duas eram do sexo feminino. 92 lesões da mucosa foram documentadas nos 50 pacientes: 43 em septo nasal; nove em assoalho nasal; 19 em parede lateral do nariz; três em rinofaringe; 16 em orofaringe e palato e dois em laringe.

Tabela 2 - Características da doença mucosa em 50 pacientes com diagnóstico de leishmaniose

| Idade | Sexo | Duração doença mucosa | Local da lesão mucosa | Estágio |
|-----------------|------|-----------------------|---|---------|
| 18 | M | 1 m | Septo nasal | I |
| 31 | F | 2 m | Septo nasal e orofaringe | I |
| 47 | M | 1 m | Parede lateral e vestibulo nasal | II |
| 15 | M | 1 m | Septo nasal | II |
| 12 | F | 1 m | Septo nasal | II |
| 34 | M | 1 m | Assoalho nasal e septo | II |
| 28 | M | 2 m | Parede lateral e vestibulo nasal | II |
| 55 | M | 2 m | Septo nasal e palato mole | II |
| 46 | M | 3 m | Septo nasal | II |
| 38 | M | 3 m | Septo nasal | II |
| 60 | M | 4 m | Parede lateral, septo nasal e vestibulo nasal | II |
| 43 | M | 4 m | Septo nasal e concha inferior | II |
| 21 | M | 6 m | Septo nasal | II |
| 44 | M | 8 m | Septo nasal e concha inferior | II |
| 45 ^a | M | 12 m | Concha inferior | II |
| 23 | F | 15 m | Septo nasal | II |
| 16 | M | 22 m | Septo nasal e concha inferior | II |
| 30 | M | 28 m | Septo nasal e concha inferior | II |
| 26 | M | 28 m | Concha inferior | II |
| 58 ^b | M | 21 a | Assoalho nasal | II |
| 20 | M | 2 m | Septo nasal e concha inferior | III |
| 32 | M | 3 m | Septo nasal, concha inferior e palato mole | III |
| 23 | M | 3 m | Assoalho nasal, septo e parede lateral do nariz | III |
| 32 | M | 4 m | Septo nasal e Concha inferior | III |
| 31 | M | 4 m | Septo nasal e palato mole | III |
| 69 | M | 10 a | Concha inferior e orofaringe | III |
| 43 | M | 3 m | Septo nasal | IV |
| 29 | M | 6 m | Septo nasal, palato mole e laringe | IV |
| 19 | M | 6 m | Assoalho nasal e Septo nasal | IV |
| 12 | M | 6 m | Septo nasal e orofaringe | IV |
| 10 | F | 12 m | Assoalho nasal e septo nasal | IV |

continua

Tabela 2 - (conclusão) Características da doença mucosa em 50 pacientes com diagnóstico de leishmaniose

| Idade | Sexo | Duração doença mucosa | Local da lesão mucosa | Estágio |
|-------|------|-----------------------|--|---------|
| 29 | M | 12 m | Septo nasal e concha inferior | IV |
| 38 | M | 3 a | Septo nasal e concha inferior | IV |
| 44 | F | 3 a | Assoalho nasal e septo nasal | IV |
| 31 | M | 5 a | Septo nasal | IV |
| 14 | M | 8 a | Septo nasal e palato mole | IV |
| 33 | F | 8 a | Assoalho nasal, Septo nasal e concha inferior | IV |
| 33 | M | 9 a | Septo nasal | IV |
| 47 | M | 9 a | Septo nasal | IV |
| 86 | M | 11 a | Septo nasal e palato mole | IV |
| 36 | M | 11 a | Septo nasal | IV |
| 33 | M | 18 a | Septo nasal e palato mole | IV |
| 35 | M | 19 a | Septo nasal | IV |
| 59 | M | 20 a | Septo nasal, rinofaringe e palato mole | IV |
| 41 | M | 21 a | Septo nasal e parede lateral do nariz | IV |
| 30 | M | 21 a | Septo nasal | IV |
| 40 | M | 33 a | Septo nasal, concha inferior, rinofaringe, laringe, palato mole e duro | IV |
| 60 | F | 44 a | Septo nasal e palato mole | IV |
| 64 | M | 10 a | Septo nasal e palato mole | V |
| 39 | M | 7 a | Septo nasal e palato mole | V |

M: masculino; F: feminino.

^aPaciente com Leishmaniose cutânea disseminada.

^bPaciente tinha uma história de 41 anos, desde a primeira lesão cutânea e recebeu três cursos de antimônio, durante os últimos 20 anos em razão da recidiva da doença mucosa.

Foi observada correlação entre a duração da lesão mucosa (sintoma) e o estágio da doença, $r = 0,6406$ e $p < 0,0001$ (Figura 4).

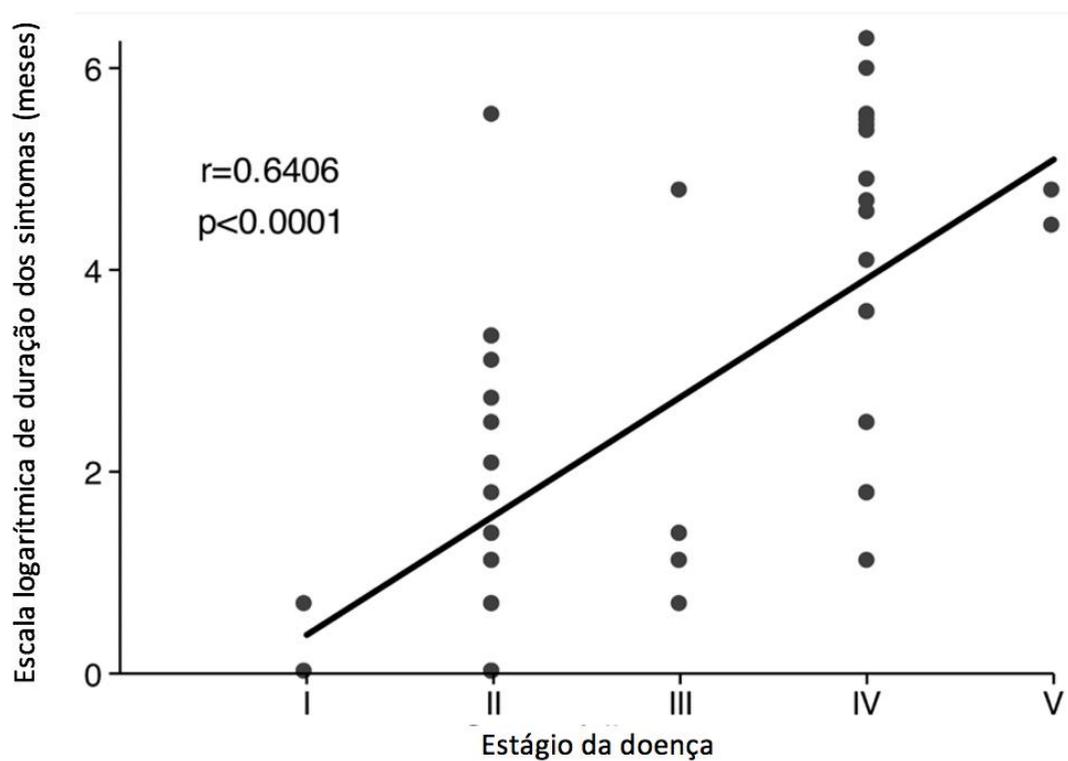


Figura 4 - Correlação entre o tempo do sintoma (escala logarítmica) e o estágio da leishmaniose mucosa

História de lesões cutâneas com evidência de lesão cutânea ativa ou presença de cicatrizes foi observada em 46 (92%) pacientes. Embora a maioria das lesões cutâneas (54,2%) estivessem localizadas nas extremidades inferiores, 44,6% das lesões cutâneas foram documentadas na cabeça, tronco e extremidades superiores.

Embora biópsias tenham sido obtidas para diagnóstico em todos os pacientes, foi possível recuperar o material e realizar uma análise histopatológica sistemática em apenas 14 pacientes. O grau de inflamação foi determinado pela frequência de linfócitos, monócitos e células plasmáticas. Além disso, foram avaliados a presença e o grau de necrose e destruição do epitélio. Não houve grande diferença em relação à inflamação crônica nos estágios II, III e IV. No entanto, a destruição e necrose do epitélio foram mais evidentes em pacientes classificados, como estádios III e IV (Figura 5).

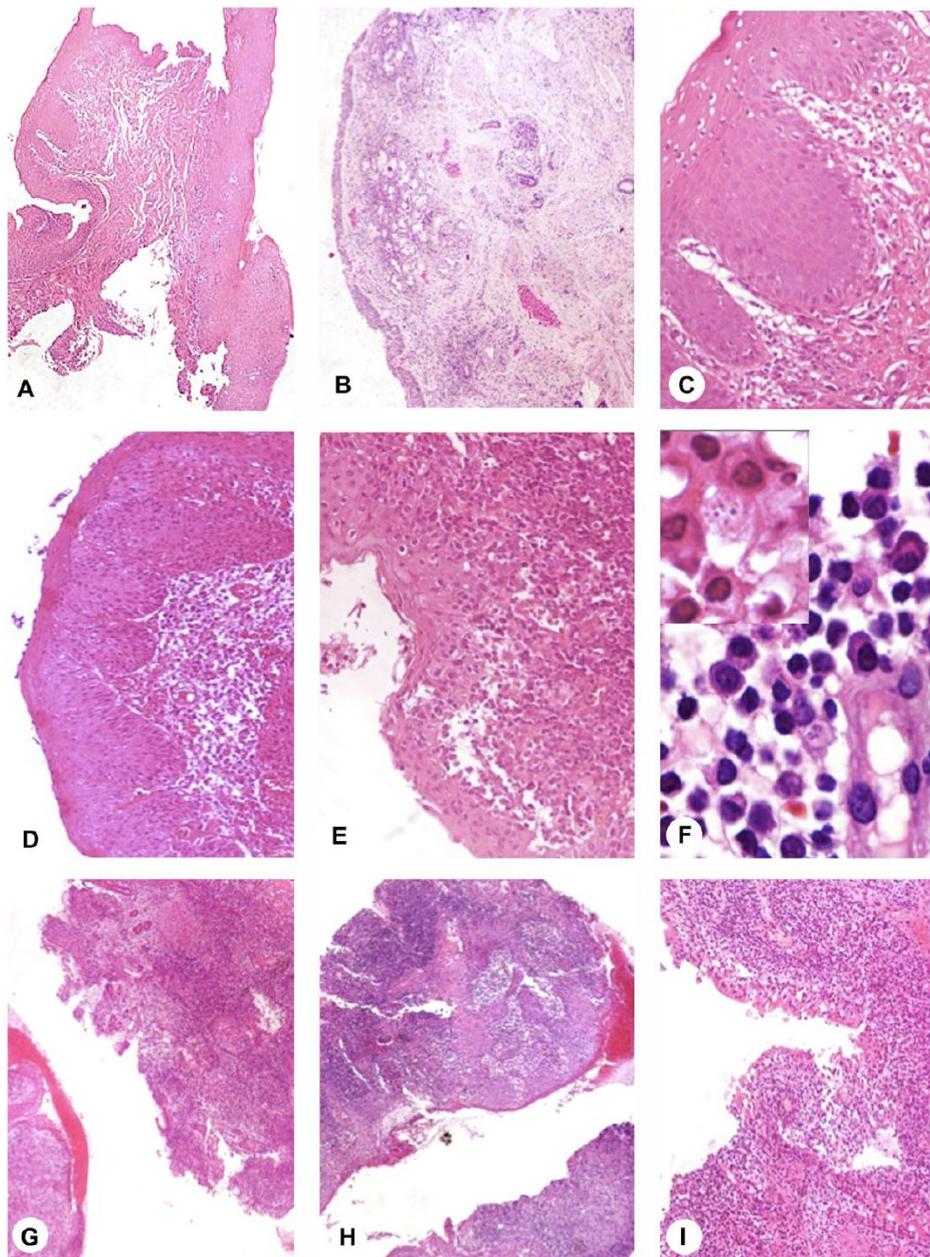


Figura 5- Análise histopatológica de biópsias de pacientes com leishmaniose mucosa (LM). (A) 4x, (B) 4x e (C) 20x - biópsia de paciente com lesão da mucosa nasal no estágio I. (D) 10x e (E) 20x – biópsia de paciente em estágio II. (F) 100x - detalhe do infiltrado inflamatório composto por linfócitos, células plasmáticas, vasos e macrófagos, contendo formas amastigotas de *Leishmania* (setas). (G) 4x, (H) 4x e (I) 10x - paciente com LM estágio IV. Os estágios clínicos I e II da LM são menos inflamados, sem destruição do epitélio. No estágio IV, a inflamação é maior com foco de necrose e rompimento do epitélio

5.2 ESTUDO 2 (ANEXO B)

Vinte e sete pacientes com LM e 25 com LC participaram do estudo. Em razão do pequeno número de pacientes classificados, como estágio I ou V, os pacientes foram divididos em três grupos: Estágios I e II (40,7%), estágio III (25,9%) e estágios IV e V (33,4%). O sexo masculino predominou na maioria dos grupos, embora nenhuma diferença estatisticamente significativa tenha sido encontrada entre os grupos. Dos pacientes com LM, 96% tinham lesão cutânea anterior, enquanto nenhum paciente LC tinha história prévia de leishmaniose.

Não foram encontradas diferenças nos títulos de IgG total, IgG1 e IgG2 entre pacientes com LM e pacientes com LC (Figura 6).

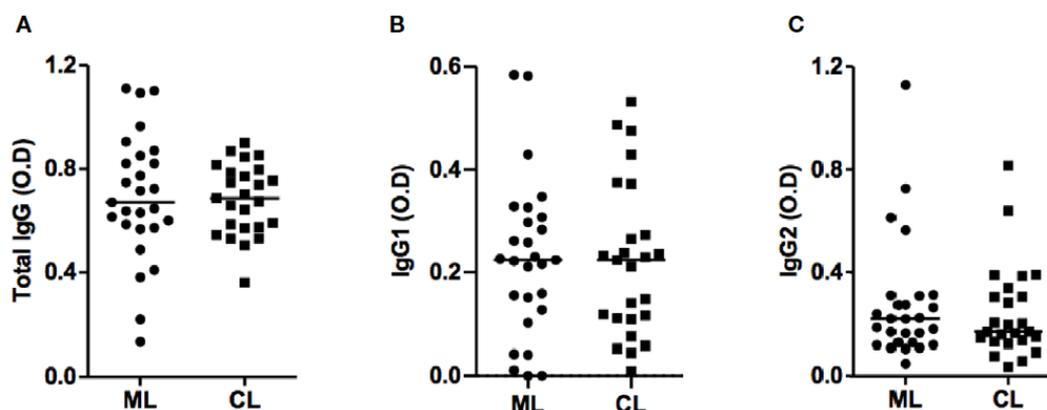


Figura 6 - Produção de anticorpos IgG contra antígenos de *Leishmania braziliensis* em pacientes com LM e LC. Títulos de anti-SLA IgG total (A), IgG1 (B) e IgG2 (C) de pacientes LM (n = 27) e LC (n = 25), realizados pela técnica de ELISA. A análise estatística foi realizada pelo teste U de Mann-Whitney. Os resultados são expressos em densidade óptica (OD)

Os níveis de anticorpos entre pacientes com LM foram examinados em diferentes estágios da doença. Os pacientes com LM com doença grave, nos estágios IV e V, apresentaram altos títulos de IgG total e IgG2, quando comparados com aqueles nos estágios I e II (Figura 7).

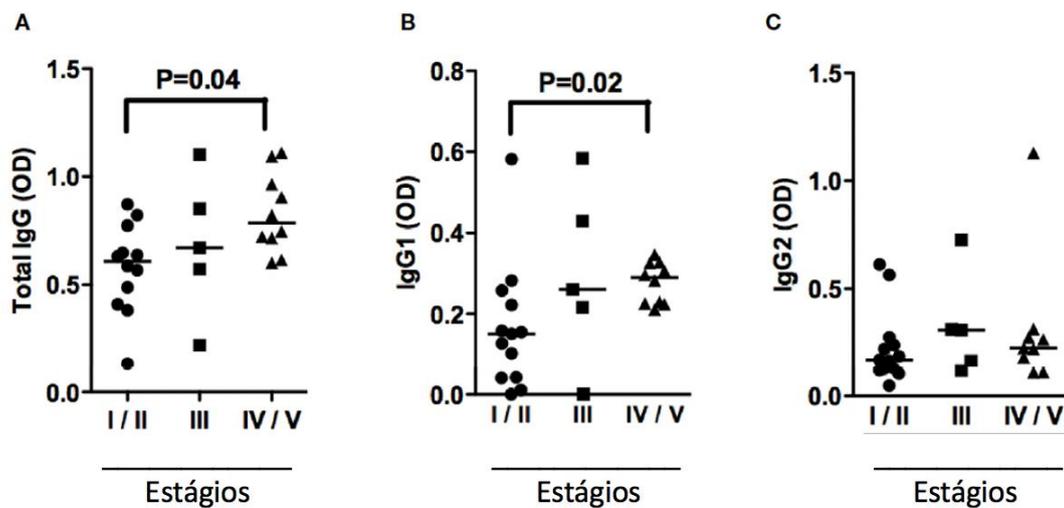


Figura 7 - Títulos de anti-SLA de IgG total (A), IgG1 (B) e IgG2 (C) de pacientes com LM em diferentes estágios da doença, realizados pela técnica de ELISA. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis. Os resultados são expressos em densidade óptica (OD). Estágio I/II (n = 12); Estágio III (n = 5); Estágio IV/V (n = 10)

5.3 ESTUDO 3 (ANEXO C)

O estudo envolveu 23 pacientes com leishmaniose mucosa com idade entre 18 e 65 anos. Todos cursavam com leishmaniose mucosa grave, definida, como a presença de infiltração granulomatosa profunda e/ou perfuração septal.

Os pacientes que receberam placebo mais antimonial pentavalente não diferiram em nenhuma das características basais examinadas, quando comparados aos que receberam pentoxifilina mais antimonial pentavalente, uma indicação da implementação adequada da randomização (Tabela 3). A duração dos sintomas, caracterizados sobretudo por obstrução nasal, foi ligeiramente menor no grupo que recebeu a terapia combinada de pentoxifilina com antimônio pentavalente, mas não foi significativamente diferente do grupo controle.

Tabela 3 - Características e respostas clínicas de pacientes com leishmaniose mucosa, por grupo de tratamento

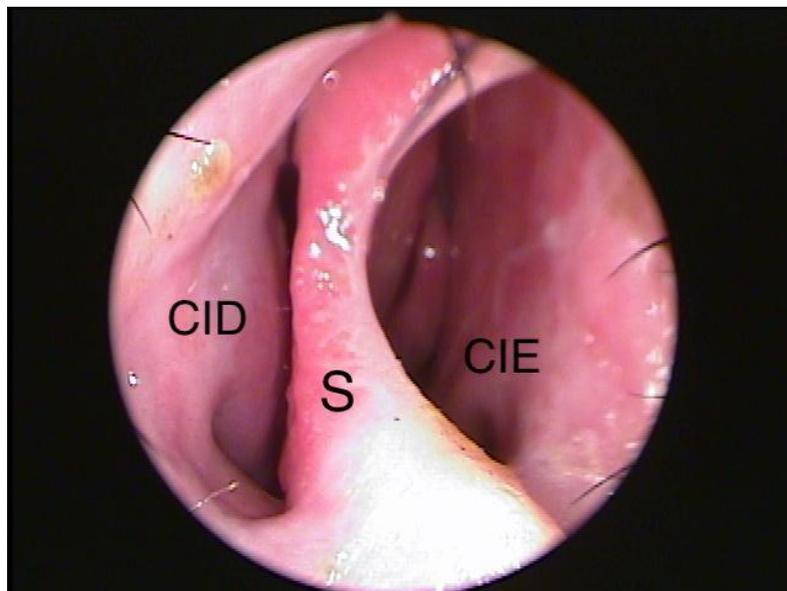
| Características | Grupo de tratamento | | P ^a |
|--|---------------------------------------|---|----------------|
| | Placebo + Sb ^V (n = 12) | Pentoxifilina + Sb ^V (n = 11) | |
| Idade em anos, mediana (média ± DP) | 40 (42 ± 14) | 32 (37 ± 15) | 0,40 |
| Sexo feminino, % | 8 | 27 | 0,32 |
| Pacientes com leishmaniose cutânea prévia, % | 75 | 64 | 0,67 |
| Duração dos sintomas, meses | | | |
| Mediana (média ± DP) | 12 (50 ± 79) | 6 (18 ± 36) | 0,25 |
| Variação | 2 - 240 | 0,5 - 120 | |
| Resultado do teste cutâneo de <i>Leishmania</i> | | | |
| Maior medição de diâmetro de induração, mediana mm (média mm ± DP) | 22 (25 ± 10) | 20 (19 ± 4) | 0,13 |
| Área, mediana mm ² (média mm ² ± DP) | 451 (634 ± 485) | 352 (355 ± 166) | 0,11 |
| Acompanhamento, mediana de meses (média de meses ± DP) | 27 (28 ± 9) | 23 (27 ± 10) | 0,17 |
| Tempo de cura, mediana dias (média dias ± DP) | 105 (145 ± 99) | 75 (83 ± 36) | 0,049 |
| Pacientes que receberam segundo curso de Sb ^V , % | 42 | 0 | 0,037 |

NOTA: Sb^V, antimônio pentavalente.

^a valor P foi calculado, usando o teste U de Mann-Whitney e o teste exato de Fisher para variáveis contínuas e categóricas, respectivamente.

Os resultados do teste cutâneo de *Leishmania* apresentaram valores ligeiramente superiores para um diâmetro maior no grupo controle (diâmetro médio ± DP, 25 ± 10 mm) que no grupo da pentoxifilina (diâmetro médio ± DP, 19 ± 4 mm), bem como as correspondentes áreas do local de reação (área média ± DP, 634 ± 485 mm² vs. 355 ± 166 mm²), mas nenhuma destas diferenças foram estatisticamente significantes.

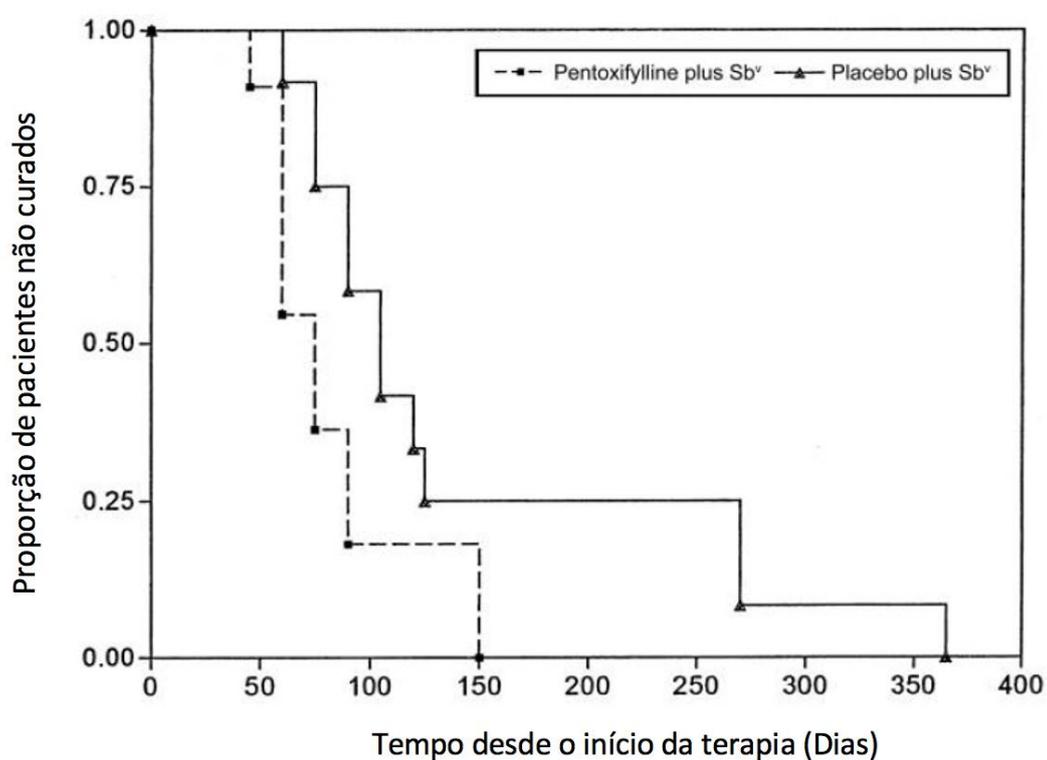
A resposta de cura clínica, foi avaliada, conforme definido por cicatrização total da mucosa (Figura 8). No grupo pentoxifilina, nove (82%) de 11 pacientes foram curados em 90 dias, após o início da terapia. No mesmo período, apenas cinco (41,6%) de 12 pacientes no grupo placebo foram curados durante este mesmo tempo. A avaliação no dia 120 e no dia 150, após o início do tratamento não mostrou nenhum caso de doença ativa no grupo da pentoxifilina, mas cinco pacientes no grupo placebo não alcançaram a cura e necessitaram de um segundo curso de antimonial pentavalente ($P = 0,037$ / Tabela 3). Pacientes que foram tratados com pentoxifilina mais antimonial pentavalente foram curados significativamente mais rápido do que os pacientes que foram tratados com placebo mais antimonial pentavalente (média \pm DP, 83 ± 36 dias vs. 145 ± 99 dias; $P=0,049$).



CIE, concha inferior esquerda; CID, concha inferior direita; S, septo

Figura 8 - Cicatrização total da mucosa e perfuração septal após 90 dias do início da terapia com pentoxifilina mais antimônio pentavalente (Sb^V)

Uma curva de Kaplan-Meier (Figura 9) mostra que a proporção de pacientes que continuou com a doença foi significativamente maior no grupo controle que no grupo da pentoxifilina ($P = 0,047$, pelo teste de log-rank). Nenhuma recaída foi documentada durante o período de acompanhamento de, pelo menos, 2 anos após o final do tratamento.



($P = 0,047$, pelo teste log-rank; e $P = 0,031$, pelo teste de Wilcoxon).

Figura 9 - Estimativas de Kaplan-Meier da proporção de pacientes não curados com tratamento com pentoxifilina mais antimônio pentavalente (Sb^V) ou placebo mais tratamento com Sb^V

Efeitos adversos leves foram observados com mais frequência no Grupo antimônio pentavalente (Sb^v) mais pentoxifilina, incluindo náuseas (três pacientes); artralgia (um paciente); e tontura, dor abdominal e diarreia (um paciente). No grupo placebo, um paciente queixou-se de anorexia, náuseas e mialgias. Nenhum paciente do estudo descontinuou o tratamento por causa de efeitos adversos.

5.4 ESTUDO 4 (ANEXO D)

A amostra foi composta por 44 participantes, 22 em cada grupo, todos do sexo masculino, com média de idade entre $57,59 \pm 6,49$ aos participantes com sequelas de LM e $35,13 \pm 11,28$ aos participantes com sequelas de LC.

Dos 22 pacientes com LM, 21 (95,45%) tiveram acometimento nasal, e que 72,72% apresentavam lesões apenas no nariz (Tabela 4). Os sinais e sintomas mais encontrados durante o período da doença foram crostas nasais (86,36%), perfuração septal (40,90%), epistaxe (36,36%), obstrução nasal (31,81%), rinorreia (27,27%), anosmia (13,3%), colapso da pirâmide nasal I (9,09%), hiposmia (4,54%) e disfonia (4,54%).

Tabela 4 - Localização das lesões de pacientes com leishmaniose, antes do tratamento medicamentoso

| Local das lesões | Leishmaniose Mucosa | |
|--------------------|---------------------|-------|
| | N | % |
| Nariz | 16 | 72,72 |
| Nariz+Boca | 1 | 4,54 |
| Nariz+Faringe | 3 | 13,63 |
| Boca+Faringe | 1 | 4,54 |
| Nariz+Faringe+Boca | 1 | 4,54 |

Legenda: N: número de participantes; %: Porcentagem

A comparação dos resultados da escala RASATI entre os grupos com LM e LC antes da fonoterapia apresentou resultados estatisticamente significantes, com 27,7% dos participantes com LM, apresentando astenia na qualidade vocal, indicando que essa característica está mais frequentemente associada à LM (Tabela 5).

Após a aplicação da técnica do som nasal, os participantes de ambos os grupos apresentaram redução do grau de rouquidão, embora os pacientes com sequela de LC tenham apresentado redução maior do que os com sequela de LM, com resultados estatisticamente significantes (Tabela 5).

Tabela 5 - Comparação dos parâmetros perceptivos-auditivos entre os grupos com Leishmaniose Mucosa e Cutânea, antes e depois da aplicação de técnica vocal

| | Leishmaniose Mucosa | | | | | | | | Leishmaniose Cutânea | | | | | | | | p-valor | | |
|---------------|---------------------|----|------|----|------|---|------|---|----------------------|----|------|----|------|---|------|---|---------|---|---------|
| | 0 | | 1 | | 2 | | 3 | | 0 | | 1 | | 2 | | 3 | | | | |
| | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | |
| ANTES | R | 6 | 27,3 | 7 | 31,8 | 4 | 18,2 | 5 | 22,7 | 11 | 50 | 6 | 27,3 | 5 | 22,7 | 0 | 0 | | 0,087 |
| | A† | 6 | 27,3 | 5 | 22,7 | 7 | 31,8 | 4 | 18,2 | 13 | 59,1 | 4 | 18,2 | 5 | 22,7 | 0 | 0 | | 0,077 |
| | S | 19 | 86,4 | 2 | 9,1 | 1 | 4,5 | 0 | 0 | 22 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0,223 |
| | A | 16 | 72,7 | 1 | 4,5 | 5 | 22,7 | 0 | 0 | 21 | 95,5 | 1 | 4,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0,048* |
| | T | 16 | 72,7 | 4 | 18,2 | 1 | 4,5 | 0 | 0 | 17 | 77,3 | 2 | 9,1 | 3 | 13,6 | 0 | 0 | | 0,511 |
| | I | 18 | 81,8 | 4 | 18,2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 45,5 | 8 | 36,4 | 4 | 18,2 | 0 | 0 | | 0,023* |
| | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | p-valor |
| DEPOIS | R | 10 | 45,5 | 8 | 36,4 | 4 | 18,2 | 0 | 0 | 11 | 50 | 10 | 45,5 | 1 | 4,5 | 0 | 0 | | 0,479 |
| | A† | 6 | 27,3 | 10 | 45,5 | 6 | 27,3 | 0 | 0 | 18 | 81,8 | 4 | 18,2 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0,000* |
| | S | 21 | 95,5 | 1 | 4,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 22 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 1,000 |
| | A | 17 | 77,3 | 4 | 18,2 | 1 | 4,5 | 0 | 0 | 21 | 95,5 | 1 | 4,5 | 0 | | 0 | 0 | | 0,185 |
| | T | 18 | 81,8 | 4 | 18,2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 | 63,6 | 1 | 4,5 | 1 | 04,5 | 0 | 0 | | 0,345 |
| | I | 20 | 90,9 | 2 | 9,1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 | 63,6 | 6 | 27,3 | 2 | 9,1 | 0 | 0 | | 0,083 |

Legenda Teste exato de Fisher. * Valor estatisticamente significativo ($p < 0.05$). N: número de pacientes. %: Percentagem.

R: Rouquidão; †A: Aspreza; S: Soprosidade; A: Astenia; T: Distensão; I: Instabilidade.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

As descrições anteriores do envolvimento da mucosa nasal na leishmaniose utilizaram apenas a rinoscopia anterior para examinar a maioria dos casos. Existem poucos estudos em que um exame otorrinolaringológico completo foi realizado (Zajtchuk et al., 1989). Em estudo anterior, Guerreiro et al. (2000) chamaram a atenção para o fato de que o acometimento da mucosa, em elevado percentual dos casos, ocorria na forma de lesões múltiplas, isso influenciava a evolução do quadro clínico da doença e a resposta terapêutica. No presente estudo 1 (anexo A), um sistema de estadiamento para a doença da mucosa foi proposto com base na aparência e localização das lesões. Do ponto de vista clínico, as diferentes etapas são distintas. Mas, como houve relação entre a duração da doença e seu estágio, diferentes estágios podem representar distintas fases da doença, sendo as formas mais graves encontradas nos pacientes que têm a doença há mais tempo e que não responderam ao tratamento. O fato de que a correlação de Spearman foi 0,64 e não atingiu 1 pode indicar que outros fatores também estão envolvidos na progressão da doença.

O estadiamento da doença tem implicações clínicas e científicas importantes. Do ponto de vista clínico, é provável que o estágio caracterize melhor a gravidade da lesão e possa ser uma forma mais útil de julgar a resposta à terapia. Pacientes com lesões ativas nos estágios IV e V têm formas mais graves da doença, portanto, devem ser tratadas de forma mais

agressiva. Do ponto de vista científico, o sistema de estadiamento pode ser importante para ensaios clínicos. Sugerimos que a randomização do paciente leve em consideração o estágio da doença, de modo que formas semelhantes de doença da mucosa sejam incluídas nos diferentes grupos de estudo.

A maioria dos estudos imunológicos em pacientes com leishmaniose tegumentar enfatiza a resposta mediada por células, enquanto poucas investigações concentraram-se no papel das imunoglobulinas na proteção ou gravidade da doença. A maioria dos estudos envolvendo esta última área, está preocupada com o uso de anticorpos em testes sorológicos para fins diagnósticos da leishmaniose. Para investigar associações entre a gravidade da doença mucosa e níveis elevados de anticorpos contra o antígeno solúvel de *Leishmania braziliensis*, nosso estudo 2 (Anexo B) comparou os títulos de IgG total, IgG1 e IgG2 no soro de pacientes com LM e LC.

Interessantemente, documentamos uma associação entre alto níveis de anticorpos anti-*Leishmania* IgG total e IgG1 com estágios mais avançados de LM, o que sugere a participação de anticorpos na gravidade da doença, ou que a detecção/titulação do anticorpo representa um marcador de gravidade. Os anticorpos podem participar na patologia da leishmaniose por meio de dois mecanismos: 1- Opsonização, que aumenta captação do parasita por macrófagos e, conseqüentemente, aumenta a carga do parasita dentro dessas células; 2- Aumento da citotoxicidade mediada por anticorpos, ou seja, taxas mais altas de morte de macrófagos infectados levam à liberação de antígenos de *Leishmania* (Barral-Netto et al.,

1995). Ambos os mecanismos podem resultar em aumento na resposta inflamatória e danos aos tecidos.

A leishmaniose mucosa, causada predominantemente por *L. braziliensis*, é tratada com Sb^v, que é o tratamento medicamentoso padrão, mas a alta taxa de falha do tratamento e a taxa de recidiva da doença é um grande problema (Franke, 1990; Netto, 1990). A anfotericina B é um tratamento eficaz para a leishmaniose mucosa, mas os graves efeitos adversos e a necessidade de internação para administração do medicamento aumentam o custo e limitam seu uso, sobretudo nas áreas rurais onde a leishmaniose mucosa ocorre com maior frequência. Portanto, o desenvolvimento de um tratamento mais eficaz para a leishmaniose mucosa é um objetivo importante. Nosso ensaio clínico randomizado, duplo-cego e controlado por placebo (estudo 3 – Anexo C) demonstrou que a pentoxifilina combinada com antimônio pentavalente (Sb^v) acelera significativamente o tempo de cicatrização da leishmaniose mucosa. Além disso, os pacientes com leishmaniose mucosa que foram tratados com esta combinação, experimentaram uma taxa de cura de 100% com um curso de tratamento, em comparação com a taxa de cura de 58% observada no grupo controle. Não foram observadas recidivas precoces de leishmaniose durante um seguimento mínimo de 2 anos.

Sabe-se que a duração da doença e a intensidade da resposta inflamatória também podem influenciar as respostas terapêuticas. Neste estudo, não houve diferenças significativas observadas entre os dois grupos (Sb^v + Pentoxifilina e Sb^v + Placebo) em relação à duração da doença,

gravidade da doença e resposta inflamatória, medida pelo teste cutâneo de *Leishmania* de hipersensibilidade retardada. Estudo anterior envolvendo hamsters com infecção por *Leishmania vianna panamensis* mostrou que a infecção em animais machos resultou em lesões significativamente maiores e gravidade da doença (Travi et al., 2002). Embora em nosso estudo, houvesse mais pacientes do sexo masculino no grupo placebo do que no grupo da pentoxifilina, não foi observada diferença estatisticamente significativa, tornando improvável que essa variável tenha influenciado na resposta terapêutica.

A evidência do papel da resposta imune na patogênese da leishmaniose cutânea e mucosa tem implicações para a terapia dessas doenças infecciosas. Está claro que uma resposta imune do tipo Th1 com produção de IFN- γ e a síntese de óxido nítrico por macrófagos é necessária para matar espécies de *Leishmania* (Ribeiro-de-Jesus et al., 1988). No entanto, os pacientes com leishmaniose mucosa desenvolvem doença apesar de uma forte resposta imune celular (Carvalho et al., 1985). Há evidências de que o dano tecidual observado na leishmaniose mucosa está relacionado a uma resposta imune não modulada com aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e falta de função efetora ou reguladora pelas citocinas, como a IL-10 (Bacellar et al., 2002). O conceito de que a infecção por *L. braziliensis* pode desencadear uma resposta imune intensa e persistente com um nível não modulado e elevado de um componente pró-inflamatório sugere um papel para imunomoduladores na terapia da leishmaniose. Além disso, agentes que afetam sobretudo o sistema

imunológico, como o fator estimulador de colônias de granulócitos/macrófagos e pentoxifilina, aceleram o tempo de cicatrização da leishmaniose cutânea (Almeida et al., 1999; Santos et al., 2004) e curam a leishmaniose mucosa refratária à terapia com Sb^V (Lessa et al., 2001), respectivamente. Nosso estudo 3 (Anexo C) estendeu o uso de pentoxifilina à forma mais grave de leishmaniose com doença grave da mucosa.

A pentoxifilina é uma metilxantina que foi licenciada originalmente nos Estados Unidos da América para o tratamento de doença vascular periférica (Ward, 1987), mas foi usada experimentalmente para uma série de condições inflamatórias (Das et al., 2003; Ustunsoy, 2006). Foi mostrado anteriormente que a pentoxifilina adicionada ao Sb^V é eficaz no tratamento da leishmaniose mucosa que não responde ao tratamento padrão com Sb^V (Lessa et al., 2001). Também houve um relato de dois pacientes que foram tratados com sucesso para leishmaniose cutânea refratária com pentoxifilina adicionada à Sb^V (Bafica, 2003) e a terapia combinada com Sb^V e pentoxifilina foi considerada mais eficaz do que Sb^V sozinha na leishmaniose cutânea do Velho Mundo (Sadeghian, 2006). Nosso estudo 3 (Anexo C), sugere que a pentoxifilina também exerce um papel na terapia de pacientes virgens de tratamento que têm leishmaniose mucosa grave. Como a pentoxifilina é conhecida por diminuir a produção de TNF- α (Doherty, 1991), é possível que esse mecanismo seja responsável pela melhora clínica observada. A inibição da produção de TNF- α também é uma abordagem terapêutica no controle do eritema nodoso hansênico, onde o uso de pentoxifilina também tem sido indicado (De Carsalade, 2003). Em nosso

estudo aberto envolvendo 10 pacientes com leishmaniose mucosa, cuja doença era refratária, a pelo menos três cursos anteriores de terapia com Sb^v, observou-se que a pentoxifilina mais Sb^v diminuiu significativamente os níveis de TNF- α e resultou na cura em nove pacientes (Lessa et al., 2001). O presente estudo 3 (Anexo C), estendeu a utilidade terapêutica desta combinação de tratamento para leishmaniose mucosa grave não tratada anteriormente.

Em nosso estudo 4 (Anexo D), mesmo sem encontrar sequelas de lesões laríngeas, os pacientes com LM apresentaram distúrbios vocais causados por sequelas em outros locais. Esse achado pode ser explicado pelo fato de a produção vocal depender da harmonia entre a respiração, fonação e ressonância. Não podemos afastar, entretanto, a influência da idade nesse grupo de pacientes.

Quando analisadas as características vocais perceptivo-auditivas dos pacientes com LM, evidenciou-se a associação estatisticamente significativa da astenia de grau 2 (27,7%). Mesmo sem significância estatística, constatou-se que os participantes com LM também apresentaram qualidade vocal marcada por rouquidão de grau 1 (31,8%), aspereza grau 2 (31,8%), soprosidade grau 1 (9,1%); tensão grau 1 (18,2%) e instabilidade grau 1 (18,2%). Foi possível observar que, mesmo sem significância estatística, os participantes com LM, após a fonoterapia, não apresentaram mais soprosidade e tensão de grau 2. Dos 22,7 % dos participantes com astenia de grau 2, apenas 4,5% continuaram apresentando essa característica e,

quanto à instabilidade, dos 18,2% dos sujeitos que apresentavam grau 1, apenas 9,1 % continuaram a apresentar esse mesmo achado.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- A) A observação clínica de pacientes com diferentes graus de evolução da leishmaniose mucosa, desde o estágio inicial até os casos mais graves, permitiu a proposição de uma classificação da doença em cinco estágios, variando desde a presença de lesões nodulares mucosas sem ulcerações até um estágio avançado, caracterizado pela destruição da arquitetura nasal e alterações na estrutura facial.
- B) A associação dos títulos de anticorpos antileishmania com a gravidade da doença mucosa sugere que estes podem participar da patogênese da doença ou se constituem marcadores das formas graves da LM.
- C) A pentoxifilina, quando adicionada ao antimônio pentavalente, pode resultar em uma taxa de cura mais alta e um tempo de cicatrização mais rápido para as lesões da mucosa. A pentoxifilina associada ao antimônio pentavalente é, portanto, uma escolha terapêutica para pacientes com leishmaniose mucosa que apresentam formas avançadas da doença.
- D) Mesmo sem sequelas de lesões laríngeas, pacientes com LM podem apresentar distúrbios vocais causados por sequelas em outros locais. A intervenção fonoterapêutica beneficia a voz desses pacientes.

8 ANEXOS

ANEXO A

ESTUDO 1



NIH Public Access

Author Manuscript

Trans R Soc Trop Med Hyg. Author manuscript; available in PMC 2013 June 01.

Published in final edited form as:

Trans R Soc Trop Med Hyg. 2012 June ; 106(6): 376–381. doi:10.1016/j.trstmh.2012.03.007.

A proposed new clinical staging system for patients with mucosal leishmaniasis

Hélio A. Lessa^a, Marcus M. Lessa^a, Luiz Henrique Guimarães^a, Clara Mônica F. Lima^a, Sergio Arruda^a, Paulo R. Machado^a, and Edgar M. Carvalho^{a,b}

^aServiço de Imunologia, Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil

^bInstituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais, Salvador, BA, Brazil

Abstract

Mucosal leishmaniasis occurs mainly in areas where *Leishmania braziliensis* is transmitted. It affects predominantly the nasal mucosa and, in more severe forms, can lead to significant tissue destruction. There is no standard method for grading the severity of disease. We categorised 50 patients with mucosal leishmaniasis according to a proposed clinical staging system. Their age ranged from 10 to 86 y (mean \pm SD: 36 \pm 16 y) and 43 (86%) patients were male. The different degrees of evolution of mucosal disease, from the initial stage to the more severe long-term cases, enabled mucosal leishmaniasis to be graded into five stages. Stage I is characterised by nodular lesions of the mucosa without ulcerations. Stage II is represented by superficial mucosal ulcerations with concomitant fine granular lesions. Stage III is characterised by deep mucosal ulcerations with granular tissue formation. In stage IV there are irreversible lesions leading to perforation of the cartilaginous nasal septum with necrosis. In stage V the nasal pyramid is compromised with alterations of facial features as a consequence of severe tissue destruction. These stages may be useful in characterising the severity of the lesion and optimising the therapeutic outcome.

Keywords

Leishmaniasis; Mucosal leishmaniasis; Disease stage; Nasal mucosa; Nose diseases; Brazil

© 2012 Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Correspondence to: Edgar M. Carvalho.

Present address: Serviço de Imunologia, 5^o andar, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Rua João das Botas, s/n, 40110160, Canela, Salvador, BA, Brazil. Tel.: +55 71 3237 7353; fax: +55 71 3245 7110. edgar@ufba.br, imuno@ufba.br

Authors' contributions: HAL, MML and EMC conceived and designed the study; HAL, MML, CMFL and SA analysed the data; HAL, MML, LHG, SA, PRM and EMC interpreted the data; HLA, MML, CMFL and SA drafted the manuscript; HAL, MML, LHG, PRM and EMC critically revised the manuscript for intellectual content. All author read and approved the final manuscript. EMC is guarantor of the paper.

Competing interests: None declared.

Ethical approval: The study was approved by the Ethics Committee of the Professor Edgard Santos University Hospital, Salvador, BA, Brazil.

Publisher's Disclaimer: This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final citable form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

1. Introduction

Leishmaniasis has been documented in many countries, with an estimated worldwide prevalence of 12 million cases and 1–1.5 million new cases of the disease reported annually. American tegumentary leishmaniasis is endemic in Brazil and most of Latin America.¹

Tegumentary leishmaniasis is more frequent than the visceral form of the disease and is characterised, in its classic form, by the presence of a clearly delineated skin ulcer with raised edges.^{1–3} Nearly 3% of patients diagnosed with cutaneous leishmaniasis (CL), living in an area of *Leishmania braziliensis* transmission, will concomitantly or subsequently develop mucosal disease.⁴ The nasal mucosa is the primary location for lesions caused by *L. braziliensis* in mucosal leishmaniasis (ML), and lesions may spread beyond the nasal mucosa to the upper airways and digestive tract of humans (larynx and pharynx). However, the preferential site of disease is the cartilaginous nasal septum and frontal portions of the nasal fossa.^{5,6} Due to variable involvement of the mucosa, patients with ML present with different clinical symptoms and have different therapeutic responses depending on the severity of lesions.^{7,8} For clinical studies and for evaluation of response to treatment, it is necessary to standardise the diverse stages of ML. Based on complete endoscopic otolaryngological examinations we attempted to categorise ML into five stages, ranging from the presence of a mucosal nodular lesion without ulcerations to a stage characterised by the destruction of nasal architecture with gross facial alterations.

2. Patients and methods

2.1. Patient selection

Fifty patients diagnosed with ML in the health post of Corte de Pedra participated in the study. This is a known area of *L. braziliensis* transmission, located in southeast Bahia, Brazil. Participants in the study were enrolled between January 1996 and December 1998 and also between January 2005 and December 2008. Eligible patients were those with a typical mucosal lesion of leishmaniasis, a positive skin test for *Leishmania* antigen, and either isolation of the parasite or histopathological findings characteristic of ML. All patients had signs of active disease. After obtaining signed informed consent, each patient was clinically evaluated. In all cases, clinical background information was collected and physical and otolaryngological examinations were carried out. During the physical examination, special attention was given to the identification of scars compatible with past CL disease. All patients had signs of active disease and were treated with i.v. pentavalent antimony (Sb^v) for 30 d (20 mg/kg/body weight).

2.2. Otolaryngological examination

An otolaryngological examination was carried out on all CL patients with nasal complaints, including runny nose, epistaxis or nasal obstruction. It was also performed on all patients who presented with disseminated leishmaniasis or those with facial lesions, as an association has been demonstrated between ML and disseminated forms of CL involving the face.⁹ This examination led to the diagnosis of ML in 50 patients.

The complete endoscopic otolaryngological examination included an inspection of the anterior and posterior nose, as well as the nasopharynx and the oropharynx, using a 3.2 mm flexible endoscope. For patients suspected of having more widespread lesions, endoscopies of the pharynx and larynx were performed with a 70° 8 mm rigid endoscope.

3. Results

Analysis of the 50 patients revealed five clear stages of ML (Table 1): 2 (4%) were stage I, 18 (36%) were stage II, 6 (12%) were stage III, 22 (44%) were stage IV and 2 (4%) were stage V. The stage of the lesions ranged from nasal nodulation without ulceration to superficial ulceration, deep ulceration and perforation of the septum. In the initial stage the disease is characterised by nodular lesions without ulcerations normally along the cartilaginous septum (Kiesselbach area), nasal floor and lateral wall (specifically on the tip of the inferior nasal conchae) (Figure 1A). Patients with stage I disease can be asymptomatic or have mild symptoms. In this study, patients classified as stage I had mild symptoms like non-bloody rhinorrhea and some nasal obstruction. Asymptomatic patients are often identified only because of systematic otolaryngological examination of patients with disseminated CL and of patients with lesions on the face.

Eighteen (36%) of the patients had fine granular lesions, characterised by superficial ulcerations observed at the anterior septum, inferior conchae and the floor of the nasal fossa (Figure 1B). In stage II, a few bleeding lesions were observed. Clinically, patients may complain of bloody rhinorrhea and nasal obstruction.

In stage III (deep ulceration stage) the tissue reaction was more intense, with clearly visible tissue granulation and mucosal infiltration, which thickened the nasal septum (Figure 1C). Bloody crusts were observed on the septum, inferior conchae and floor of the nasal fossa. These lesions were characterised by excessive fragility and bled easily when the mucosa was touched. Clinically, patients may complain of a painful sensation in the nasal pyramid. Bloody rhinorrhea, discharge of bloody clots and important nasal obstruction are a common complaint at this stage of disease. In some cases, oedematous infiltration of the nasal pyramid can be observed.

Stage IV is characterised by necrosis of cartilage in the anterior septum and in some cases the nasal columns can be compromised. It is at this stage that the cartilaginous septum is perforated with an accentuated infiltration of the posterior septum (Figure 1D). Clinically, the patient may complain of bloody rhinorrhea, discharge of bloody clots and nasal obstruction.

In its more advanced phases (stage V) total destruction of the nasal columns may occur and the tip of the nose may collapse. The dorsal region of the nasal pyramid is sometimes perforated. In some cases, total destruction of the anterior septum may occur, leaving the entire column exposed and sealing the nose (Figure 2). Extensive crusts with a bloody appearance can be observed due to a widened nasal cavity, represented by the destruction of the cartilaginous septum and inferior conchae. The intensity of the inflammatory process and the subsequent tissue destruction can, therefore, interfere significantly with facial structure. Interestingly, we did not observe myiasis, despite extensive exposure of the internal nasal structures. Clinically, the patient may complain of bloody rhinorrhea, discharge of bloody clots, nasal obstruction and destruction of nasal architecture.

All patients in this study had active lesions. However it is important to point out that stages IV and V can be present in both the active and inactive forms of mucosal disease. In other words, stage IV and stage V can also be seen in patients with the inactive forms of mucosal disease, as the septal perforation and destruction of nasal architecture are still present even after treatment and resolution of the active lesions.

The characteristic location of the lesion and the stage of the disease in the 50 ML patients studied are presented in Table 2. The age of the patients ranged from 10 to 86 y with a mean and SD of 36 ± 16 y. The majority (94%) were adults; two patients were 12 y old and one

patient was 10 y old. Forty-three patients (86%) were male and 7 (14%) were female. Of the three children with the disease, two were female. The duration of the mucosal disease ranged from 1 mo to 44 y.

A correlation between duration of lesion (symptom) and disease stage was observed, $r=0.6406$ and $p<0.0001$ (Figure 3). Ninety-two mucosal lesions were documented in the 50 patients: nasal septum, 43; nasal floor, 9; lateral nasal wall, 19; rhinopharynx, 3; oropharynx and palate, 16; and larynx, 2.

A history of cutaneous lesions with evidence of an active cutaneous lesion or the presence of scarring was observed in 46 (92%) patients. Although the majority of cutaneous lesions (54.2%) were located in the lower extremities, 44.6% of the cutaneous lesions were documented on the head, trunk and upper extremities.

Although biopsies were obtained for diagnosis in all patients we were able to recover material and perform a systematic histopathological analysis in only 14 patients. The degree of inflammation was determined by the frequency of lymphocytes, monocytes and plasma cells. Moreover presence and degree of necrosis and epithelium destruction was evaluated. There was no major difference regarding chronic inflammation in stages II, III and IV. However epithelium destruction and necrosis were more evident in patients classified as stage III and IV (Figure 4)

4. Discussion

Previous studies have shown that CL and ML predominate in adult males.^{10,11} However, an increasing higher number of cases in children, as well as in both sexes, have been documented.¹² These findings suggest changes in disease transmission pattern, reinforcing the current importance of peridomiciliary and intradomiciliary transmission.¹² In our case series, the majority of patients were adult males although it is interesting to note that two of the three children with ML were female.

Previous description of the involvement of the nasal mucosa in leishmaniasis used only anterior rhinoscopy to examine most cases.^{13,14} Few studies exist in which a complete otolaryngological examination was carried out.¹⁵ Radiological evaluation of patients with ML has shown erosion of the nasal septum, deformity of the nasal pyramid and alterations of the nasal conchae.¹⁶ In a previous study, we called attention to the fact that mucosal involvement, in a high percentage of cases, occurred in the form of multiple lesions, and that this influenced the clinical evolution of the disease and therapeutic response.⁸ In the present study, a staging system for mucosal disease is proposed based on both the appearance and location of lesions. From a clinical viewpoint, the different stages are distinct. However, as there was a relationship between duration of the disease and its stage, different stages may represent different phases of the disease, with the more severe forms being found in patients who have had the disease for longer periods and who have not responded to treatment. The fact that Spearman's correlation was 0.64 and did not reach 1 may indicate that other factors are also involved in disease progression.

The staging of disease has important clinical as well as scientific implications. From a clinical viewpoint, the stage is likely to better characterise the severity of the lesion and may be a more useful way of judging response to therapy. Because patients with stage IV and V disease with active lesions have more severe forms of the disease, they must be treated more aggressively. We have used a combination of antimony with pentoxifylline or amphotericin B for these patients.^{17,18} Although there was no association between the stage of the disease and the number of treatment courses of antimonial used, therapeutic failure and the need to

use pentoxifylline and amphotericin B occurred predominantly in the patients at stages IV and V of the disease.

From a scientific viewpoint, the staging system may be important for clinical trials. We suggest that patient randomisation takes into account the stage of the disease so that similar forms of mucosal disease are included in the different study groups.

5. Conclusion

Observations of patients with different degrees of evolution of mucosal leishmaniasis, from the initial stage to the more severe end-stage cases, allowed us to categorise the disease into five stages, ranging from the presence of mucosal nodular lesions without ulcerations to an advanced stage characterised by the destruction of nasal architecture and alterations in facial structure.

Acknowledgments

We acknowledge Elbe Silva for secretarial assistance of in the preparation of the manuscript, Ednaldo Lago for assistance with the patient selection and Michael Sundberg who reviewed the text.

Funding: This study was supported the US National Institutes of Health grant # AI-30639.

References

1. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004; 27:305–18. [PubMed: 15225981]
2. Weigle K, Saravia NG. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol.* 1996; 14:433–50. [PubMed: 8889321]
3. Carvalho EM, Barral A, Costa JML, Bittencourt AL, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 1994; 56:315–25. [PubMed: 8023755]
4. Jones TC, Johnson WD, Barreto AC, et al. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J Infect Dis.* 1987; 156:73–83. [PubMed: 3598227]
5. Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Lago EL, et al. Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia-Brazil. An area of *Leishmania braziliensis braziliensis* transmission. III - Mucosal disease presentation and initial evolution. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1984; 17:179–86.
6. Lessa H, Carvalho EM, Marsden PD. Eustachian tube blockage with consequent middle ear infection in mucosal leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1994; 27:103. [PubMed: 8073152]
7. Franke ED, Wignall FS, Cruz ME, et al. Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis. *Ann Intern Med.* 1990; 113:934–40. [PubMed: 2173461]
8. Guerreiro JB, Cruz AA, Barral A, Lessa HA, Rocha H, Carvalho EM. Mucosal leishmaniasis: quantitative nasal cytology as a marker of disease activity and indicator of healing. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2000; 109:89–94. [PubMed: 10651420]
9. Turetz ML, Machado PR, Ko AI, et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis.* 2002; 186:1829–34. [PubMed: 12447770]
10. Sampaio RNR, Rocha RAA, Marsden PP, Cuba CC, Barreto AC. American cutaneous leishmaniasis: experience of the UNB hospital. *An Bras Dermat.* 1980; 55:69–76.
11. Llanos Cuentas EA, Cuba CC, Barreto AC, Marsden PD. Clinical characteristics of human *Leishmania braziliensis braziliensis* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1984; 78:845–6. [PubMed: 6533860]
12. Follador I, Araujo C, Cardoso MA, et al. Outbreak of cutaneous leishmaniasis, Santo Amaro, Bahia (Brazil). *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999; 32:497–503. [PubMed: 10881082]
13. Barbosa JER. Statistical data on cases of mucosal leishmaniasis observed in the ENT service of Santa Casa de San Paulo. *Rev Oto-Laringologica de São Paulo.* 1936; 4:697–723.

14. Klotz O, Lindenberg H. The pathology of leishmaniasis of the nose. *Am J Trop Med.* 1923; 3:117–41.
15. Zajchuk JT, Casler JD, Netto EM, et al. Mucosal leishmaniasis in Brazil. *Laryngoscope.* 1989; 99:925–39. [PubMed: 2671555]
16. Camargo RA, Tuon FF, Sumi, et al. Mucosal leishmaniasis and abnormalities on computed tomographic scans of paranasal sinuses. *Am J Trop Med Hyg.* 2010; 83:515–18. [PubMed: 20810813]
17. Machado PR, Lessa H, Lessa M, et al. Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 2007; 44:788–93. [PubMed: 17304449]
18. Lessa HA, Machado P, Lima F, et al. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 65:87–9. [PubMed: 11508396]

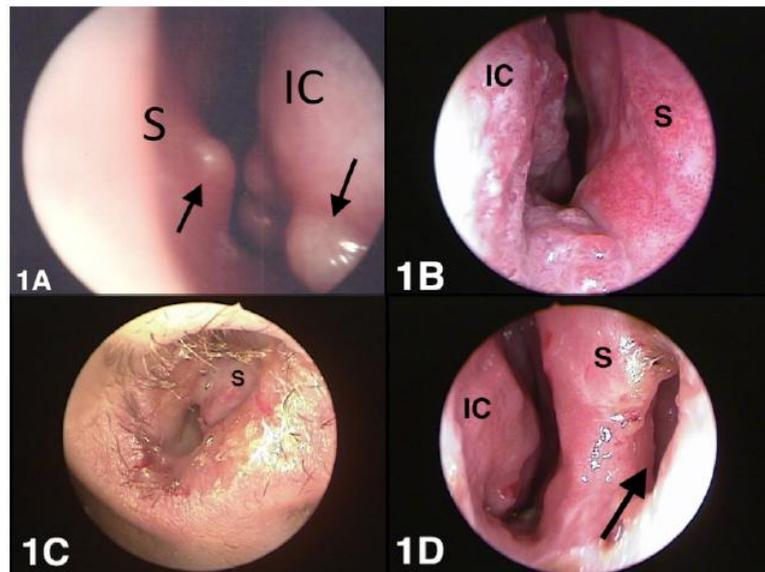


Figure 1.

Clinical aspects of mucosal leishmaniasis at different stages of the disease. (A) Nodular lesions (arrows) without ulcerations along the tip of the inferior nasal conchae and nasal septum (stage I). (B) Fine granular lesions, characterised by superficial ulcerations observed at the inferior conchae and the floor of the nasal fossa (stage II). (C) Deep ulceration stage with more intense tissue reaction and clearly visible tissue granulation and mucosa infiltration (stage III). (D) Cartilaginous nasal septum is perforated (arrow) with a visible tissue granulation and mucosa infiltration of the posterior nasal septum and inferior conchae (stage IV active form). IC: inferior conchae; S: septum.



Figure 2.
Total destruction of the anterior septum sealing the nose (stage V). The patient gave informed consent for images taken during the study to be published.

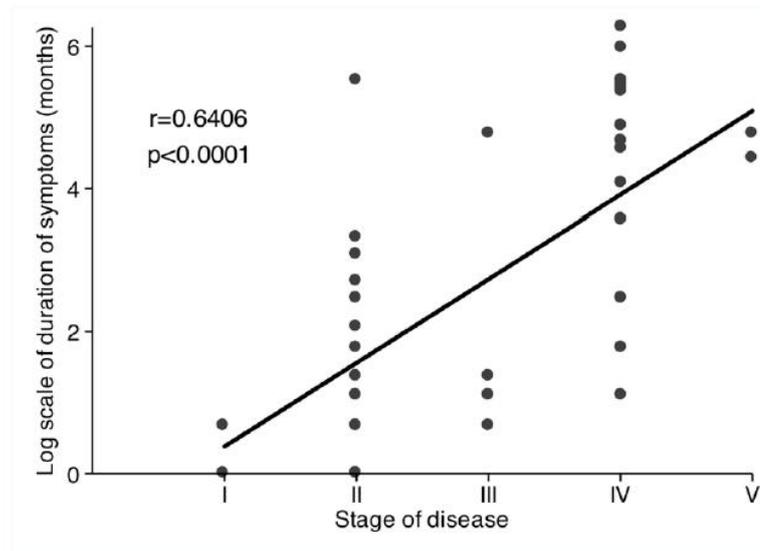


Figure 3. Correlation between time of symptom (log scale) and stage of disease, (some points overlap).

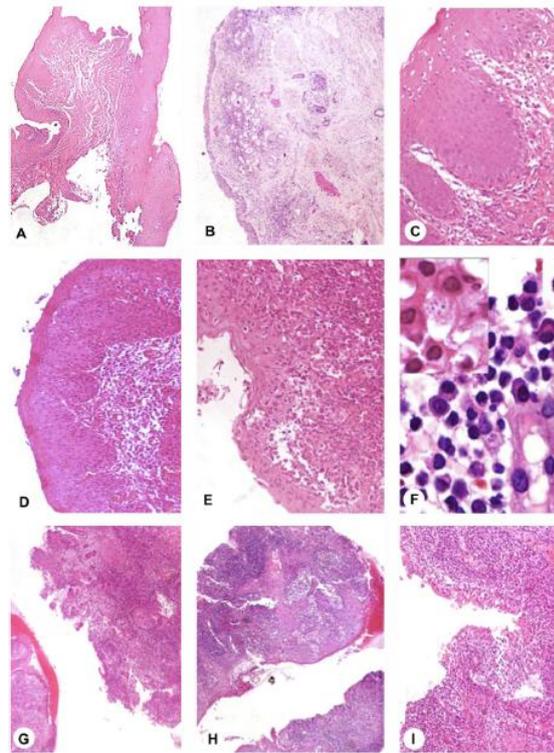


Figure 4. Histopathological analysis of biopsies from patients with mucosal leishmaniasis (ML). (A) 4 \times , (B) 4 \times and (C) 20 \times biopsy from patient with nasal mucosal lesion stage I. (D) 10 \times and (E) 20 \times biopsy from patient stage II. (F) 100 \times detail of inflammatory infiltrate composed of lymphocytes, plasma cells, vessel and macrophages containing *Leishmania* amastigotes (arrows). (G) 4 \times , (H) 4 \times and (I) 10 \times patient with ML stage IV. ML clinical stage I and II are less inflamed without epithelium destruction. In stage IV the inflammation is higher with focus of necrosis and epithelium disruption.

Table 1

A proposed new clinical staging system for patients with mucosal leishmaniasis

| Stage | Clinical observations in nasal mucosal disease |
|-------|--|
| I | Nodulation without ulcerations |
| II | Superficial ulcerations |
| III | Deep ulcerations |
| IV | Septum perforation |
| V | Destruction of nasal architecture and altered facial structure |

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

NIH-PA Author Manuscript

Table 2
 Characteristics of mucosal disease in 50 patients diagnosed with mucosal leishmaniasis

| Age (y) | Gender | Duration of mucosal disease | Location of mucosal lesions | Stage |
|-----------------|--------|-----------------------------|--|-------|
| 18 | M | 1 mo | Nasal septum | I |
| 31 | F | 2 mo | Nasal septum and oropharynx | I |
| 47 | M | 1 mo | Nasal vestibule and nasal lateral wall | II |
| 15 | M | 1 mo | Nasal septum | II |
| 12 | F | 1 mo | Nasal septum | II |
| 34 | M | 1 mo | Nasal floor and septum | II |
| 28 | M | 2 mo | Nasal vestibule and nasal lateral wall | II |
| 55 | M | 2 mo | Nasal septum and soft palate | II |
| 46 | M | 3 mo | Nasal septum | II |
| 38 | M | 3 mo | Nasal septum | II |
| 60 | M | 4 mo | Nasal vestibule, nasal lateral wall and septum | II |
| 43 | M | 4 mo | Nasal septum and inferior conchae | II |
| 21 | M | 6 mo | Nasal septum | II |
| 44 | M | 8 mo | Nasal septum and inferior conchae | II |
| 45 ^a | M | 12 mo | Inferior conchae | II |
| 23 | F | 15 mo | Nasal septum | II |
| 16 | M | 22 mo | Nasal septum and inferior conchae | II |
| 30 | M | 28 mo | Nasal septum and inferior conchae | II |
| 26 | M | 28 mo | Inferior conchae | II |
| 58 ^b | M | 21 y | Floor of the nasal fossa | II |
| 20 | M | 2 mo | Nasal septum and inferior conchae | III |
| 32 | M | 3 mo | Nasal septum, inferior conchae and soft palate | III |
| 23 | M | 3 mo | Nasal floor, septum and nasal lateral wall | III |
| 32 | M | 4 mo | Nasal septum and inferior conchae | III |
| 31 | M | 4 mo | Nasal septum and soft palate | III |
| 69 | M | 10 y | Inferior conchae and oropharynx | III |
| 43 | M | 3 mo | Nasal septum | IV |
| 29 | M | 6 mo | Nasal septum, soft palate and larynx | IV |
| 19 | M | 6 mo | Nasal floor and septum | IV |
| 12 | M | 6 mo | Nasal septum and oropharynx | IV |
| 10 | F | 12 mo | Nasal floor and septum | IV |
| 29 | M | 12 mo | Nasal septum and inferior conchae | IV |
| 38 | M | 3 y | Nasal septum and inferior conchae | IV |
| 44 | F | 3 y | Nasal floor and septum | IV |
| 31 | M | 5 y | Nasal septum | IV |
| 14 | M | 8 y | Nasal septum and soft palate | IV |
| 33 | F | 8 y | Nasal floor, septum and inferior conchae | IV |
| 33 | M | 9 y | Nasal septum | IV |
| 47 | M | 9 y | Nasal septum | IV |

| Age (y) | Gender | Duration of mucosal disease | Location of mucosal lesions | Stage |
|---------|--------|-----------------------------|--|-------|
| 86 | M | 11 y | Nasal septum and soft palate | IV |
| 36 | M | 11 y | Nasal septum | IV |
| 33 | M | 18 y | Nasal septum, soft palate | IV |
| 35 | M | 19 y | Nasal septum | IV |
| 59 | M | 20 y | Nasal septum, rhinopharynx and soft palate | IV |
| 41 | M | 21 y | Nasal septum and nasal lateral wall | IV |
| 30 | M | 21 y | Nasal septum, inferior conchae, rhinopharynx, larynx, soft and hard palate | IV |
| 40 | M | 33 y | Nasal floor, Nasal septum, rhinopharynx and soft palate | IV |
| 60 | F | 44 y | Nasal septum, soft palate | IV |
| 64 | M | 10 y | Nasal septum, soft palate | V |
| 39 | M | 7 y | Nasal septum and soft palate | V |

M: male, F: female.

^a Patient with disseminated cutaneous leishmaniasis.

^b Patient had a history of 41 y since the first cutaneous lesion and had received three courses of antimony during the last 20 y due to relapse of the mucosal disease.

ANEXO B

ESTUDO 2



High Anti-*Leishmania* IgG Antibody Levels Are Associated With Severity of Mucosal Leishmaniasis

Clara Mônica F. de Lima^{1,2}, Andrea S. Magalhães¹, Rúbia Costa¹,
Carolina C. Barreto¹, Paulo R. L. Machado^{1,2,3}, Edgar M. Carvalho^{1,2,3,4},
Marcus M. Lessa^{1,2} and Lucas P. Carvalho^{1,2,3,4*}

OPEN ACCESS

Edited by:
Izabel Gaiardo Demarchi,
Federal University of
Santa Catarina, Brazil

Reviewed by:
Diego Luis Costa,
University of São Paulo, Brazil
Paulo Marcos Matta Guedes,
Federal University of Rio Grande do
Norte, Brazil

***Correspondence:**
Lucas P. Carvalho
carvalhojp76@gmail.com

Specialty section:
This article was submitted to
Parasite and Host,
a section of the journal
Frontiers in Cellular and
Infection Microbiology

Received: 13 January 2021
Accepted: 16 March 2021
Published: 09 April 2021

Citation:
de Lima CMF, Magalhães AS,
Costa R, Barreto CC, Machado PRL,
Carvalho EM, Lessa MM and
Carvalho LP (2021) High Anti-*Leishmania* IgG Antibody Levels
Are Associated With Severity
of Mucosal Leishmaniasis.
Front. Cell. Infect. Microbiol. 11:652956.
doi: 10.3389/fcimb.2021.652956

¹Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil,
²School of Medicine, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde - Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil,
³Ministry of Sciences and Technology, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais, INCT-DT,
Salvador, Brazil, ⁴Laboratório de Pesquisas Clínicas (LAPEC), Instituto Gonçalo Moniz (IGM), Fiocruz, Salvador, Brazil

Background: Mucosal leishmaniasis (ML), the most inflammatory form of tegumentary leishmaniasis, is predominantly caused by *Leishmania braziliensis*. The disease is characterized by the development of lesions, mainly in the nasal mucosa. An exacerbated inflammatory response has been associated with the presence of destructive and disfiguring lesions, with stages of severity ranging from small nodulations to the complete destruction of the nasal pyramid architecture. As *Leishmania* is an intracellular parasite, most immunological studies have emphasized the cell-mediated immune response, while relatively few studies aimed to investigate the role antibodies in protection against, or the pathology of ML.

Methods: Patients with a confirmed diagnosis of ML were classified according to clinical staging criteria. Serum levels of *Leishmania*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibodies were determined by ELISA before and after treatment with antimony or antimony plus pentoxifylline.

Results: Patients in stages IV and V produced higher concentrations of IgG and IgG1 antibodies when compared to those in stage I and II. Significant reductions were seen in the concentrations of IgG and IgG2 antibodies in most patients who responded well to treatment.

Conclusions: Our data demonstrate an association between IgG antibody titers and the severity of mucosal disease. The observed reduction in antibody production after successful treatment in most patients preliminarily indicates that these tests can be used to aid in the assessment of therapeutic response.

Keywords: mucosal leishmaniasis, antibodies, IgG subclasses, *Leishmania braziliensis*, therapeutic failure

INTRODUCTION

American tegumentary leishmaniasis (ATL) is widely distributed around the world, and often presents high morbidity due to the possibility of developing destructive lesions that can disfigure and disable individuals, significantly impacting their quality of life (World Health Organization - Control of Leishmaniasis, 2010). In endemic areas of *Leishmania braziliensis* transmission, mucosal leishmaniasis (ML), a disease also known as mucocutaneous leishmaniasis, occurs in 3% of patients concomitantly or following the cure of cutaneous leishmaniasis (CL). ML can also be caused by other *Leishmania* species, such as *Leishmania amazonensis* and *Leishmania guaianensis* (Grimaldi et al., 1987). In about 15% of cases, no previous history or scarring due to CL is documented (Boaventura et al., 2006; Miranda Lessa et al., 2007). Moreover, up to 40% of patients with an emergent disease termed disseminated cutaneous leishmaniasis (DL) have mucosal involvement (Carvalho et al., 1994). While ML primarily affects the nasal mucosa (90% of cases), the second most affected site is the pharyngeal mucosa, followed by the laryngeal mucosal and oral cavity (Marsden, 1994; Miranda Lessa et al., 2007). Importantly, the involvement of these latter areas is an indicator of disease severity (Marsden, 1994; Miranda Lessa et al., 2007). Our group proposed staging criteria (I to V) for patients who only have nasal mucosal involvement. Stage I is characterized by nodulation in the absence of ulceration in the mucosa of the nasal septum; stage II: superficial ulceration; stage III: deep ulceration; stage IV: nasal septum perforation; stage V: destruction of the nasal pyramid architecture (Lessa et al., 2012).

As *Leishmania* is an intracellular parasite, the role of the innate and T cell responses in the pathogenesis of disease has been widely studied. Lymphocytes from ML patients were found to be more proliferative than those from CL patients when stimulated with *Leishmania* antigens (Carvalho et al., 2007), and the production of cytokines/chemokines by macrophages and T cells, such as TNF, IFN- γ and CXCL9, was observed to be higher in ML compared to CL (Bacellar et al., 2002; Junqueira Pedras et al., 2003). The impairment in regulatory mechanisms that may attenuate the immune response also play an important role in the exaggerated inflammatory response observed in ML, as Cells from ML patients produce less IL-10 and its receptor than those from CL. The role of antibodies in *Leishmania* has not been completely elucidated. High levels of antibodies are produced in all clinical forms of leishmaniasis, and high levels of IgG and IgE antibodies are found in ML (Junqueira Pedras et al., 2003).

In the present study, we observed that antibodies against *Leishmania* antigens were associated with ML severity, and the data suggest that therapeutic success may be associated with decreases in antibody levels.

MATERIALS AND METHODS

Study Design

A longitudinal study was performed to investigate the association between IgG titers and disease severity, as well as response to therapy in ML patients. Clinical stages were determined upon

ENT examination and classified from stages I to V according to the criteria established by Lessa et al. (2012). The production of anti-*Leishmania* antigens antibodies was determined before and after therapy. Treatment was considered successful upon the complete re-epithelization of nasal cavity lesions (clinical cure).

Study Area and Patients

This study received approval (CAAE: 01229212.0.0000.0049) from the Institutional Review Board of the Professor Edgard Santos University Hospital (HUPES-UFBA), Salvador, Bahia-Brazil. This study was carried in an area endemic for CL, Corte de Pedra, located in southeastern Bahia, Brazil. This region is home to a municipal clinic that houses a reference center for tegumentary leishmaniasis diagnosis and treatment. Diagnosis was based on the presence of nodules and ulcers in the nasal mucosa, and by the presence of *Leishmania* DNA as confirmed by PCR (Weirather et al., 2011). Twenty-seven ML patients were enrolled in this study, six of whom received pentavalent antimony alone (20 mg/Kg/day for 30 days), while 21 patients were treated with a combined regimen consisting of pentavalent antimony with pentoxifylline (1200 mg/day orally for 30 days). To evaluate serological test specificity using a soluble antigen of *Leishmania braziliensis* (SLA) in patients with ML, serum from 25 patients with cutaneous leishmaniasis (CL) were used as controls. Clinical and serological evaluations were performed in ML patients prior to and 90 days following the onset of therapy.

Soluble *Leishmania* Antigen

A *L. braziliensis* strain (MHOM/BR/2001), isolated from a patient with ML, was used to prepare soluble *Leishmania* antigen by sonication and centrifugation, as previously described (Reed et al., 1986). SLA was used at a concentration of 5 μ g/mL, after testing negative for endotoxins using the Limulus amoebocyte lysate test.

Detection of Anti-*Leishmania* IgG Antibodies by ELISA

Peripheral blood from ML patients was added to a dry tube for serum separation and stored at -20°C. Polystyrene plates were sensitized with 5 μ g/well of soluble *Leishmania* antigen in carbonate/bicarbonate buffer and incubated overnight at 4°C. To block unspecific antibody binding, 1% bovine albumin (BSA) in PBS was added for 1 hour at 37°C. Sera (1:50 dilution) from patients and healthy controls were added and incubated for 1 hour at 37°C. Peroxidase-conjugated monoclonal anti-human IgG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), or monoclonal anti-human IgG1 and IgG2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were then added. After each step described above, 4-7 washes were performed with phosphate buffered saline containing 0.05% Tween 20. Finally, the enzyme substrate Tetramethylbenzidine (TMB) was added, and after 15 minutes the reaction was quenched with 2N H₂SO₄. Readings were performed on a microplate reader at a wavelength of 450 nm, and results were expressed as optical density (OD). The cut off values (total IgG is

0.395; IgG1 0.042; IgG2 0.159) were established by taking into account the mean + 3 standard deviations of absorbance readings from healthy subjects.

Detection of Cytokines in Serum

Serum was obtained from peripheral blood from 15 ML patients. Determination of IFN- γ and TNF concentrations were performed by ELISA (BD biosciences) according to the manufactures instructions. The results are expressed in pg/ml.

Statistical Analysis

Non-parametric testing involved the Kruskal-Wallis and Wilcoxon signed-rank tests, for comparisons of continuous variables using GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Statistical differences were considered when p values were less than 0.05.

RESULTS

Twenty-seven patients with ML and 25 with CL were enrolled in this study. Due to the small number of patients classified as stage I or V, patients were divided into three groups: Stages I and II (40.7%), stage III (25.9%) and stages IV and V (33.4%). Regarding sex, males were predominant in most groups, although no statistical significant difference was found between groups. We also found no difference in the frequency of individuals that reached cure within 90 days after therapy initiation, between groups. Ninety-six percent of patients with ML had previous CL lesion whereas no CL patients had history of leishmaniasis.

Titers of IgG antibodies are known to increase in active CL and visceral leishmaniasis, and decrease after cure (Fagundes-Silva et al., 2012). Since ML is the most inflammatory form of tegumentary leishmaniasis, we first wanted to investigate whether there were differences among IgG titers between ML

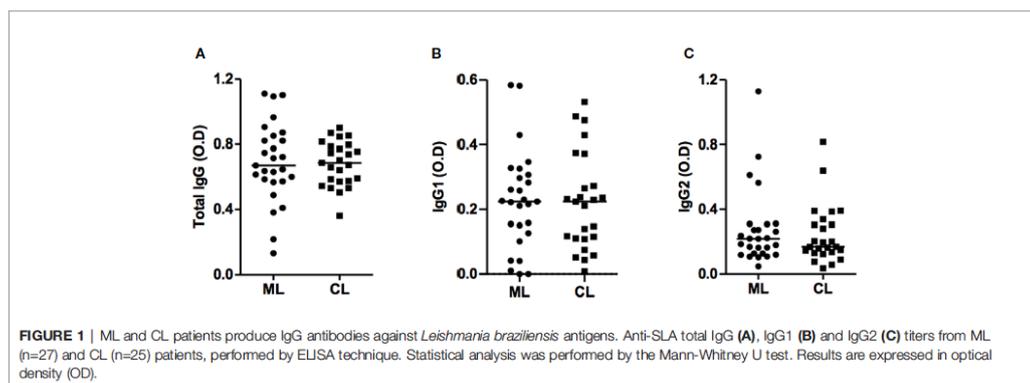
and CL patients and found no differences in total IgG, IgG1 and IgG2 titers between these groups (Figure 1). We also examined antibodies levels among ML patients in different stages of disease. Interestingly, patients on stages IV and V presented high titers of total IgG and IgG2 when compared to those in stages I and II (Figure 2).

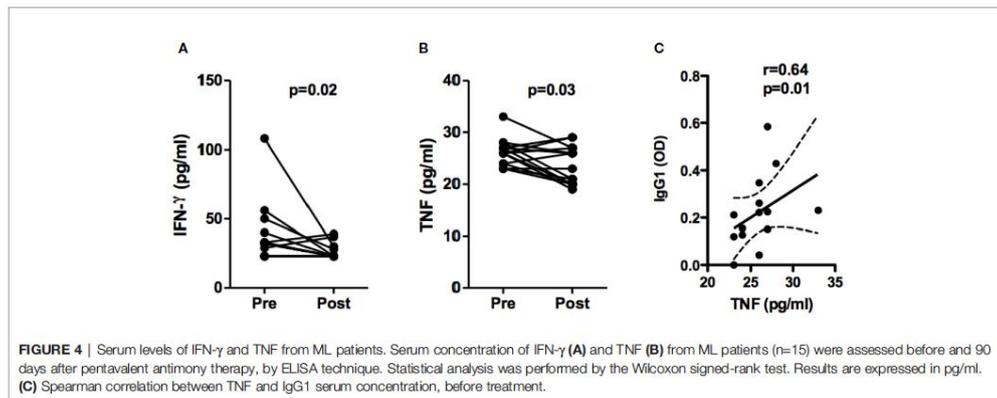
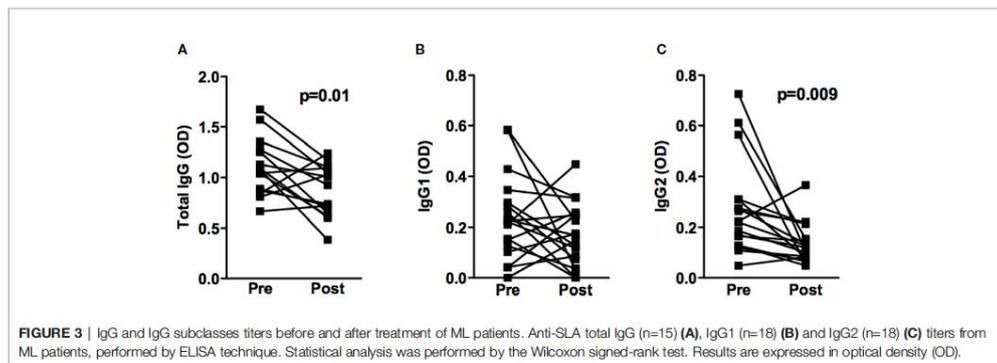
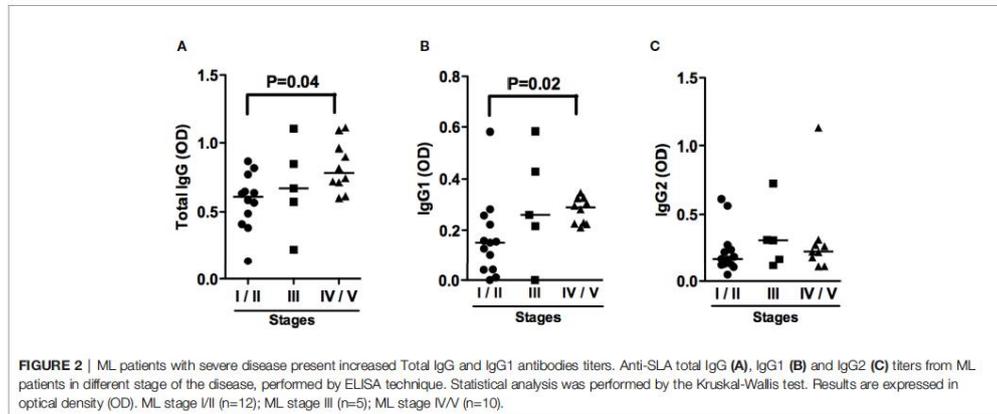
To determine whether reduced antibody production was associated with a successful therapeutic response, the titers of *Leishmania*-specific IgG, IgG1 and IgG2 were determined before and 90 days following the onset of therapy in 18 ML patients. Reductions were observed in the absorbance of total IgG, in 73% of patients, and IgG2, in 89% of patients who successfully responded to antimonial treatment (Figure 3). Interestingly, increase in the levels of IgG, IgG1 and IgG2 was observed in the three individuals that failed therapy.

We have previously documented that mononuclear cells from ML patients produce high levels of IFN- γ and inflammatory cytokines in response to *Leishmania* antigens (Bacellar et al., 2002). It is known that IFN- γ induces IgG2 production and IgG induces TNF in monocytes through Fc γ III (Kawano and Noma, 1996; Chouchakova et al., 2001; Chakraborty et al., 2021). Here we found that serum levels of IFN- γ and TNF in ML patients are increased during disease and decreases after treatment, and a positive correlation between pre-treatment TNF and pre-treatment IgG1 serum levels was observed (Figure 4).

DISCUSSION

Although ML, which predominantly affects the nasal mucosa, only occurs in less than 5% of individuals with American tegumentary leishmaniasis, its importance is recognized by the potential to develop destructive nasal lesions, which could then spread to the face. Also, high rates of treatment failure have been documented, not only using pentavalent antimony, but also in response to other leishmanicidal drugs, such as amphotericin B and miltefosine (Soto et al., 2005; Machado et al., 2010). We previously showed that the combination of pentoxifylline with





antimony increases ML cure rates and cures patients refractory to antimony. The high rate of cure observed herein stands in agreement with a previous study in which pentavalent antimony in association with pentoxifylline resulted in 100% of included ML patients evolving to cure (Machado et al., 2007).

Most immunological studies in patients with tegumentary leishmaniasis place emphasis on the cell-mediated response, while few investigations have focused on the role of immunoglobulins in protection against or severity of disease. The majority of studies involving the latter area, are concerned with the use of antibodies in serological testing leishmaniasis diagnostic purposes. To investigate associations between the severity of mucosal disease and elevated levels of antibodies against soluble *Leishmania braziliensis* antigen, we compared titers of IgG, IgG1 and IgG2 in the sera of patients with CL and ML prior to and following the onset of treatment, but found no differences between these clinical forms.

Interestingly, we documented an association between high levels of anti-leishmania IgG and IgG1 subclass antibodies with more advanced stages of ML, which suggests either the participation of antibodies in disease severity, or that the antibody absorbance represents a marker of severity. Antibodies may participate in the pathology of leishmaniasis by way of two mechanisms: 1- Opsonization, which increases parasite uptake by macrophages and, consequently, increases parasite burden within these cells; 2- Through increased antibody-mediated cytotoxicity, i.e. higher rates of infected macrophage killing lead to the release of *Leishmania* antigens (Barral-Netto et al., 1995). Both mechanisms can result in increases in inflammatory response and tissue damage. IFN- γ is known to induce IgG2 production, and IgG induces TNF through Fc γ III (CD16). We previously documented increase in the frequency of CD16+ circulating monocytes in CL patients and found that CD16+ monocytes are the main source of TNF and IL-1 β in CL patients (Passos et al., 2015; Santos et al., 2018). In the present work we found a positive correlation between systemic concentrations of TNF and IgG1 antibodies, suggesting a contribution of IgG1 to the deleterious inflammatory response and immunopathology observed in ML.

The lack of markers of response to treatment in cutaneous leishmaniasis continues to present challenges to successful therapeutic intervention. Here we documented a drop in the levels of IgG and IgG2 in most ML patients between 60 and 90 days after treatment initiation. Reduced IgG antibody production after cure has also been observed in patients with CL (Schubach et al., 1998; Mendonca et al., 2004). To further investigate the potential applicability of antibodies as markers of therapeutic response in ML, new studies must be conducted involving higher numbers of patients with more extensive timepoint antibody measurements.

One limitation of the present study was the small number of patients evaluated after therapy. However, we were able to clearly demonstrate higher levels of IgG and IgG1 anti-*Leishmania* antibodies in more advanced stages of mucosal nasal disease, in which patients have already developed deep ulcers or septal perforation. Moreover, as the levels of these immunoglobulins

drop in most patients after the onset of therapy, antibody measurements may serve as a biomarker of ML prognosis, as well as be a tool capable of supporting the decision to interrupt follow-up in outpatient settings.

Although current serological diagnostic capabilities cannot differentiate between patients with ML and those with CL, the presently established association between antibody absorbance and clinical disease staging suggests that antibodies do indeed participate in the pathogenesis of ML. In addition, the observed reductions in antibody production after treatment and cure provides a preliminary indication that these tests may prove useful in assessing therapeutic response.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.13415183.v1>.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Professor Edgard Santos University Hospital (HUPES-UFBA), Salvador, Bahia-Brazil. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CL, LC, ML, RC, CC, and EC conceived and designed the study. CL, LC, AM, and RC analyzed the data. CL, LC, AM, and EC interpreted the data. CL, LC, AM, RC, and CC drafted the manuscript. CL, LC, ML, AM, RC, and EC critically revised the manuscript for intellectual content. EC is guarantor of the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This study was supported by the US National Institutes of Health grant AI-136032.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge Ednaldo Lago for providing assistance with the patient selection. The authors also thank Andris K. Walter for English language manuscript revision and copyediting services.

REFERENCES

- Bacellar, O., Lessa, H., Schriefer, A., Machado, P., Ribeiro de Jesus, A., Dutra, W. O., et al. (2002). Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect. Immun.* 70(12), 6734–6740. doi: 10.1128/iai.70.12.6734-6740.2002
- Barral-Netto, M., Barral, A., Brodskyn, C., Carvalho, E. M., and Reed, S. G. (1995). Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 17(1), 21–28. doi: 10.1111/j.1365-3024.1995.tb00962.x
- Boaventura, V. S., Cafe, V., Costa, J., Oliveira, F., Bafica, A., Rosato, A., et al. (2006). Concomitant early mucosal and cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75(2), 267–269. doi: 10.4269/ajtmh.2006.75.267
- Carvalho, E. M., Barral, A., Costa, J. M., Bittencourt, A., and Marsden, P. (1994). Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 56(4), 315–325. doi: 10.1016/0001-706x(94)90103-1
- Carvalho, L. P., Passos, S., Bacellar, O., Lessa, M., Almeida, R. P., Magalhães, A., et al. (2007). Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. *Parasite Immunol.* 29(5), 251–258. doi: 10.1111/j.1365-3024.2007.00940.x
- Chakraborty, S., Gonzalez, J., Edwards, K., Mallajosyula, V., Buzzanco, A. S., Sherwood, R., et al. (2021). Proinflammatory IgG Fc structures in patients with severe COVID-19. *Nat. Immunol.* 22(1), 67–73. doi: 10.1038/s41590-020-00828-7
- Chouchakova, N., Skokowa, J., Baumann, U., Tschernig, T., Philippens, K. M., Nieswandt, B., et al. (2001). Fc gamma RIII-mediated production of TNF-alpha induces immune complex alveolitis independently of CXC chemokine generation. *J. Immunol.* 166(8), 5193–5200. doi: 10.4049/jimmunol.166.8.5193
- Fagundes-Silva, G. A., Vieira-Goncalves, R., Nepomuceno, M. P., de Souza, M. A., Favoreto, S. Jr., Oliveira-Neto, M. P., et al. (2012). Decrease in anti-Leishmania IgG3 and IgG1 after cutaneous leishmaniasis lesion healing is correlated with the time of clinical cure. *Parasite Immunol.* 34(10), 486–491. doi: 10.1111/j.1365-3024.2012.01379.x
- Grimaldi, G. Jr., David, J. R., and McMahon-Pratt, D. (1987). Identification and distribution of New World Leishmania species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36(2), 270–287. doi: 10.4269/ajtmh.1987.36.270
- Junqueira Pedras, M., Orsini, M., Castro, M., Passos, V. M., and Rabello, A. (2003). Antibody subclass profile against Leishmania braziliensis and Leishmania amazonensis in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 47(3), 477–485. doi: 10.1016/s0732-8893(03)00141-x
- Kawano, Y., and Noma, T. (1996). Role of interleukin-2 and interferon-gamma in inducing production of IgG subclasses in lymphocytes of human newborns. *Immunology* 88(1), 40–48. doi: 10.1046/j.1365-2567.1996.d01-634.x
- Lessa, H. A., Lessa, M. M., Guimaraes, L. H., Lima, C. M., Arruda, S., Machado, P. R., et al. (2012). A proposed new clinical staging system for patients with mucosal leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 106(6), 376–381. doi: 10.1016/j.trstmh.2012.03.007
- Machado, P. R., Lessa, H., Lessa, M., Guimaraes, L. H., Bang, H., Ho, J. L., et al. (2007). Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.* 44(6), 788–793. doi: 10.1086/511643
- Machado, P. R., Ampuero, J., Guimaraes, L. H., Villasboas, L., Rocha, A. T., Schriefer, A., et al. (2010). Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania braziliensis in Brazil: a randomized and controlled trial. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4(12), e912. doi: 10.1371/journal.pntd.0000912
- Marsden, P. D. (1994). Mucosal leishmaniasis due to Leishmania (Viannia) braziliensis L(V)b in Tres Bracos, Bahia-Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 27(2), 93–101. doi: 10.1590/s0037-8682199400200007
- Mendonça, M. G., de Brito, M. E., Rodrigues, E. H., Bandeira, V., Jardim, M. L., and Abath, F. G. (2004). Persistence of leishmania parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *J. Infect. Dis.* 189(6), 1018–1023. doi: 10.1086/382135
- Miranda Lessa, M., Andrade Lessa, H., Castro, T. W. N., Oliveira, A., Schriefer, A., Machado, P., et al. (2007). Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* 73(6), 843–847. doi: 10.1016/S1808-8694(15)31181-2
- Passos, S., Carvalho, L. P., Costa, R. S., Campos, T. M., Novais, F. O., Magalhães, A., et al. (2015). Intermediate monocytes contribute to pathologic immune response in Leishmania braziliensis infections. *J. Infect. Dis.* 211(2), 274–282. doi: 10.1093/infdis/jiu439
- Reed, S. G., Badaro, R., Masur, H., Carvalho, E. M., Lorenc, R., Lisboa, A., et al. (1986). Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35(1), 79–85. doi: 10.4269/ajtmh.1986.35.79
- Santos, D., Campos, T. M., Saldanha, M., Oliveira, S. C., Nascimento, M., Zamboni, D. S., et al. (2018). IL-1β Production by Intermediate Monocytes Is Associated with Immunopathology in Cutaneous Leishmaniasis. *J. Invest. Dermatol.* 138(5), 1107–1115. doi: 10.1016/j.jid.2017.11.029
- Schubach, A., Marzochi, M. C., Cuzzi-Maya, T., Oliveira, A. V., Araujo, M. L., Oliveira, A. L., et al. (1998). Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of Leishmania (Viannia) braziliensis persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58(6), 824–827. doi: 10.4269/ajtmh.1998.58.824
- Soto, J., Toledo, J., Vega, J., and Berman, J. (2005). Short report: efficacy of pentavalent antimony for treatment of colombian cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72(4), 421–422. doi: 10.4269/ajtmh.2005.72.421
- Weirather, J. L., Jeronimo, S. M., Gautam, S., Sundar, S., Kang, M., Kurtz, M. A., et al. (2011). Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of Leishmania spp. in human samples. *J. Clin. Microbiol.* 49(11), 3892–3904. doi: 10.1128/JCM.00764-11
- World Health Organization - Control of Leishmaniasis. (2010). *WHO Technical Report Series. Iris - International repository for information sharing.*

Conflict of Interest : The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 de Lima, Magalhães, Costa, Barreto, Machado, Carvalho, Lessa and Carvalho. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

ANEXO C**ESTUDO 3**

MAJOR ARTICLE

Oral Pentoxifylline Combined with Pentavalent Antimony: A Randomized Trial for Mucosal Leishmaniasis**Paulo R. L. Machado,¹ Hélio Lessa,¹ Marcus Lessa,¹ Luiz H. Guimarães,¹ Heejung Bang,² John L. Ho,² and Edgar M. Carvalho¹**¹Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador-Bahia, Brazil; and ²Division of International Medicine and Infectious Diseases of the Department of Medicine, Division of Biostatistics and Epidemiology of the Department of Public Health, Weill Medical College of Cornell University, New York, New York

Background. Mucosal leishmaniasis is associated with intense tissue damage and high tumor necrosis factor- α production. Therapeutic failure occurs in up to 42% of cases; patients who experience treatment failure will require >1 pentavalent antimony (Sb^v) course or alternative drugs to achieve a cure. We previously showed that an inhibitor of tumor necrosis factor- α (pentoxifylline) combined with Sb^v cured 90% patients refractory to monotherapy with Sb^v.

Methods. A double-blind, placebo-controlled trial involving 23 patients with mucosal leishmaniasis evaluated the efficacy of pentoxifylline when administered in association with Sb^v, compared with Sb^v treatment alone. Eleven patients were randomized to receive Sb^v plus oral pentoxifylline for 30 days, and 12 patients received Sb^v plus oral placebo. The criterion for cure was a complete healing of lesions.

Results. All patients in the pentoxifylline group experienced a cure with 1 course of Sb^v, whereas 5 (41.6%) of 12 patients in the placebo group required a second course of Sb^v ($P = .037$). The healing time \pm standard deviation in the pentoxifylline group was 83 ± 36 days, compared with 145 ± 99 days in the placebo group ($P = .049$). No relapses were documented in either group at the 2-year follow-up visit.

Conclusions. The addition of pentoxifylline to Sb^v in mucosal leishmaniasis reduces the healing time significantly and prevents the need for further courses of Sb^v.

Leishmaniasis are protozoan-caused diseases that have worldwide distribution and an overall prevalence of 12 million cases at present [1]. It is estimated that 350 million individuals are at risk for infection with *Leishmania* species, which results in an annual incidence of 1–1.5 million cases of cutaneous leishmaniasis and 500,000 cases of visceral leishmaniasis [1]. In Central and South America, cutaneous leishmaniasis is a major public health problem; in an area of endemicity in south Bahia, Brazil, cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* has an annual rate of incidence of 8.1 cases per 1000 persons [2]. It is estimated that

mucosal leishmaniasis develops in ~3% of all patients who have cutaneous leishmaniasis that is caused by *L. braziliensis*. The mucosal disease is observed concomitantly with or months to years after the cutaneous disease and is characterized by the presence of destructive lesions that predominantly affect the nose [2, 3]. Complications include nasal septum perforation, vocal cord involvement with hoarseness, and deformity of the nasal pyramid. Upper respiratory tract obstruction leading to death has been reported [3]. The standard treatment for mucosal leishmaniasis is high-dose pentavalent antimony (Sb^v; 20 mg per kg of body weight per day for 30 days), [4]; clinical treatment failure occurs in up to 42% of cases [5]. Moreover, relapses may occur in as many as 19% of patients after 3–10 years of follow-up [6]. These patients will require further courses of Sb^v or amphotericin B to achieve cure. Better therapeutic approaches that are associated with lower rates of failure and relapse are essential for the control of mucosal leishmaniasis. Despite the paradigm that a

Received 29 August 2006; accepted 13 November 2006; electronically published 2 February 2007.

Reprints or correspondence: Edgar M. Carvalho, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Serviço de Imunologia, 5^o andar, Rua João das Botas s/n, Canela 40110-160, Salvador-Bahia, Brazil (imuno@ufba.br).

Clinical Infectious Diseases 2007;44:788–93

© 2007 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.
1058-4838/2007/4406-0005\$15.00
DOI: 10.1086/511643

Th1-type immune response is necessary for the control and cure of *Leishmania* infection, cutaneous and mucosal diseases have been considered to be inflammatory reactions that are mediated by host immune response. Evidence for the role of the immune response in the pathogenesis of mucosal leishmaniasis includes (1) the presence of inflammatory infiltrate despite the paucity of parasites in culture or biopsy samples [7], (2) high levels of IFN- γ and TNF- α in PBMCs [8–10] and increased expression of these mediators in tissue [11], and (3) a decreased ability of IL-10 to down-regulate levels of the exaggerated inflammatory response [12]. We have previously shown in an open-label study that 90% of patients who had severe mucosal leishmaniasis that was refractory to Sb³⁺ alone were cured when treated with an inhibitor of TNF- α (pentoxifylline) and Sb³⁺ [13]. The following study is a randomized, double-blind trial comparing standard Sb³⁺ treatment for mucosal leishmaniasis plus a placebo versus Sb³⁺ combined with pentoxifylline. Time to clinical cure, as well as absolute cure rate at 90 days after treatment, were measured. Patients were observed for up to 2 years.

PATIENTS AND METHODS

Study design and patient selection. This randomized, double-blind, placebo-controlled trial involved 23 patients with mucosal leishmaniasis who were living in Corte de Pedra, an area of endemicity of *L. braziliensis* transmission that is located in the southern part of the state of Bahia, Brazil. This site is a reference center for the diagnosis and treatment of cutaneous and mucosal leishmaniasis. The objective of this study was to evaluate the efficacy of the combined therapy of Sb³⁺ with pentoxifylline compared with Sb³⁺ plus placebo for the treatment of mucosal leishmaniasis.

Patients who were eligible for enrollment after providing informed consent were aged 18–65 years and had severe mucosal leishmaniasis (defined as the presence of deep mucosal ulcers and/or septal infiltration or perforation). A clinical diagnosis was confirmed by at least 2 of the following laboratory methods: a positive intradermal skin test result with *Leishmania* antigen, parasite isolation by culture, or histopathological findings characteristic of mucosal leishmaniasis. The *Leishmania* antigen that was used for the intradermal skin test was obtained from a strain of *Leishmania amazonensis* (MHOM-BR-86BA-125); 25 μ g of antigen in 0.1 mL of solution was injected into the skin of the forearm [14]. The indurated area was measured after 48 h, and a reaction was considered to be positive if the measurement was >5 mm in diameter. Patients who had superficial mucosal ulcers (mild mucosal leishmaniasis), prior therapy for mucosal disease, diabetes, or coinfection with HIV, or who were unavailable to follow-up, were excluded from the study. This study was approved by the ethical committee for

research of the Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Salvador-Bahia, Brazil.

Treatment. After consent was obtained, patients were randomized, through the use of a randomization table, to the combined treatment group or the control group. Both the otolaryngologist and participants were blinded to treatment assignment during all the steps of the study, including the follow-up period. Patients with mucosal leishmaniasis received intravenous Sb³⁺ (meglumine antimony; Aventis), at a dosage of 20 mg per kg of body weight per day, plus oral pentoxifylline (Pentox; Farmasa) at a dosage of 400 mg 3 times daily for 30 days. Patients allocated to the control group received the same Sb³⁺ schedule plus oral placebo pills that were formulated to appear identical to pentoxifylline 3 times daily for 30 days. A data safety monitoring committee had access to patient assignment in the event of adverse events. No patient received previous antileishmaniasis treatment.

Efficacy assessments. All patients were evaluated every 30 days by a blinded otolaryngology specialist. The primary end point was cure, defined as complete reepithelization of the mucosal tissue and no evidence of inflammatory activity in the 150 days after initiation of therapy. An interim analysis was performed at 90 days after initiation of therapy. Patients who became worse or who had no change in the characteristics of their lesions received a second course of Sb³⁺. Patients who demonstrated partial but not complete healing at 90 days after initiation of therapy were further evaluated for another 30–60 days, and those who did not experience complete healing underwent another round of treatment. Secondary end points were the healing time of the mucosal lesion and no evidence of relapse after 2 years of follow-up.

Statistical analysis. We adopted nonparametric tests for all statistical analyses because our sample size was not large enough to justify standard asymptotical theories. Patients' characteristics and medical profiles at randomization, as well as during the follow-up period, were summarized by median, mean \pm SD, or percentage, and were compared between the 2 groups using Fisher's exact test (for categorical variables) and the Wilcoxon test or the Mann-Whitney *U* test (for continuous variables). A Kaplan-Meier curve, coupled with the log-rank test, was used to evaluate the rates of cure. Pearson correlation between duration of symptoms and cure status or *Leishmania* skin test reaction size was performed.

RESULTS

All patients who were enrolled in this study had severe mucosal leishmaniasis with nasal involvement that consisted of granulomatous infiltration and septal perforation or deep ulcer (figure 1). Patients who were administered placebo plus Sb³⁺ or pentoxifylline plus Sb³⁺ did not differ in any of the baseline characteristics examined—an indication of the proper imple-

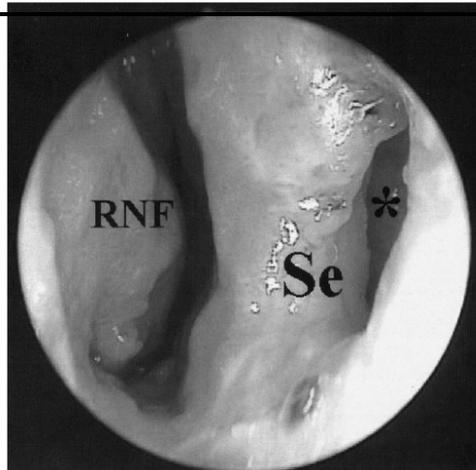


Figure 1. Clinical appearance of mucosal leishmaniasis in a representative case. Mucosal leishmaniasis with granulomatous infiltration in the right nasal fossa and septal perforation in an enrolled patient at time of randomization. *Septal perforation. RNF, right nasal fossa; Se, septum.

mentation of randomization (table 1). The duration of symptoms, mainly characterized by nasal obstruction, was slightly shorter in the group who received combined pentoxifylline plus Sb^v therapy, but it was not significantly different from the control group. To evaluate the influence of the duration of the symptoms on the time to cure, we computed the Pearson correlation coefficient between the duration of symptoms and cure status at 6 months. The correlation coefficient between the duration of symptom and cure status was 0.077 ($P = .75$). Thus, there was no significant association between these factors. The *Leishmania* skin test results had slightly higher values for a larger diameter in the control group (median diameter \pm SD, 25 ± 10 mm) than the pentoxifylline group (mean diameter \pm SD, 19 ± 4 mm), as well as for the corresponding areas of the reaction site (mean area \pm SD, 634 ± 485 mm² vs. 355 ± 166 mm²), but none of these differences are statistically significant. We also evaluated whether the duration of symptoms may correlate with a more intense immunological response of the *Leishmania* skin test as a surrogate marker for host inflammatory response. The Pearson correlation coefficient between the duration of symptoms and the skin test result was 0.15 ($P = .57$).

Next, we evaluated clinical cure response as defined by complete reepithelization of the mucosa (figure 2). In the pentoxifylline group, 9 (82%) of 11 patients were cured within 90 days after onset of therapy. In the same period, only 5 (41.6%) of 12 patients in the placebo group were cured during this time.

Evaluation at day 120 and day 150 after treatment initiation

showed no cases of active disease in the pentoxifylline group, whereas 5 patients in the placebo group did not achieve cure and required a second course of Sb^v ($P = .037$) (table 1). Patients who were treated with pentoxifylline plus Sb^v healed significantly faster than patients who were treated with placebo plus Sb^v (mean \pm SD, 83 ± 36 days vs. 145 ± 99 days; $P = .049$). A Kaplan-Meier curve (figure 3) shows that the proportion of patients who had continued disease was significantly greater in the control group than in the pentoxifylline group ($P = .047$, by the log-rank test). No relapses were documented during the follow-up period of at least 2 years after treatment cessation.

Mild adverse effects were observed more frequently in the Sb^v plus pentoxifylline group, including nausea (3 patients); arthralgias (1 patient); and dizziness, abdominal pain, and diarrhea (1 patient). In the group treated with placebo and Sb^v , 1 patient complained of anorexia, nausea, and myalgias. No patients in either group discontinued treatment because of these adverse effects.

DISCUSSION

For mucosal leishmaniasis caused predominantly by *L. braziliensis* that is treated with Sb^v (which is the standard drug treatment for leishmaniasis), the high treatment failure rate or relapse rate of disease is a major problem [5, 6]. Amphotericin B is an effective treatment for mucosal leishmaniasis, but the severe adverse effects and the need for hospitalization to administer the drug increase the cost and limit its use, particularly in the rural areas where mucosal leishmaniasis occurs most frequently. Therefore, the development of a more effective treatment for mucosal leishmaniasis is a major goal. This randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial demonstrates that pentoxifylline combined with Sb^v significantly accelerates the healing time of mucosal leishmaniasis. In addition, patients with mucosal leishmaniasis who were treated with this combination experienced a 100% rate of cure with 1 course of treatment, compared with the 58% cure rate that was observed in the control group. No early relapses of leishmaniasis were seen during a minimum follow-up duration of 2 years.

Mucosal leishmaniasis has a spectrum of clinical presentation that ranges from nodular lesions to deep ulcers that, when localized in the septum, can lead to perforation. It is known that disease duration and intensity of the inflammatory response may also influence therapeutic responses. In this study, there were no significant differences observed between the 2 groups regarding duration of illness, severity of disease, and inflammatory response measured by the delayed hypersensitivity *Leishmania* skin test. Previous studies involving hamsters with *Leishmania vianna panamensis* infection [15] showed that

infection in male animals resulted in significantly greater lesions and severity of disease. Despite the fact that, in our study, there were more male patients in the placebo group than in the pentoxifylline group, no statistically significant difference was observed, making it unlikely that this variable influenced the therapeutic response.

The evidence for the role of the immune response in the pathogenesis of cutaneous and mucosal leishmaniasis has implications for the therapy of these infectious diseases. It is clear that a Th1-type immune response with IFN- γ production and nitric oxide synthesis by macrophages is necessary to kill *Leishmania* species [8]. Nonetheless, patients who have mucosal leishmaniasis develop disease despite a strong cellular immune response [16]. There is evidence that parasites remain in the host after resolution of disease [17] and that the tissue damage that is observed in mucosal leishmaniasis is related to an unmodulated immune response with increased production of proinflammatory cytokines and a lack of effector or regulatory function by cytokines, such as IL-10 [12]. The concept that *L. braziliensis* infection may trigger an intense and persistent immune response with an unmodulated and heightened level of a proinflammatory component suggests a role for immunomodulators in the therapy of leishmaniasis. Furthermore, agents that primarily affect the immune system, such as granulocyte macrophage colony-stimulating factor and pentoxifylline, have been reported to accelerate the healing time of cutaneous leishmaniasis [18, 19] and to cure mucosal leishmaniasis that is refractory to Sb^v therapy [13], respectively. Our report extends the use of pentoxifylline to the more severe form of leishmaniasis: severe mucosal disease.

Pentoxifylline is a methylxanthine that was originally licensed

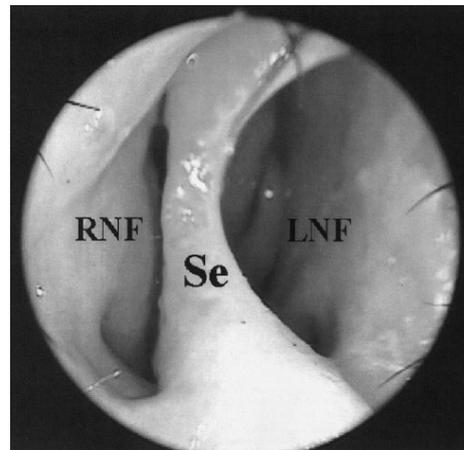


Figure 2. Complete reepithelization of the mucosa and septal perforation in the patient from figure 1 within 90 days after onset of therapy with pentoxifylline plus pentavalent antimony (Sb^v). LNF, left nasal fossa; RNF, right nasal fossa; Se, septum.

in the United States for the treatment of peripheral vascular disease [20], but it has recently been used experimentally for a number of inflammatory conditions [21–23]. We have previously shown that pentoxifylline added to Sb^v is effective in the treatment of mucosal leishmaniasis that is unresponsive to standard Sb^v treatment [13]. There has also been a report of 2 patients who were successfully treated for refractory cutaneous

Table 1. Characteristics and clinical response of patients with mucosal leishmaniasis, by treatment arm.

| Characteristic | Treatment arm | | P ^a |
|---|--|---|----------------|
| | Placebo plus Sb ^v (n = 12) | Pentoxifylline plus Sb ^v (n = 11) | |
| Age in years, median (mean \pm SD) | 40 (42 \pm 14) | 32 (37 \pm 15) | .40 |
| Female patients, % | 8 | 27 | .32 |
| Patients with previous cutaneous leishmaniasis, % | 75 | 64 | .67 |
| Duration of symptoms, months | | | |
| Median (mean \pm SD) | 12 (50 \pm 79) | 6 (18 \pm 36) | .25 |
| Range | 2–240 | 0.5–120 | |
| Leishmania skin test result | | | |
| Largest induration diameter measurement, median mm (mean mm \pm SD) | 22 (25 \pm 10) | 20 (19 \pm 4) | .13 |
| Area, median mm ² (mean mm ² \pm SD) | 451 (634 \pm 485) | 352 (355 \pm 166) | .11 |
| Follow-up, median months (mean months \pm SD) | 27 (28 \pm 9) | 23 (27 \pm 10) | .17 |
| Time to cure, median days (mean days \pm SD) | 105 (145 \pm 99) | 75 (83 \pm 36) | .049 |
| Patients who received a second course of Sb ^v , % | 42 | 0 | .037 |

NOTE. Sb^v, pentavalent antimony.

^a P value was computed using the Mann-Whitney U test and Fisher's exact test for continuous and categorical variables, respectively.

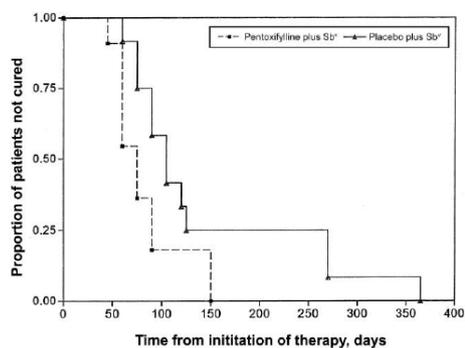


Figure 3. Kaplan-Meier estimates of the proportion of patients not cured with pentoxifylline plus pentavalent antimony (Sb³⁺) treatment or placebo plus Sb³⁺ treatment ($P = .047$, by the log-rank test; and $P = .031$, by the Wilcoxon test).

leishmaniasis with pentoxifylline added to Sb³⁺ [24], and combined therapy with Glucantime (Aventis) and pentoxifylline was considered to be more effective than Glucantime alone in Old World cutaneous leishmaniasis [25]. This report suggests that pentoxifylline also has a role in the therapy of treatment-naïve patients who have severe mucosal leishmaniasis. Because pentoxifylline is known to downregulate TNF- α production [26], it is possible that this mechanism is responsible for the clinical improvement that is observed. The inhibition of TNF- α production is also a therapeutic approach in the control of erythema nodosum leprosum [27], where the use of pentoxifylline has also been indicated [28]. In our open-label study involving 10 patients with mucosal leishmaniasis whose disease was refractory to at least 3 previous courses of Sb³⁺ therapy, we observed that pentoxifylline plus Sb³⁺ significantly decreased TNF- α levels and resulted in a cure in 9 patients [13]. The present study extends the therapeutic usefulness of this treatment combination for previously untreated severe mucosal leishmaniasis. As such, pentoxifylline, when added to Sb³⁺, may result in a higher cure rate and a faster healing time for mucosal lesions. Pentoxifylline combined with Sb³⁺ is, therefore, a therapeutic choice for patients with mucosal leishmaniasis who have advanced forms of the disease.

Acknowledgments

We thank Mrs. Elbe M. Silva for secretarial assistance, Ednaldo Lima do Lago for field assistance, and Drs. Warren Johnson and Daniel Morgan for suggestions and revision of the text.

Financial support. Howard Hughes Medical Institute (International Scholars Research Grant) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia.

Potential conflicts of interest. All authors: no conflicts.

References

- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004;27:305–18.
- Jones TC, Johnson WD Jr, Barreto AC, et al. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J Infect Dis* 1987;156:73–83.
- Marsden PD. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* L(V)b in Três Braços, Bahia-Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1994;27:93–101.
- Berman JD. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Rev Infect Dis* 1988;10:560–86.
- Franke ED, Wignall FS, Cruz ME, et al. Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis. *Ann Intern Med* 1990;113:934–40.
- Netto EM, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, et al. Long-term follow-up of patients with *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection and treated with glucantime. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990;84:367–70.
- Bittencourt AL, Andrade ZA. Immunopathological aspects of mucocutaneous leishmaniasis. *Hospital (Rio J)* 1967;71:975–84.
- Ribeiro de Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 1998;31:143–8.
- Da-Cruz AM, Oliveira MP, De Luca PM, Mendonça SCF, Coutinho SG. Tumor necrosis factor- α in human American tegumentary leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996;91:225–9.
- Castés M, Trujillo O, Rojas ME, et al. Serum levels of tumor necrosis factor in patients with American cutaneous leishmaniasis. *Biol Res* 1993;26:233–8.
- Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceição-Silva F, Modlin RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest* 1993;91:1390–5.
- Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, et al. Up-regulation of Th-1 responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* 2002;70:6734–40.
- Lessa HA, Machado P, Lima F, et al. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am J Trop Med Hyg* 2001;65:87–9.
- Reed SG, Badaró R, Masur H, et al. Selection of a skin test antigen for American cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1986;35:79–85.
- Travi BL, Osorio Y, Melby PC, Chandrasekar B, Arteaga L, Saravia NG. Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp. *Infect Immun* 2002;70:2288–96.
- Carvalho EM, Johnson WD, Barreto E, et al. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J Immunol* 1985;135:4144–8.
- Mendonça MG, de Brito ME, Rodrigues EH, Bandeira V, Jardim ML, Abath FG. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *J Infect Dis* 2004;189:1018–23.
- Almeida R, D'Oliveira A Jr, Machado P, et al. Randomized, double-blind study of stibogluconate plus human granulocyte macrophage colony-stimulating factor versus stibogluconate alone in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 1999;180:1735–7.
- Santos JB, de Jesus AR, Machado PR, et al. Antimony plus recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor applied topically in low doses enhances healing of cutaneous leishmaniasis ulcers: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Infect Dis* 2004;190:1793–6.
- Ward A, Clissold SP. Pentoxifylline: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. *Drugs* 1987;34:50–98.
- Das BK, Mishra S, Padhi PK, et al. Pentoxifylline adjunct improves prognosis of human cerebral malaria in adults. *Trop Med Int Health* 2003;8:680–4.

-
22. Gutierrez-Reyes G, Lopez-Ortal P, Sixtos S, et al. Effect of pentoxifylline on levels of pro-inflammatory cytokines during chronic hepatitis C. *Scand J Immunol* 2006; 63:461-7.
 23. Ustunsoy H, Sivrikoz MC, Tarakcioglu M, Bakir K, Guldur E, Celkan MA. The effects of pentoxifylline on the myocardial inflammation and ischemia-reperfusion injury during cardiopulmonary bypass. *J Card Surg* 2006; 21:57-61.
 24. Bafica A, Oliveira F, Freitas LA, Nascimento EG, Barral A. American cutaneous leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs: successful treatment using combination of N-methylglucamine antimoniate plus pentoxifylline. *Int J Dermatol* 2003; 42:203-7.
 25. Sadeghian G, Nilforoushzadeh MA. Effect of combination therapy with systemic Glucantime and pentoxifylline in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol* 2006; 45:819-21.
 26. Doherty GM, Jensen JC, Alexander HR, Buresh CM, Norton JA. Pentoxifylline suppression of tumor necrosis factor gene transcription. *Surgery* 1991; 110:192-8.
 27. Sarno EN, Grau GE, Vieira IMM, Nery JAC. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. *Clin Exp Immunol* 1991; 84:103-8.
 28. De Carsalade GY, Achirafi A, Flageul B. Pentoxifylline in the treatment of erythema nodosum leprosum. *J Dermatol* 2003; 30:64-8.

ANEXO D

ESTUDO 4

Phonotherapeutic Intervention in Patients With Mucosal Leishmaniasis Sequelae

*Famiely Colman Machado de Machado, [†]Marcus Miranda Lessa, [‡]Carla Aparecida Cielo, [§]Tássia Milenna de Oliveira Souza, [¶]Fernanda Ventin Prates de Souza, ^{||}Camila Sampaio Ribeiro, [¶]Juliana Almeida Silva, [¶]Edgar Marcelino de Carvalho Filho, [¶]Paulo Roberto Lima Machado, ^{**}Thaynara Montagner, ^{##}Mailane Mota Muniz, ^{##}Thalita Nunes Barbosa, ^{**}Daniela Da Silva Gonçalves, and [†]Carolina Cincurá, ^{*†§||¶##}Salvador, [‡]Santa Maria, Brazil, and ^{**}Santa Maria, Rio Grande do Sul

Summary: Purpose. To characterize the voice before and after speech-language intervention, with Humming nasal sound in patients with sequelae Mucosal Leishmaniasis (ML) and Cutaneous Leishmaniasis (CL).

Methods. Collection of phonation /a:/ from 44 patients with ML and CL for perceptual voice analysis and computed acoustic. The Wilcoxon nonparametric test and Fisher's exact test were used, with significance level of 5%.

Results. It was observed, prespeech therapy, that 27.7% of participants with ML presented asthenic vocal quality, and for the acoustics characteristics there was a statistically significant result for measures of frequency, frequency disturbance, noise, and subharmonic measurements, indicating phonatory instability, weakness, and noise emission giving the emission a feeling of vocal weakness. After therapy, the subharmonic segment measurements for the group with ML, showing reduction noise emission. Patients with CL had more grade 1 instability (36.4%), indicating tremor in vocal tract structures. After speech therapy, this group presented a reduction in the degree of roughness and reduction of the frequency disturbance measures, indicating a decrease in tension in the larynx and pharynx.

Conclusion. Even after completing treatment for LM, patients may experience vocal changes due to the sequelae of the disease, like vocal alterations due to nasal lesions or in other locations that interfere in the correct vocal emission. As for participants with CL, no vocal changes would be expected, since these patients present thorax, leg and arm lesions that would not cause problems for the voice. Nevertheless, the two groups of participants presented vocal changes to different degrees before vocal therapy. However, it was observed that patients with ML present vocal alterations with more severe degrees. After the speech-language intervention, the participants of both groups showed vocal improvement, but the group with CL presented more vocal benefits, possibly due to the previous vocal alterations not being so severe.

Key Words: Voice—Mucosal Leishmaniasis—Cutaneous Leishmaniasis—Voice disorders.

INTRODUCTION

Leishmaniasis is an infectious parasitic disease of great concern to public health. Brazilian Northeast suffers a significant incidence of this disease, mainly American Tegumentary Leishmaniasis, although it is possible to find it from the south of the United States to the north of Argentina.^{1–4}

This disease is characterized for having several clinical presentations and can cause disfiguring and disabling lesions with severe psychosocial consequences. There are three classical types of clinical presentation: Mucosal Leishmaniasis (ML), Cutaneous Leishmaniasis (CL) and Disseminated Leishmaniasis.^{2,5}

ML causes destructive lesions of the upper respiratory tract which can cause from a small perforation of the nasal septum to the destruction and collapse of the entire nasal pyramid. Approximately 5% patients healed from CL, develop ML after months or years.^{5–9} Some of the symptoms of this pathology are: nasal obstruction, cough, rhinorrhea and epistaxis. However, these symptoms and the complaints reported by the patients such as dysphagia, odynophagia, dysphonia, dyspnea, depend on the area affected by the LM (mouth, nose, pharynx, and larynx).^{10,11}

Dysphonia, one of the complaints reported by those patients, can significantly impact their quality of life due to communication impairment, which, consequently, affects social and professional relationships.^{12,13} In addition, there is a psychological factor,¹⁴ that can further worsen the quality of life and voice of those patients.¹⁵

Voice rehabilitation of patients with ML can rely on voice therapy programs that significantly benefit communication^{16,17} such as semiocluded vocal tract exercises indicated either in

Accepted for publication December 26, 2018.

Funding: Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia (FAPESB).

Institution where it was held: Health Center Dr Jackson Lemos Costa, Corte de Pedra, Municipality of Tancredo Neves (BA), Brazil.

From the *Graduate Program in Health Science, Federal University of Bahia-UFBA, Salvador, Bahia, Brazil; †Immunology Department, Edgard Santos University Hospital of the Federal University of Bahia-UFBA, Salvador, Bahia, Brazil; ‡Department of Speech-Language Pathology and Post-Graduation Program in Human Communication Disorders, Federal University of Santa Maria-UFSM, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil; §Health Sciences, Federal University of Bahia-UFBA, Salvador, Bahia, Brazil; ¶Gonçalo Muniz Institute (FioCruz-Bahia), Immunology Service at the Edgard Santos University Hospital, Federal University of Bahia-UFBA, Salvador, Bahia, Brazil; ||Immunology Service, Edgard Santos University Hospital of the Federal University of Bahia-UFBA, Salvador, Bahia, Brazil; **Speech Therapist, Federal University of Santa Maria-UFSM, Santa Maria, Rio Grande do Sul.; ††Degree in Speech Therapy, Federal University of Bahia-UFBA, Salvador, Brazil; and the †††Speech Therapist, Federal University of Bahia-UFBA, Salvador, Brazil.

Address correspondence and reprint requests to Famiely Colman Machado de Machado, Graduate Program in Health Science, Federal University of Bahia-UFBA, Avenida Dom João VI, número 378, complemento 03, Salvador, BA 40285-001, Brazil. E-mail: famielycolman@yahoo.com.br

Journal of Voice, Vol. 34, No. 5, pp. 720–731

0892-1997

© 2019 Published by Elsevier Inc. on behalf of The Voice Foundation.

<https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2018.12.015>

cases of voice disorders or in cases of individuals with normal voice but, who pursue voice economy and efficiency.^{18–20}

These exercises are performed by occluding the anterior region of the vocal tract, promoting retroflex resonance toward the vocal folds,¹⁷ which generates increased phonatory comfort and vocal resistance, in addition to reducing laryngeal tension.^{21,22}

An example of these exercises is the nasal sound “humming,” which provokes phonation harmony. This vocal technique ensures adequate interaction between source and filter, minimizing the impact suffered by the vocal folds during emission. With this, the risk of lesions is reduced and resonance and vocal projection are improved.²³ These effects are only possible because of the energy dissipated toward the supralaryngeal cavities. In this way, the vibration generated in the facial tissues will allow lighter phonation due to the relaxation of laryngeal, pharyngeal, and oral structures.^{24,25}

Thus, we intend to verify and compare the auditory perceptual and acoustic vocal characteristics before and after the speech-language intervention, with Humming nasal sound, in patients with sequelae of ML and CL.

Method and patients

Study design

A cross-sectional analytical study, of experimental nature was conducted at the Dr Jackson Lemos Costa Health Clinic located in the village of Corte de Pedra, in the municipality of Tancredo Neves in southeastern Bahia, from February 2016 to May 2017. Patients were divided into two groups (Participants with sequelae of CL) and (Participants with sequelae of ML), with the purpose of characterizing their voices and verifying the vocal changes occurred after the application of vocal technique. To this end, the technique was applied in only one session, where three series of nasal sound were performed, collecting the voice of the participants before and after the technique.

All participants signed an informed free consent term – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido or CF (TCLE; acronym in Portuguese) in accordance to the ethical principles established in Norm 466/12, of the National Committee of Ethics in Research and approved by the Committee of Ethics in Research of COMHUPES-UFBA, under number 43/2015.

Patient selection

All participants selected for the study, according to inclusion and exclusion criteria, had already completed the treatment for Leishmaniasis. After the speech-language evaluations, the participants who presented vocal alterations were referred for vocal treatment, and the patients had the choice to continue the treatment.

Participants were selected according to the following inclusion criteria: aged from 18 years, aiming at avoiding the alterations of the voice change period,^{26,27} to 70 years to include older male patients who are more frequently affected by

ML;^{28,29} participants who had ML and CL, and were diagnosed by parasitology, histology, culture, immunology (provided by the Immunology Service – SIM- of HUPES), and otorhinolaryngology; with concluded medical treatment for leishmaniasis; with sequelae of nasal, buccal, pharyngeal and laryngeal lesions diagnosed by a physician, with or without voice complaints; who signed the TCLE.

As for exclusion criteria, patients with the following characteristics were excluded from the study: smokers, alcohol consumers;^{27,30} those who did not finish the drug treatment for ML or CL, those with history of voice therapy, history of Diffuse, Disseminated or Mucocutaneous (concomitant) Leishmaniasis, those with history of respiratory diseases (bronchitis, asthma, allergic rhinitis, sinusitis); who had the flu on the day of the evaluation; who presented a history of neurological problems;^{27,30} who reported other granulomatous diseases (paracoccidioidomycosis, squamous cell carcinoma, basal cell carcinoma, lymphomas, rhinophyma, rhinosporidiosis, entomophthoromycosis, Wegener granulomatosis, Wirchowian leprosy, tertiary syphilis, tuberculosis, sarcoidosis, and cocaine-induced midline granuloma); who had other laryngeal pathologies (minimal structural changes in the coverage and organic lesions);³⁰ who had traumatic septal perforation or by drug use diagnosed by a physician.³¹

For the performance of exclusion and inclusion criteria it was done anamnesis, including questions on complaints of voice disorders, aspects that could interfere in voice performance or in the execution of the evaluations, use of larynx aggressive agents that could favor the emergence of laryngeal disorders, respiratory diseases, date of American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) diagnosis and voice conditioning through speech-therapy techniques and otorhinolaryngological evaluation, including oroscopy, rhinoscopy, and videolarngoscopy were carried out targeting the identification of laryngeal or other disorders in accordance to the exclusion criteria; and evaluation of the Stomatognathic System of CL patients, who can present facial deformities, observing the posture, mobility and tonicity of these structures

Sample

All participants in this study were enrolled in a post-treatment follow-up list of Leishmaniasis. Patients were called for review via telephone call. At the time of the medical appointment, participants were informed about the research and questioned about their interest in participating in the study.

The sample was composed of 63 participants interested in the research. Participants were numbered and randomized, using the simple random sampling process until reaching a minimum of 44 cases. After being subjected to the inclusion and exclusion criteria, two participants with sequelae of CL were excluded because they did not complete all the examinations and one of them because he presented a nodular lesion on the right vocal fold (Figure 1). On the other hand, only one participant with sequelae of ML was excluded because he presented a granulomatous disease (paracoccidioidomycosis) (Figure 1), and was referred to monitoring and specific treatment.

| Laryngoscopy Characteristics | | |
|--------------------------------------|-----------------------|-------------------------|
| | Mucosal Leishmaniasis | Cutaneous Leishmaniasis |
| N(%) | | |
| Mobility | 22(100%) | 22 (100%) |
| Symmetry | 22 (100%) | 22 (100%) |
| Complete Glottic Coaptation | 21(95,45%) | 19(86,36%) |
| Incomplete Glottic Coaptation | | |
| Irregular Slit | 1 (4,54%) | 2 (9,09%) |
| Triangular posterior Slit | | 1 (4,54%) |
| Presence of Mucosal wave | 22 (100%) | 22 (100%) |
| Supraglottic Activity | 0 (0%) | 0 (0%) |
| Participantes excluidos | | |
| Vocal nodules | | X |
| Paracoccidioidomycosis | X | |

FIGURE 1. Laryngoscopic characteristics of patients with leishmaniasis sequelae.

Thus, four participants were excluded, being necessary to continue the lottery until reaching the n determined by sample size calculation. Therefore, according to sample size calculation assuming a level of significance of 5% (α), a sample power of 80% ($1-\beta$), and a simple random sampling process for the statistical analyses, sample size was 22 participants per group, totaling 44 cases.

Data collection

To collect vowel /a:/ emission, patients were asked to be in orthostatic position and to emit the sound in a sustained manner in usual pitch and loudness, at maximum phonation time and without using the respiratory reserve.^{27,30,32} Emission was recorded in a digital Zoom Model Q3 Handy Recorder professional voice and video recorder, with PCM audio format, quantization of 16 bits, capture frequency of 96 kHz, keeping a mouth-recorder distance of 4 cm and 90°, in a quiet environment.^{27,30,32}

Collection was carried out immediately before and after the complete execution of the Nasal Sound vocal technique, in just one session, performed by the participants in maximum phonation time, in three series of 15 repetitions,^{27,33,34} with a 30-second rest between series, with the patients sitting and in complete silence.^{27,35} The technique was demonstrated and monitored by a speech therapist to avoid incorrect performance.^{27,36,37}

To perform the technique, the participants closed their lips and clenched their teeth. Gradually they opened their teeth only slightly, keeping their jaws relaxed and their tongue on the floor of the mouth. Then they emitted the prolonged “hum” sound, imagining emitting the sound of

the vowel / u /, with perception of the vibration in the mask area (nose/mouth).²³ During the technique, participants were sitting with their feet flat on the floor, an upright spine with no cervical dislocation, with a 90° angle between the chin and the neck, without increasing the muscular contraction of the shoulder girdle, maintaining the constant rhythm between one repetition and another, without making use of the expiratory reserve and, avoiding the fluctuation or variability of pitch and/or loudness.^{27,33,36,38}

Ingestion of 250 ml water was allowed,³⁹ considering a possible vocal tract dryness with increased air flow. However, this did not interfere at the glottic level until the final vowel emission was collected, since water reached the larynx in a systemic way, not interfering with the results of the research.

Concerning vowel /a:/ emission, auditory perceptive evaluation was performed through the RASATI scale that evaluates hoarseness (R), level of roughness (A), breathiness (S), asthenia (A), strain (T) and instability (I), using the following rating scale: 0 = normal: when no voice alteration is perceived by the listener; 1 = slight, when the alteration is evident and 3 = for extreme voice alterations.⁴⁰ This evaluation was conducted by four speech-therapists judges, with expertise in the voice area, who did not participate as authors of this study and were blinded about the purposes of the research. The information that the evaluators received was on the age and gender of the patients, and the recordings were delivered through a file storage and sharing service based on the “cloud computing” concept with individual accounts.³⁰

To this analysis it was carried out an inter-rater agreement through the Kappa coefficient. The interpretation of

the test is as follows: values less than 0 correspond to no agreement; values between 0 and 0.19 represent poor agreement; values between 0.20 and 0.39 correspond to good agreement; values between 0.40 and 0.59 correspond to moderate agreement; values from 0.60 to 0.79 correspond to strong agreement; and values between 0.80 and 1 correspond to an almost perfect agreement.⁴¹ It was observed a strong agreement between the judges, with an index of 0.78. Only the answers of these judges were selected and grouped to the data analysis, due to a greater reliability.

Also, a computed acoustic analysis was performed, using vowel /a:/ emission and the *Multi Dimensional Voice Program Advanced* (MDVPA) from Kay Pentax, in which vocal attack was eliminated and the end of emission discarded so that these stretches did not alter signal analysis, once the ends of prolonged emissions usually present decreases of amplitude and frequency, creating therefore the interval of 5 seconds for the analysis window, which was the smallest sustain time obtained in the group.^{27,30,42}

Threshold values for males proposed by the MDVPA software^{30,33,43} were used as reference of the extracted measures. In addition, the fundamental frequency parameters were analyzed considering the following values as reference of normality: 80 Hz–150 Hz for males.⁴⁴ The measures automatically extracted by MDVPA, with sampling rate of 44 kHz and 16 bits, were the frequency measures: f0; maximum f0 (fhi); minimum f0 (flo); Standard deviation of f0 (STD); frequency perturbation measures: absolute *Jitter* (Jita); *Jitter* percentage (Jitt); pitch relative average perturbation; pitch perturbation quotient (PPQ); smoothed pitch perturbation quotient (sPPQ); variation of f0 (vf0); amplitude perturbation: *Shimmer* in dB (ShdB); *Shimmer* percentage (Shim); amplitude perturbation quotient; smoothed amplitude perturbation quotient; amplitude variation (vAm); noise measures: noise-to-harmonics ratio (NHR);

voice turbulence index (VTI); soft phonation index (SPI); voice break measures: degree of vocal breaks; number of vocal breaks; measures of voiceless or unvoiced segments: number of unvoiced segments (NUV); degree of unvoiced segments; measures of subharmonic segments: degree of subharmonic components (DSH); number of subharmonic components (NSH).^{27,30,43}

Statistical analysis

SPSS 17.0 was used for the statistical analysis, including social-demographic data and clinic characteristics. In addition, to compare de auditory measures before and after applying the vocal technique to the group with sequelae of ML and the comparison between the group with sequelae of CL and ML, Wilcoxon nonparametric test was applied having in mind that 80% of the distributions were not normal, with a level of significance of 5% ($P < 0.05$). On the other hand, Fisher exact test was used to compare the data of the RASATI scale, before and after vocal treatment between groups (ML and CL).

RESULTS

The sample was composed of 44 participants, 22 in each group, all males, with average age of 57.59 ± 6.49 for the participants with sequelae of ML and 35.13 ± 11.28 for the participants with sequelae of CL. All participants were from the rural zone, occupationally active, most of them exerting activities in the field (Table 1).

Of the 22 patients with ML, 72.72% presented lesions on the nose (Table 2), and the symptoms more reported during the illness period were nasal crusts (86.36%), septal perforation (40.90%), epistaxis (36.36%), nasal obstruction (31.81%), rhinorrhea (27.27%), anosmia (13.3%), collapse of the nasal pyramid I (9.09%), hyposmia (4.54%) and

TABLE 1.
Demographic Distribution of Patients With Cutaneous Leishmaniasis and Mucosa

| Variables | Mucosal Leishmaniasis | | Cutaneous Leishmaniasis | |
|--|-----------------------|--------------------|-------------------------|--------------------|
| | N | % | N | % |
| Gender | | | | |
| Female | 0 | 0 | 10 | 45,45 |
| Male | 22 | 100 | 12 | 54,54 |
| Occupation | | | | |
| Farmer | 20 | 90,90 | 16 | 72,72 |
| Bricklayer | 2 | 9,09 | 0 | 0 |
| Housewife | 0 | 0 | 4 | 18,18 |
| Domestic | 0 | 0 | 1 | 4,54 |
| Seamstress | 0 | 0 | 1 | 4,54 |
| Previous history of Leishmaniasis | | | | |
| Yes | 11 | 50 | 6 | 27,27 |
| No | 11 | 50 | 16 | 72,72 |
| Age | | | | |
| Age | Mean | Standard deviation | Mean | Standard deviation |
| | 57,59 | ±6,49 | 38,27 | ±12,84 |

N, number of subjects. %, percentage.

TABLE 2.
Location of Lesions of Patients With Leishmaniasis Before Drug Treatment

| Location of Injuries | Mucosal leishmaniasis | |
|---------------------------|-----------------------|-------|
| | N | % |
| Nose | 16 | 72,72 |
| Nose+Mouth | 1 | 4,54 |
| Nose+Pharynx | 3 | 13,63 |
| Mouth+Pharynx | 1 | 4,54 |
| Nose+Pharynx+Mouth | 1 | 4,54 |

N, number of subjects. %, percentage.

dysphonia (4.54%). Concerning the disease staging degree: 9.52% presented grade I, 28.57% grade II, 23.80% grade III, 28.57% grade IV and 9.52% grade V.

The comparison of the results of the RASATI scale between groups with ML and CL before the speech therapy showed statistically significant results, with 27.7% participants with ML showing the voice quality asthenia, indicating that this characteristic is more frequently associated with ML. In contrast, more patients with CL had instability grade 1 (36.4%) than patients with ML (Table 3).

After applying the nasal sound technique, participants of both groups presented reduction of the grade of hoarseness, although those of the CG presented greater reduction than those of the SG, with statistically significant results (Table 3).

Table 4 shows, that in the comparison of ML with CL before the application of the vocal technique, statistically significant results were obtained for frequency measures (f_{h1}, STD), frequency perturbation measures (vF0), noise

measures (SPI) measures of voiceless or unvoiced segments (NUV), measures of subharmonic segments (NSH), indicating association of these parameters with the group with ML, which presented higher values than the CL group. However, the CL group presented higher SPI (noise measure) to emission than the ML group.

On the other hand, after the speech therapy intervention there was statistically significant reduction of the frequency perturbation measures (PPQ, sPPQ, vF0) for the CL group and of the measures of subharmonic segments (NSH, DSH) and of STD for the ML group.

Table 5 shows the acoustic measures of the MDVPA, before and after applying the vocal technique, only for the group ML, which presented statistically significant reduction of the noise parameters (VTI, NHR), although with increase of the SPI. Moreover, there was increase of the degree of unvoiced segments.

Figure 1 shows the laryngoscopic characteristics of patients with LM and LC sequelae.

DISCUSSION

Throughout Brazilian territory, the predominance of Leishmania (Viannia) brasiliensis⁴⁵ was observed, with a large growth since 2000, with the state of Bahia being the second, after Maranhão, to report⁴⁶ and, on the other hand, the southern region of the country presented the lowest number of cases.⁴⁷

The LM and CL are two of the main clinical forms of LTA, the former being considered simpler than the latter. Some authors have shown that 5%–10% of patients who receive treatment or cure for CL may develop ML.^{5,8}

TABLE 3.
Comparison of Auditory Perceptual Parameters Between the Mucous and Cutaneous Leishmaniasis Groups, Before and After the Vocal Technique

| | | Mucosal Leishmaniasis | | | | | | | | Cutaneous Leishmaniasis | | | | | | | | PValue | |
|----------|----------|-----------------------|------|------|------|------|------|------|------|-------------------------|------|------|------|------|------|---------------|------|--------|---|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 0 | 1 | 2 | 3 | | | | | | | | | | |
| B | R | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | 0,087 | | | |
| | E | 6 | 27,3 | 7 | 31,8 | 4 | 18,2 | 5 | 22,7 | 11 | 50 | 6 | 27,3 | 5 | 22,7 | | 0 | 0 | |
| | F | A [†] | 6 | 27,3 | 5 | 22,7 | 7 | 31,8 | 4 | 18,2 | 13 | 59,1 | 4 | 18,2 | 5 | | 22,7 | 0 | 0 |
| | O | S | 19 | 86,4 | 2 | 9,1 | 1 | 4,5 | 0 | 0 | 22 | 100 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | 0 |
| | R | A | 16 | 72,7 | 1 | 4,5 | 5 | 22,7 | 0 | 0 | 21 | 95,5 | 1 | 4,5 | 0 | | 0 | 0 | 0 |
| A | R | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | 0,023* | | | |
| | F | 10 | 45,5 | 8 | 36,4 | 4 | 18,2 | 0 | 0 | 11 | 50 | 10 | 45,5 | 1 | 4,5 | | 0 | 0 | |
| | T | A [†] | 6 | 27,3 | 10 | 45,5 | 6 | 27,3 | 0 | 0 | 18 | 81,8 | 4 | 18,2 | 0 | | 0 | 0 | 0 |
| | E | S | 21 | 95,5 | 1 | 4,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 22 | 100 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | 0 |
| | R | A | 17 | 77,3 | 4 | 18,2 | 1 | 4,5 | 0 | 0 | 21 | 95,5 | 1 | 4,5 | 0 | | 0 | 0 | 0 |
| I | R | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | 0,083 | | | |
| | T | 18 | 81,8 | 4 | 18,2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 | 63,6 | 1 | 4,5 | 1 | 4,5 | | 0 | 0 | |
| | I | 20 | 90,9 | 2 | 9,1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 | 63,6 | 6 | 27,3 | 2 | 9,1 | | 0 | 0 | |

Fisher's exact test. * Statistically significant values (P < 0.05). N, number of subjects. %, percentage. R, hoarseness; TA, asperity; S, thunder; A, asthenia; T, tension; I, instability.

TABLE 4.
Comparison of Vocal Technique Application Between Cutaneous and Mucous Leishmaniasis Groups Through Acoustic Means of MDVPA

| | ML | | | CL | | | P Value | |
|----------------------------------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|---------|--------|
| | Medium | Q1 | Q3 | Medium | Q1 | Q3 | | |
| B E F O R | F0 | 161,35 | 124,65 | 200,02 | 142,57 | 131,99 | 165,91 | 0,330 |
| | Fhi | 205,89 | 152,49 | 225,67 | 147,19 | 135,29 | 185,18 | 0,017* |
| | Ff0 | 133,67 | 99,26 | 173,60 | 137,84 | 128,59 | 158,62 | 0,734 |
| | STD | 3,63 | 1,93 | 2,17 | 1,75 | 1,27 | 2,24 | 0,003* |
| | Jita | 59,59 | 25,36 | 131,40 | 36,86 | 24,52 | 62,88 | 0,142 |
| | Jitt | 0,93 | 0,38 | 1,74 | 0,52 | 0,36 | 0,91 | 0,119 |
| | RAP | 0,56 | 0,21 | 1,06 | 0,28 | 0,20 | 0,56 | 0,124 |
| | PPQ | 0,52 | 0,21 | 0,98 | 0,28 | 0,21 | 0,50 | 0,121 |
| | sPPQ | 0,86 | 0,59 | 1,91 | 0,66 | 0,48 | 0,86 | 0,051 |
| | vF0 | 1,91 | 0,99 | 5,66 | 1,21 | 0,88 | 1,47 | 0,019* |
| | ShdB | 0,33 | 0,15 | 0,76 | 0,29 | 0,25 | 0,43 | 0,751 |
| | Shim | 3,68 | 1,81 | 8,27 | 3,29 | 2,79 | 4,86 | 0,769 |
| | APQ | 3,14 | 1,91 | 6,37 | 3,19 | 2,63 | 4,76 | 0,805 |
| | sAPQ | 6,27 | 3,45 | 8,46 | 6,25 | 4,33 | 8,47 | 0,664 |
| | vAm | 15,79 | 8,63 | 22,52 | 13,70 | 10 | 18,83 | 0,769 |
| | NHR | 0,15 | 0,12 | 0,22 | 0,13 | 0,11 | 0,15 | 0,074 |
| | VTI | 0,068 | 0,04 | 0,086 | 0,055 | 0,044 | 0,068 | 0,152 |
| | SPI | 4,62 | 3,09 | 6,26 | 7,41 | 5,75 | 9,46 | 0,002* |
| | DVB | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,153 |
| NVB | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,153 | |
| NUV | 0,000 | 0,000 | 12,25 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,031* | |
| DUV | 0,000 | 0,000 | 6,94 | 0,000 | 0,000 | 0,12 | 0,109 | |
| DSH | 0,000 | 0,000 | 1,22 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,206 | |
| NSH | 0,000 | 0,000 | 1,25 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,034* | |
| A F T E R | F0 | 162,94 | 135,425 | 193,33 | 154,75 | 134,92 | 177,37 | 0,330 |
| | Fhi | 168,03 | 139,39 | 211,84 | 156,98 | 139,02 | 185,57 | 0,285 |
| | Ff0 | 138,76 | 107,19 | 180,34 | 151,22 | 131,25 | 169,19 | 0,565 |
| | STD | 2,17 | 1,63 | 3,60 | 1,62 | 1,15 | 2,41 | 0,017* |
| | Jita | 54,04 | 28,66 | 111,35 | 34,22 | 20,82 | 65,56 | 0,149 |
| | Jitt | 0,91 | 0,47 | 1,57 | 0,47 | 0,33 | 0,95 | 0,119 |
| | RAP | 0,55 | 0,28 | 0,95 | 0,27 | 0,19 | 0,57 | 0,093 |
| | PPQ | 0,65 | 0,21 | 1,06 | 0,28 | 0,19 | 0,53 | 0,022* |
| | sPPQ | 0,69 | 0,56 | 1,64 | 0,55 | 0,49 | 0,81 | 0,050* |
| | vF0 | 1,31 | 1,05 | 2,50 | 1,15 | 0,85 | 1,46 | 0,022* |
| | ShdB | 0,35 | 0,17 | 0,62 | 0,27 | 0,19 | 0,32 | 0,231 |
| | Shim | 3,81 | 1,61 | 6,04 | 3,12 | 2,09 | 3,50 | 0,366 |
| | APQ | 3,15 | 1,93 | 5,38 | 2,83 | 1,96 | 3,46 | 0,519 |
| | sAPQ | 5,55 | 3,67 | 7,94 | 5,29 | 4,12 | 6,88 | 0,796 |
| | vAm | 13,35 | 8,78 | 19,66 | 11,42 | 6,97 | 13,64 | 0,130 |
| | NHR | 0,13 | 0,12 | 0,15 | 0,13 | 0,12 | 0,14 | 0,372 |
| | VTI | 0,052 | 0,044 | 0,07 | 0,047 | 0,037 | 0,061 | 0,213 |
| | SPI | 6,76 | 4,20 | 10,05 | 6,65 | 5,18 | 10,14 | 0,769 |
| | DVB | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,317 |
| NVB | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,317 | |
| NUV | 0,000 | 0,000 | 4,25 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,081 | |
| DUV | 0,000 | 0,000 | 2,31 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,081 | |
| DSH | 0,000 | 0,000 | 1,16 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,043* | |
| NSH | 0,000 | 0,000 | 1,20 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,018* | |

Wilcoxon ratings test. Q1, first quartile; Q2, second quartile; Q3, third quartile. The data marked with (*) are statistically significant. Abbreviations: f0, fundamental frequency; fhi, highest fundamental frequency; ffo lowest fundamental frequency; STD, standard deviation of f0; Jita, absolute jitter; RAP, média relativa da perturbação do pitch; PPO: quociente de perturbação do pitch.; sPPQ, smoothed pitch perturbation quotient; vF0: Variação da f0; ShdB, shimmer in dB; APQ: quociente de perturbação da amplitude; sAPQ, smoothed amplitude perturbation quotient; vAm: variação da amplitude; NHR, noise to harmonic ratio; VTI, voice turbulence index; SPI, soft phonation index; DVB, degree of voice breaks; NVB, number of voice breaks; NUV, number of unvoiced segments; DUV, degree of voiceless; DSH, degree of subharmonics; NSH, number of subharmonic segments.

TABLE 5.
Acoustic Measurements of the MDVPA Before and After Vocal Technique (Nasal Sounds) in the Leishmaniasis Mucosa Group

| | Before Vocal Technique | | | After Vocal Technique | | | P Value |
|------|------------------------|--------|--------|-----------------------|---------|--------|---------|
| | Medium | Q1 | Q3 | Medium | Q1 | Q3 | |
| F0 | 161,35 | 124,65 | 200,02 | 162,94 | 135,425 | 193,33 | 0,838 |
| Fhi | 205,89 | 152,49 | 225,67 | 168,03 | 139,39 | 211,84 | 0,262 |
| Flo | 133,67 | 99,26 | 173,60 | 138,76 | 107,19 | 180,34 | 0,610 |
| STD | 3,63 | 1,93 | 2,17 | 2,17 | 1,63 | 3,60 | 0,176 |
| Jitt | 59,59 | 25,36 | 131,40 | 54,04 | 28,66 | 111,35 | 0,424 |
| Jitt | 0,93 | 0,38 | 1,74 | 0,91 | 0,47 | 1,57 | 0,980 |
| RAP | 0,56 | 0,21 | 1,06 | 0,55 | 0,28 | 0,95 | 0,949 |
| PPQ | 0,52 | 0,21 | 0,98 | 0,65 | 0,21 | 1,06 | 0,775 |
| sPPQ | 0,86 | 0,59 | 1,91 | 0,69 | 0,56 | 1,64 | 0,321 |
| vF0 | 1,91 | 0,99 | 5,66 | 1,31 | 1,05 | 2,50 | 0,187 |
| ShdB | 0,33 | 0,15 | 0,76 | 0,35 | 0,17 | 0,62 | 0,759 |
| Shim | 3,68 | 1,81 | 8,27 | 3,81 | 1,61 | 6,04 | 0,775 |
| APQ | 3,14 | 1,91 | 6,37 | 3,15 | 1,93 | 5,38 | 0,849 |
| sAPQ | 6,27 | 3,45 | 8,46 | 5,55 | 3,67 | 7,94 | 0,638 |
| vAm | 15,79 | 8,63 | 22,52 | 13,35 | 8,78 | 19,66 | 0,243 |
| NHR | 0,15 | 0,12 | 0,22 | 0,13 | 0,12 | 0,15 | 0,039* |
| VTI | 0,068 | 0,04 | 0,086 | 0,052 | 0,044 | 0,07 | 0,024* |
| SPI | 4,62 | 3,09 | 6,26 | 6,76 | 4,20 | 10,05 | 0,050* |
| DVB | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,500 |
| NVB | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,750 |
| NUV | 0,000 | 0,000 | 12,25 | 0,000 | 0,000 | 4,25 | 0,310 |
| DUV | 0,000 | 0,000 | 6,94 | 0,000 | 0,000 | 2,31 | 0,014* |
| DSH | 0,000 | 0,000 | 1,22 | 0,000 | 0,000 | 1,16 | 0,820 |
| NSH | 0,000 | 0,000 | 1,25 | 0,000 | 0,000 | 2,00 | 0,625 |

Wilcoxon ratings test. Q1, first quartile; Q2, second quartile; Q3, third quartile. The data marked with (*) are statistically significant. Abbreviations: f0, fundamental frequency; fhi, highest fundamental frequency; flo lowest fundamental frequency; STD, standard deviation of f0; Jitta, absolute jitter; RAP, Média relativa da perturbação do *pitch*; PPQ, quociente de perturbação do *pitch*; sPPQ, smoothed pitch perturbation quotient; vF0, Variação da f0; ShdB, shimmer in dB; APQ, quociente de perturbação da amplitude; sAPQ, smoothed amplitude perturbation quotient; vAm, variação da amplitude; NHR, noise to harmonic ratio; VTI, voice turbulence index; SPI, soft phonation index; DVB, degree of voice breaks; NVB, number of voice breaks; NUV, number of unvoiced segments; DUV, degree of voiceless; DSH, degree of subharmonics; NSH, number of subharmonic segments.

The CL is a chronic and benign disease,^{48,49} being the most common form of ATL, which may not manifest itself over the years or evolve to cutaneous lesions. The characteristic CL lesions may present as single or multiple, ulcerated,^{14,50} usually painless, round or oval in appearance, with erythematous, infiltrated and firm appearance, with circumscribed and elevated borders, reddish and with coarse granulations.^{51,52} They often affect exposed areas of the body, such as limbs.^{14,50}

Usually, the appearance of ML occurs after primary skin lesion healing (2%–5% of cases), but it can also occur simultaneously to the CL frame.^{14,53,54} However, the true incidence of LM in Brazil is not known, often due to the lack of notification of these cases.⁵⁵

The mucosal lesions can be configured as destructive, potentially mutilating, reaching the upper aerodigestive pathways.^{56,57,58,59} Mucosal involvement in ATL is considered a serious manifestation of the disease, which makes it impossible for the person to work and withdraw from social interaction.¹⁴ Among men, the mucosal form is more common, besides they exhibit more septal perforation and there

is propagation of the lesions to external nasal cavity structures.²⁸

In this study, 59.09% (n = 26) participants were aged between 25 and 50 years, all were rural dwellers and most of them worked in agriculture. Studies show that there may be variation concerning the spread of cases among the different age groups, indicating the possibility of household, peridomiciliar and occupational transmission, because children under six and the elderly are generally indoors, while people of productive age have higher risk of having the disease because of their occupations in the forest, usually agriculture or extractivism (Table 1).^{28,60,61}

The sample of this study was composed of males and most studies show that males are more affected by ATL,^{10,28} that the mucosal form is more frequent and that they can develop more severe forms of the disease, with high incidence of perforations and involvement of the external structures of the nasal cavity.²⁸ This prevalence of ATL among males, may occur due to their occupational or leisure activities such as hunting, fishing or camping which are still more common among them (Table 1).^{60,62}

TABLE 5.
Acoustic Measurements of the MDVPA Before and After Vocal Technique (Nasal Sounds) in the Leishmaniasis Mucosa Group

| | Before Vocal Technique | | | After Vocal Technique | | | P Value |
|------|------------------------|--------|--------|-----------------------|---------|--------|---------|
| | Medium | Q1 | Q3 | Medium | Q1 | Q3 | |
| F0 | 161,35 | 124,65 | 200,02 | 162,94 | 135,425 | 193,33 | 0,838 |
| Fhi | 205,89 | 152,49 | 225,67 | 168,03 | 139,39 | 211,84 | 0,262 |
| Flo | 133,67 | 99,26 | 173,60 | 138,76 | 107,19 | 180,34 | 0,610 |
| STD | 3,63 | 1,93 | 2,17 | 2,17 | 1,63 | 3,60 | 0,176 |
| Jitt | 59,59 | 25,36 | 131,40 | 54,04 | 28,66 | 111,35 | 0,424 |
| Jitt | 0,93 | 0,38 | 1,74 | 0,91 | 0,47 | 1,57 | 0,980 |
| RAP | 0,56 | 0,21 | 1,06 | 0,55 | 0,28 | 0,95 | 0,949 |
| PPQ | 0,52 | 0,21 | 0,98 | 0,65 | 0,21 | 1,06 | 0,775 |
| sPPQ | 0,86 | 0,59 | 1,91 | 0,69 | 0,56 | 1,64 | 0,321 |
| vF0 | 1,91 | 0,99 | 5,66 | 1,31 | 1,05 | 2,50 | 0,187 |
| ShdB | 0,33 | 0,15 | 0,76 | 0,35 | 0,17 | 0,62 | 0,759 |
| Shim | 3,68 | 1,81 | 8,27 | 3,81 | 1,61 | 6,04 | 0,775 |
| APQ | 3,14 | 1,91 | 6,37 | 3,15 | 1,93 | 5,38 | 0,849 |
| sAPQ | 6,27 | 3,45 | 8,46 | 5,55 | 3,67 | 7,94 | 0,638 |
| vAm | 15,79 | 8,63 | 22,52 | 13,35 | 8,78 | 19,66 | 0,243 |
| NHR | 0,15 | 0,12 | 0,22 | 0,13 | 0,12 | 0,15 | 0,039* |
| VTI | 0,068 | 0,04 | 0,086 | 0,052 | 0,044 | 0,07 | 0,024* |
| SPI | 4,62 | 3,09 | 6,26 | 6,76 | 4,20 | 10,05 | 0,050* |
| DVB | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,500 |
| NVB | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,750 |
| NUV | 0,000 | 0,000 | 12,25 | 0,000 | 0,000 | 4,25 | 0,310 |
| DUV | 0,000 | 0,000 | 6,94 | 0,000 | 0,000 | 2,31 | 0,014* |
| DSH | 0,000 | 0,000 | 1,22 | 0,000 | 0,000 | 1,16 | 0,820 |
| NSH | 0,000 | 0,000 | 1,25 | 0,000 | 0,000 | 2,00 | 0,625 |

Wilcoxon ratings test. Q1, first quartile; Q2, second quartile; Q3, third quartile. The data marked with (*) are statistically significant. Abbreviations: f0, fundamental frequency; fhi, highest fundamental frequency; flo lowest fundamental frequency; STD, standard deviation of f0; Jitta, absolute jitter; RAP, Média relativa da perturbação do *pitch*; PPQ, quociente de perturbação do *pitch*; sPPQ, smoothed pitch perturbation quotient; vF0, Variação da f0; ShdB, shimmer in dB; APQ, quociente de perturbação da amplitude; sAPQ, smoothed amplitude perturbation quotient; vAm, variação da amplitude; NHR, noise to harmonic ratio; VTI, voice turbulence index; SPI, soft phonation index; DVB, degree of voice breaks; NVB, number of voice breaks; NUV, number of unvoiced segments; DUV, degree of voiceless; DSH, degree of subharmonics; NSH, number of subharmonic segments.

The CL is a chronic and benign disease,^{48,49} being the most common form of ATL, which may not manifest itself over the years or evolve to cutaneous lesions. The characteristic CL lesions may present as single or multiple, ulcerated,^{14,50} usually painless, round or oval in appearance, with erythematous, infiltrated and firm appearance, with circumscribed and elevated borders, reddish and with coarse granulations.^{51,52} They often affect exposed areas of the body, such as limbs.^{14,50}

Usually, the appearance of ML occurs after primary skin lesion healing (2%–5% of cases), but it can also occur simultaneously to the CL frame.^{14,53,54} However, the true incidence of LM in Brazil is not known, often due to the lack of notification of these cases.⁵⁵

The mucosal lesions can be configured as destructive, potentially mutilating, reaching the upper aerodigestive pathways.^{56,57,58,59} Mucosal involvement in ATL is considered a serious manifestation of the disease, which makes it impossible for the person to work and withdraw from social interaction.¹⁴ Among men, the mucosal form is more common, besides they exhibit more septal perforation and there

is propagation of the lesions to external nasal cavity structures.²⁸

In this study, 59.09% (n = 26) participants were aged between 25 and 50 years, all were rural dwellers and most of them worked in agriculture. Studies show that there may be variation concerning the spread of cases among the different age groups, indicating the possibility of household, peridomiciliar and occupational transmission, because children under six and the elderly are generally indoors, while people of productive age have higher risk of having the disease because of their occupations in the forest, usually agriculture or extractivism (Table 1).^{28,60,61}

The sample of this study was composed of males and most studies show that males are more affected by ATL,^{10,28} that the mucosal form is more frequent and that they can develop more severe forms of the disease, with high incidence of perforations and involvement of the external structures of the nasal cavity.²⁸ This prevalence of ATL among males, may occur due to their occupational or leisure activities such as hunting, fishing or camping which are still more common among them (Table 1).^{60,62}

phonatory system.^{44,90} In addition, it was observed that this parameter may be related to hoarseness and voice roughness,⁹¹ which were also characteristics presented by the group with ML, without statistical significance, although with a high percentage and rough voice yet with moderate degree. However, it should be pointed out that these vocal deviations can also be attributed to the age of the participants.³⁰

Furthermore, the frequency measures (STD, Fhi) and the number of subharmonic segments (NSH) were also associated with the ML group, with values higher than the CL group and statistically significant. Similar to vF0, the high result of these measures may also be related to the discrete instability in frequency maintenance.³⁰ This can occur due to resonance alteration, caused by the imbalance in the air direction due to nasal changes (for example, nasal obstruction). Such changes may trigger oral breathing, which will lead to changes in muscle function, leading to compensatory effort in the musculature of the larynx, which would trigger emission instability.⁷³

Three quarters of patients with ML presented higher values of the number of unvoiced segments (NUV) than the CL group, with statistically significant values (Table 4). This measure is characterized by disrupted periodicity of the sound wave, reflected as noise or irregular emission. There are studies that show that higher values of these measures are associated with males.⁹² However, this was not confirmed in this research, once only three quarters of ML participants presented high values and that the CL group was also composed by males. Moreover, people who go through the aging process may exhibit instability of the voice quality and increase of voice breaks and or frequency changes, which would justify the increase in the ML group.³⁰

The patients with CL presented statistically significant association with the noise measure SPI, indicating higher presence of noise to phonation than the ML group. These high values suggest inadequate closure of the vocal folds,^{30,42} or can occur as consequence of bass voices (as in males) and aerial turbulences due to nonlinear phonation.⁹³ To avoid voice disorders, voice exercises can be used, which usually cause increase of the muscle tissue temperature and of the blood flow, reducing the impairment of the muscular work.^{94,95} In this context semioccluded vocal tract exercises can be used. They are performed by partial occlusion of the anterior portion of the vocal tract, which becomes constrict or lengthened, promoting retroflex resonance toward the vocal folds. Some variations of these exercises are described in recent researches, such as nasal sounds^{17,23} used in this work.

After speech therapy intervention, there was improvement of the acoustic parameters in both groups. However, there was statistically significant reduction of the measures of frequency perturbation (vF0, PPQ, sPPQ) for the CL group (Table 4). As the technique of nasal sounds is an exercise that helps to shift the resonant focus from hypo to hyper, it reduces the tension of the larynx and pharynx,

acting as a springboard of voice projection to the space, which will reduce low resonance and increase the oral component of nasal resonance, producing richer harmonics series and bringing more stability to emission.^{23,96,97}

In addition, there was a statistically significant reduction of the measures of subharmonic segments (DSH, NSH) for the participants with ML (Table 4). The measures of the subharmonic components allow measuring the presence of these low intensity components located between the harmonics. Their decrease after the vocal technique shows reduction of the noise to emission. In the same way, the decrease of the parameters of unvoiced segments, which represent the interruption of the sound wave, indicates reduction of the irregularities during vocalization.⁴⁴ Moreover, there was statistically significant improvement of the frequency measure STD, suggesting greater emission stability (Table 4).

In addition, when only the group with ML was analyzed, before and after the speech therapy intervention (Table 5), improvement of the noise parameters (VTI, NHR, SPI) was observed, indicating regularization in the vibration of the laryngeal structures,^{42,89} which may have occurred due to the benefit brought to vocal folds coaptation, as well as by the better channeling of the aerial flow to the resonance cavities, suggesting improved glottic closure during phonation.⁴² In the same way, the decrease in the parameters of unvoiced segments, which represent the interruption of the sound wave, indicates reduction of the irregularities during vocalization.⁴⁴

Concerning the vocal characteristic of roughness (Table 3), it can be observed that after applying the speech therapy technique, participants of both groups presented reduction of this vocal type, although the reduction of the CL group was greater than that of the ML group, with statistically significant results. Roughness usually occurs in a noisy and unpleasant way, poor in harmonics and rich in noise,⁹⁸ emerging as a consequence of the rigidity of the covering of the vocal folds and or caused by muscle rigidity due to tension increase,⁹⁹ bringing vibration irregularity to emission.⁹⁹ Thus, the reduction of this vocal characteristic may have occurred due to the smoothing of the emission, the reduction of the laryngeal hypertonicity and the improvement of the vibration of the vocal folds, favored by the nasal sounds technique.^{23,96,97}

Finally, we have to point out that this study has some limitations such as the possible interference of presbylarynx on ML group vocal disorders and that the study was conducted only with males. Further studies should use a younger public, and, if possible include the female population, even though ML is more common among males.

CONCLUSION

The purpose of this research was to improve the understanding of the relationship between Leishmaniasis and voice, especially the Mucosal Leishmaniasis. We verified that even without the presence of sequelae of laryngeal

lesions, people with ML may present voice disorders caused by sequelae of nasal lesions or in other sites, which interfere in the correct vocal emission. We highlight asthenia and the most alterations of the acoustic measures (fhi, STD, vF0, SPI, NSH, DSH) associated with the ML group, which presented the greatest vocal deviations when compared to the CL group. This may have occurred due to the impact of the disease on laryngeal structures, as well as due to voice disorders caused by age and gender.

The CL group also presented vocal changes, marked by vocal instability along with noise measurements (SPI). However, the changes did not present great severity when compared to the ML group. These alterations can be attributed to the incorrect vocal habits of the laryngeal hypercontraction performed in an attempt to compensate for incomplete vocal coaptation.

Despite the disfiguring lesions of ML, which lead to greater vocal impairment of individuals with this disease, we proved that vocal intervention, even over a short period of time, considerably benefits the voice of these patients, improving their quality of life and voice. The results of this study can stimulate the creation of measures of vocal promotion and prevention and better speech therapy strategies. We also verified voice disorders in the CL group, which was not expected, because it was a group characterized by lesions in regions that are not related to the vocal apparatus. However, similar to the ML group, the speech therapy brought significant improvement of the acoustic and auditory perceptual voice parameters.

Acknowledgments

The authors acknowledge Laboratory of Voice from UFMS for the collaboration in acoustic analysis evaluation and FAPESB for the financial support.

REFERENCES

- Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis world wide. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001;95:239-243.
- BRASIL, Ministry of Health. Secretariat of Health Surveillance. Department of Epidemiological Surveillance. *Manual of Surveillance of American Cutaneous Leishmaniasis.* Brasília: Publisher of the Ministry of Health; 2007:182 p.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE.* 2012;7:e35671.
- Fontes CF. *Aspectos Epidemiológicos Da Leishmaniose Tegumentar Americana Disseminada: Revisão Sistemática. Monografia.* Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2014:44.
- Cantanhêde LM, Silva Júnior CF, Ito MM, et al. Further evidence of na association between the presence of Leishmania RNA virus 1 and the mucosal manifestations in tegumentar leishmaniasis patients. *PLoS Neglected Trop Dis.* 2015;9:e0004079.
- Gontijo B, Carvalho MLR. American Cutaneous Leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;1:71-80.
- Camargo RA, Tuon FF, Sumi DV, et al. Mucosal leishmaniasis and abnormalities on computed tomographic scans of paranasal sinuses. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;83:515-518.
- Amato VS, Tuon FF, Bacha HA, et al. Mucosalleishmaniasis current scenario and prospects for treatment. *Acta Trop.* 2008;105:1-9.
- Camargo RA, Nicodemo AC, Sumi DV, et al. Facial structure alterations and abnormalities of the paranasal sinuses on multidetector computed tomography scans of patients with treated mucosal leishmaniasis. *PLoS Neglected Trop Dis.* 2014;8:e3001.
- Lessa MM, Há Lessa, Castro TW, et al. Mucosal leishmaniasis: clinical and epidemiological aspects. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2007;73:843-847.
- Ruas ACN, Lucena MM, Costa AD, et al. Voice disorders in mucosal leishmaniasis. *PLoS One.* 2014;9:e101831.
- Spina AL, Maunsell R, Sandalo K, et al. *Correlation between Voice and Life Quality and Occupation.* ABORL-CCF Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial; 2009.
- Kasama ST, Brasolotto AG. Vocal perception and quality of life. *Pró-Fono Rev Atualização Científica, Barueri.* 2007;9:19-28.
- Neto WSA. *Clinical, epidemiological and laboratory aspects of American tegumentary leishmaniasis at a reference hospital in Teresina.* 2015:78.
- Deary IJ, Wilson JA, Carding PN, et al. VoiSS: a patient-derived, Voice Symptom Scale. *J Psychosom Res.* 2003;54:483-489.
- Gregory ND, Chandran S, Lurie D, Sataloff RT, et al. Voice disorders in the elderly. *J Voice, Philadelphia.* 2012;26(2):254-258.
- Santos SB. *Verifying the efficacy of the use of resonance tubes in vocal therapy with elderly individuals.* [Dissertação]. Porto Alegre, 71, 2013.
- Laukkanen AM, Pulakka H, Alku P, et al. High-speed registration of phonation-related glottal area variation during artificial lengthening of the vocal tract. *Logoped Phoniatr Vocol.* 2007;32:157-164.
- Guzmán M, Callejas C, Castro C, et al. Efecto terapéutico de los ejercicios con tracto vocal semiocluido en pacientes con disfonía músculo tensional tipo I. *Revista Logoped Foniatría y Audiología.* 2012;32:139-146.
- Paes SM, Zambon F, Yamasaki R, et al. Immediate effects of the Finnish resonance tube method on behavioral dysphonia. *J Voice.* 2013;27(6):717-722.
- Laukkanen AM, Horáček J, Krupa P, Svec JG, et al. The effect of phonation into a straw on the vocal tract adjustments and formant frequencies. A preliminary MRI study on a single subject completed with acoustic results. *Biomed Signal Process Control.* 2011;50-57.
- Cielo CA, Lima JPD, Christmann MK, et al. Semi-fluid vocal tract exercises: literature review. *Rev CEFAC.* 2013;15:1679-1689.
- Andrade SR, Cielo CA, Schwarz K, et al. Vocal therapy and nasal sounds: effects on hyperfunctional dysphonia. *Rev CEFAC.* 2016;18:263-272. 2016.
- Gilman MA. *A Practical Guide to Treating Patients with Benign Lesions. The Fundamentals of Voice Therapy for the General Practice Clinician.* Chicago: The Annual ASHA Conventions; Feb, 2004.
- Andrade SR. *Basic voice therapy and nasal sounds: effect on hyperkinetic dysphonias,* Santa Maria RS: Universidade Federal de Santa Maria; 2007.
- Brockmann M, Drinnan MJ, Storck C, et al. Reliable jitter and shimmer measurements in voice clinics: the relevance of vowel, gender, vocal intensity, and fundamental frequency effects in a typical clinical task. *J Voice.* 2011;25:44-53.
- Cielo CA, Christmann MK. Finger Kazoo: vocal spectral acoustic modifications and vocal self-assessment. *Rev CEFAC.* 2014;16:1239-1254.
- Figueira LP, Soares FV, Naiff MF, et al. Distribution of cases of cutaneous leishmaniasis in the municipality of Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil. *Rev Depatol Trop.* 2014;43:173-181.
- Cincurá C, de Lima CMF, Machado PR, et al. Mucosal leishmaniasis: a retrospective study of 327 cases from an endemic area of Leishmania (Viannia) braziliensis. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;97:761-766.
- De Machado FCM, Cielo CA, Lessa MM, et al. Vocal characteristics of elderly women engaged in aerobics in private institutions of Salvador, Bahia. *J Voice.* 2016;30:127-1e9.
- Diniz JLC, Costa MOR, Gonçalves DU. Mucocutaneous Leishmaniasis: clinical markers in presumptive diagnosis. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2011;77:380-384.
- Lima JPM, Cielo CA, Christmann MK. Phonotherapy with phonation in tubes in patient with surgically mediastinal vocal fold paralysis: case study. *Rev CEFAC.* 2016;18:1466-1474.

33. Finger LS, Cielo CA. Acoustic vocal modifications produced by reverse phonation. *Rev Soc Bras Fonoaudiol*. 2009;14:15–21.
34. Schwarz K, Cielo CA. Laryngeal and vocal modifications produced by the sonorized tongue vibration technique. *Pró-Fonoaudiol*. 2009;21:161–166.
35. Roman-Niehués G, Cielo CA. Acoustic vocal modifications produced by hyperacoustic sound. *Rev. CEFAC, São Paulo*. 2010;12:462–470.
36. Brum DM, Cielo CA, Finger LS, et al. Considerations for vocal and laryngeal modifications caused by basal sound in women without vocal complaints. *Rev Soc Bras Fonoaudiol*. 2010;15:282–288.
37. Van Lierde KM, Dhaseeler E, Baudonck N, et al. The impact of vocal warm-up exercises on the objective vocal quality in female students training to be speech language pathologists. *J Voice*. 2011;25:115–121.
38. Colton RH, Casper JK, Leonard R. *Understanding Voice Problems: A Physiological Perspective on Diagnosis and Treatment*. Porto Alegre: Artes Médicas; 2010.
39. McHenry M, Jonhson J, Foshea B. The effect of specific versus combined warm-up strategies on the voice. *J Voice*. 2008;23:572–576.
40. Pinho SMR, Pontes P. Perceptual assessment glottal source—RASATI Scale. *Vox Bras*. 2002;3:11–13.
41. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biom Soc*. 1977;33:159–174.
42. Santos AO. *Acoustics and perceptual parameters of voice from adults and elderly*. São Paulo SP: University of São Paulo; 2012.
43. Beber BC, Cielo CA. Acoustic measurements of the glottal source of normal male voices. *Pro-Fono Rev Actual Client*. 2010;22:299–304.
44. Beber BC, Cielo CA. Acoustic vocal characteristics of men with normal voice and larynx. *Rev CEFAC*. 2011;13:340–351.
45. Nunes AG, Paula EV, Teodoro R, et al. Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in Varzelândia, Minas Gerais, Brasil Epidemiological aspects of American tegumentaryleishmaniasis in Varzelândia, Minas Gerais, Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2006;22:1343–1347.
46. Ampuero J, Macêdo V, Marsden P. Clinical features of cutaneous leishmaniasis in children aged 0 to 5 years in an endemic area of Leishmania (Viannia) braziliensis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39:22–26.
47. Guerra JAO, Ribeiro JAS, Coelho LIARC, et al. Epidemiology of tegumentaryleishmaniasis in São João, Manaus, Amazonas, Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2006;22:2319–2327.
48. Araújo AIF. *Evaluation of the swab collection method for the molecular diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in patients from endemic areas of Pernambuco, Brazil* [Dissertation]. Recife: Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães; 2013. . 88 p.
49. Brasil Ministry of Health. *Health Surveillance Secretariat. Surveillance Manual of American Cutaneous Leishmaniasis* / Ministry of Health, Secretariat of Health Surveillance. Second ed. Brasília: Publisher of the Ministry of Health; 2010:180. il. – (Series A. Standards and Technical Manuals).
50. Terceiro F, Benivaldo R. *Comparison between the standard and alternative scheme of meglumine antimoniate in the treatment of mucocutaneous or mucosal Leishmaniasis*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2014:85.
51. Marsden PD. Mucosal leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986;(80):859–876.
52. Schubach AO, Marzochi KBF, Moreira JS, et al. Retrospective study of 151 patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimoniate. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38:213.
53. Lainson R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1983;77:569–596.
54. Jones TC, Johnson WD, Barretto AC, et al. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to Leishmania braziliensis Braziliensis. *J Infect Dis*. 1987;156:73–83.
55. Oliveira EA. Epidemiological characteristics of American tegumentary leishmaniasis in the bordering municipalities of new Lacerda and conquest of the West, Mato Grosso. Connection line, 2014.
56. Nunes AG, Paula EVD, Teodoro R, et al. Epidemiological aspects of American tegumentary leishmaniasis in Varzelândia, Minas Gerais, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2006;22:1343–1347.
57. Nunes CSA, Yoshizawa JK, Oliveira RZ, et al. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and treatment considerations. *Rev Bras Med Fam Comunidade*. 2011;6:52–56.
58. McGwire BS, Satoskar AR. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *Q J Med*. 2014;107:7–14.
59. Bustos MFG, Barrio A, Parodi C, et al. Miltefosine versus meglumine antimoniate in the treatment of mucosal Leishmaniasis. *Medicina (Buenos Aires)*. 2014;74:371–377.
60. Guerra JAO, Ribeiro JAS, Coelho LIARC, et al. Epidemiology of tegumentaryleishmaniasis in São João, Manaus, Amazonas, Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2006;22:2319–2327.
61. França EL, Mandadori MN, França JL, et al. Epidemiological aspects of American tegumentary leishmaniasis in the municipality of Juína, Mato Grosso, Brasil. *Sci Med*. 2009;19:103–107.
62. Curti MCM, Silveira TGV, Arraes SMAA, et al. Epidemiological aspects of American tegumentary leishmaniasis in the Northwest Region of Paraná. *Rev Ciênc Farm Básica e Apl*. 2009;30:63–68.
63. Nunes CSA, Yoshizawa JK, Oliveira RZ, et al. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and treatment considerations. *Rev Bras Med Fam Comunidade*. 2011;6:52–56.
64. Ito MM, Catanhêde LM, Katsuragawa TH, et al. Correlation between presence of Leishmania RNA virus 1 and clinical characteristics of nasal mucosal leishmaniasis. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2015;81:533–540.
65. Vellozo D, Ribeiro MCM, Costa IMC, et al. Fatal mucosal leishmaniasis in children. *An Bras Dermatol*. 2006;81:255–259.
66. Oliveira FS, Valeti-Rosalino CM, Schubach AO, et al. kDNA mini-circle signatures of Leishmania (Viannia) braziliensis in oral and nasal mucosa frommucosalleishmaniasispatients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;66:361–365.
67. Guerra JAO, Prestes SR, Silveira H, et al. Mucosal Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. *PLoS Neglect Trop Dis*. 2011;8:e980.
68. Neto FXP, Rodrigues AC, Silva LL, et al. Otorhinolaryngological manifestations related to American cutaneous Leishmaniasis: literature review. *Arq Int Otorrinolaringol/Int Arch Otorhinolaryngol*. 2008;12:531–537.
69. Lessa HA, Lessa MM, Guimaraes LH, et al. A proposed new clinical staging system for patients with mucosal leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2012;106:376–381.
70. Mazzetto de Menezes KS, Master S, Guzman M, et al. Differences in acoustic and perceptual parameters of the voice between elderly and young women at habitual and high intensity. *Acta Otorrinolaringol*. 2014;65:76–84.
71. Aquino FS, Andrada MA, Da Silva Teles SLC, et al. Characteristics of the spoken voice of the elderly with choral singing practice. *CoDAS, São Paulo*. 2016;28:446–453.
72. Figueroa R, Lozano LE, Romero IC, et al. Detection of Leishmania in unaffected mucosal tissues of patients with cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) Species*. *J Infect Dis*. 2009;200:638–646.
73. Ruas ACN. *Prospective interventional study of voice speech therapy in mucosal leishmaniasis*. Doctoral Thesis. Fundação Oswaldo Cruz. Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas; 2014.
74. Gama ACC, Santos LLM, Sanches NA, et al. Study of the effect of the visual support of the spectrographic plot on the reliability of the perceptual-auditory analysis. *Rev CEFAC*. 2011;13:314–321.
75. Colman FMM. *Vocal characteristics of elderly women practicing aerobic gymnastics in private institutions in Salvador-BA*. Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2015:153.
76. Gasparini G, Behlau M. Quality of life: validation of the Brazilian version of the voice-related quality of life (V-QOL) Measure. *J Voice*. 2009;23.
77. Giannini SPP, Latorre MRDO, Ferreira LP. Voice disorders (dysphonia) in public school female teachers working in Belo Horizonte: prevalent and associated factors. *Revista da Sociedade. Bras Fonoaudiol São Paulo*. 2010;15:475–479.

78. Cielo CA, Gonçalves BFT, Lima JPM, et al. Laryngeal affections, maximum phonation times and vital capacity in women with organofunctional dysphonia. *Rev CEFAC*. 2012;14:481–488. 2012.
79. Gasparini G, Diaféria G, Behlau M. Voice complaint and perceptual-auditory analysis of patients with Parkinson's disease. *Rev Cienc Méd Biol*. 2003;2:72–76.
80. Schwarz K. *The voice and laryngeal configuration of male patients with unilateral vocal fold paralysis, pre and post-medialization*. Doctoral Thesis. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 97., 2010.
81. Mangili LD, Amoroso MRM, Nishimoto NM, et al. Voice, deglutition and quality of life of patients with unilateral vocal fold mobility alteration before and after speech therapy. *Rev Soc Bras Fonoaudiol*. 2008;13:103–112.
82. Gama ACC, Alves CFT, Cerceau JSB, et al. Correlation between acoustic-perceptual data and voice-related quality of life in elderly women. *Pró-fono Rev Actual Client*. 2009;2:125–130.
83. Torre III P, Barlow JA. Age-related changes in acoustic characteristics of adult speech. *J Commun Disord*. 2009;42:324–333.
84. Sataloff RT. *Vocal Health and Pedagogy*. San Diego, CA: Singular Publishing Group; 1998.
85. Woodson GE. The aging larynx. eds.. In: Ossof RH, Shapshay SM, Woodson G, Netterville JL, eds. *The Larynx*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2003.
86. Siqueira LTD. *Impact of respiratory aspects and vocals in life quality of elderly*. [Thesis]. São Paulo SP: São Paulo Univ.; 2013.
87. Ahmad K, Yan Y, Bless D. Vocal fold vibratory characteristics of healthy geriatric females—analysis of high-speed digital images. *J Voice*. 2012;26:751–759.
88. Cielo CA, Christmann MK, Marin Scherer T, et al. Adapted airflow and Fonic coefficients of vocational futures professionals. *Rev CEFAC*. 2014, 16 (Mar-Abr).
89. Takano S, Kimura M, Nito T, et al. Clinical analysis of presbylarynx—vocal fold atrophy in elderly individuals. *Auris, Nasus, Larynx*. 2010;37:461–464.
90. Santana IW. *Physical exercise influence in laryngeal and vocal changes associated with aging*. Porto Alegre RS: Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul; 2006.
91. Felipe ACND, Grillo MHMM, Grechi TH. Standardization of acoustic measures for normal voice patterns. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2006;72:659–664.
92. Gonzáles J, Cervera T, Miralles JL. Análisis acústico de la voz: fiabilidad de un conjunto de parámetros multidimensionales. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2002;53:256–258.
93. Batalla FN, Santos PC, Santiago GS, et al. Perceptual evaluation of dysphonia: correlation with the acoustic parameters. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2004;55:282–287.
94. Saxon KG, Schneider CM. *Vocal Exercise Physiology*. California: Singular Publishing Group; 1995:1–157.
95. Bastilha GR. *Efeitos vocais imediatos da técnica finger kazoo em professoras disfônicas com e sem afecções laringeas*. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; 2015:137.
96. Behlau M, Madazio G, Feijó D, et al. Vocal improvement and speech and hearing loss treatment of dysphonias. *Voice: The Specialist's Book-Volume 2*Rio de Janeiro: Editora Revinter; 2010.
97. Pereira LOR, Maretti-Mira AC, Rodrigues KM, et al. Severity of tegumentary leishmaniasis is not exclusively associated with Leishmania RNA virus 1 infection in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108:665–667.
98. Behlau M. Favorite voices – considerations on vocals options in the professions. *Curr Fono*. 2001;4:10–14.
99. Santos IR. *Acoustic voice analysis from individuals in old age*. São Paulo SP: São Paulo University; 2005.

9 REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

- Adler-Moore J, Proffitt RT. AmBisome: liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49(Suppl.1):21-30.
- Almeida RP, D'Oliveira A Jr, Machado P, Bacellar O, Ko AI, Ribeiro-de-Jesus A, Mobashery N, Santos JB, Carvalho EM. Randomized, double-blind study of stibogluconate plus human granulocyte macrophage colony-stimulating factor versus stibogluconate alone in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1999;180:1735-7.
- Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos One.* 2012;7(5):e 35671.
- Al-Qahtani MS, Malik NW, Jamil S, Mekki TE. Diagnostic dilemma of primary mucosal leishmaniasis. *Saudi Med J.* 2012;33(11):1234-8.
- Amato VS, Tuon FF, Siqueira AM, Nicodemo AC, Neto VA. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: Systematic review. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77(2):266-74.
- Amato VS, Tuon FF, Bacha HA, Neto VA, Nicodemo AC. Mucosal leishmaniasis Current scenario and prospects for treatment. *Acta Trop.* 2008;105(1):1-9.
- Andersen, EM, Cruz-Saldarriaga M, Llanos-Cuentas A, Luz-Cjuno M, Echevarria J, Miranda-Verastegui C, Colina O, Berman JD. Comparison of meglumine antimoniate and pentamidine for Peruvian cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg,* 2005;72(2):133-7.

- Araujo Melo MH, Meneses AM, Schubach AO, Moreira JS, Conceição-Silva F, Salgueiro MM, Pimentel MI, Araújo-Silva M, Oliveira RV, Carmo CN, Valete-Rosalino CM. Risk factors associated with dizziness during treatment of mucosal leishmaniasis with meglumine antimoniate: 16-year retrospective study of cases from Rio de Janeiro, Brazil. *J Laryngol Otol.* 2010;124(10):1056-1060.
- Arevalo J, Ramirez L, Adui V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verastegui C, Lazo M, Loayza-Muro R, De Doncker S, Maurer A, Chappuis F, Dujardin JC, Llanos-Cuentas A. Influence of *Leishmania* (*Viannia*) species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentar leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2007;195(12):1846-51.
- Armijos RX, Weigel MM, Izurieta R, Racines J, Zurita C, Herrera W, Veja M. The epidemiology of cutaneous leishmaniasis in subtropical Ecuador. *Trop. Med. Int. Health.* 1997;2:140-52.
- Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun.* 2002;70(12):6734-40.
- Badaro R, Falcoff E, Badaro FS, Carvalho EM, Pedral-Sampaio D, Barral AMP, Carvalho JS, Barral-Netto M, Brandely M, Silva L, Bina JC, Teixeira R, Falcoff R, Rocha H, Ho JL, Johnson Junior WD. Treatment of visceral leishmaniasis with pentavalent antimony and interferon gamma. *N Engl J Med.* 1990;322(1):16-21.
- Bafica A, Oliveira F, Freitas LAR, Nascimento EG, Barral A. American cutaneous leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs: successful treatment using combination of N-methylglucamine antimoniate plus pentoxifylline. *Int J Dermatol.* 2003;42(3):203-7.

- Bahia. Secretaria de Saúde. *Situação Epidemiológica da Leishmaniose Tegumentar no Estado da Bahia*. Bahia: Secretaria de Saúde; 2015.
- Barbosa JER. Dados estatísticos sobre os casos de leishmaniose das mucosas observados no serviço de Oto-Rino-Laringologia de Santa Casa de São Paulo. *Rev Oto-Laringol São Paulo*. 1936;4(5):697-714.
- Barral A, Guerreiro J, Bomfim G, Correia D, Barral-Netto M, Carvalho, EM. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg*. 1995;53(3):256-9.
- Barral-Netto M, Barral A, Brodskyn C, Carvalho EM, Reed SG. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 1995;17(1):21-8.
- Basano SDA, Camargo LMA. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle American cutaneous leishmaniasis. *Rev Bras Epidemiol*. 2004;7(3):328-37.
- Berman JD. Primary agent for leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1988;38(3):652.
- Berman JD, Edwards N, King M, Grogl M. Biochemistry of Pentostam resistant *Leishmania*. *Am J Trop Med Hyg*, 1989;40(2):159-64.
- Bittencourt AL, Barral A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1991;86(1):51-6.
- Blam ME, Stein RB, Lichtenstein GR. Integrating anti-tumor necrosis factor therapy in inflammatory bowel disease: current and future perspectives. *Am J Gastroenterol*. 2001;96(7):1977-97.

- Boaventura VS, Café V, Costa JML, Oliveira F, Báfica ALB, Rosato AB, Freitas LAR, Brodskyn CI, Barral Neto M, Barral AMP. Short Report: concomitant early mucosal and cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75(2):267-269.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual da vigilância da leishmaniose tegumentar americana. 2a ed. Brasília (DF); Ministério da Saúde, 2007.
- Brito MEF, Andrade MS, Mendonça MG, Silva CJ, Almeida EL, Lima BS, Felix SM, Abath FGC, Graça GC, Porrozzi R, Ishikawa EA, Shaw JJ, Cupolillo E, Brandão-Filho SP. Species diversity of *Leishmania* (*Viannia*) parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. *Trop Med Int Health.* 2009;14(10):1278-86.
- Brito G, Dourado M, Polari L, Celestino D, Carvalho LP, Queiroz A, Carvalho EM, Machado PRL, Passos S. Clinical and immunological outcome in cutaneous leishmaniasis patients treated with pentoxifylline. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;90(4):617-20.
- Bryceson ADM. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia I. The clinical and histopathological features of the disease. *Trans Roy Soc Med Hyg.* 1970;63:708-37.
- Carvalho EM, Johnson WD, Barreto E, Marsden PD, Costa JL, Reed S, Rocha H. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J Immunol.* 1985;135(6):4144-8.
- Carvalho EM, Barral A, Costa JML, Bittencourt AL, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica.* 1994;56:315-25.

- Carvalho LP, Passos S, Bacellar O, Lessa MM, Almeida RP, Magalhães A, Dutra WO, Gollob KJ, Machado PR, Ribeiro de Jesus A. Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. *Parasite Immunol.* 2007;29(5):251-8.
- Carvalho LP, Passos S, Schriefer A, Carvalho EM. Protective and pathologic immune responses in human tegumentar leishmaniasis. *Front Immunol.* 2012;4(3):301.
- Cincurá C, Lima CM, Machado PR, Oliveira-Filho J, Glesby MJ, Lessa MM, Carvalho EM. Mucosal leishmaniasis: a retrospective study of 327 cases from an endemic area of *Leishmania Viannia braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;93(3):761-6.
- Coffman RL, Carty JA. T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by IFN- γ . *J Immunol.* 1986;136(3):949-54.
- Costa DC, Palmeiro MR, Moreira JS, Martins AC, da Silva AF, Madeira MF, Quintella LP, Confort EM, Schubach AO, Silva FC, Valete-Rosalino CM. Oral manifestations in the American tegumentar leishmaniasis. *Plos One.* 2014;9(11):1-7.
- Cuba-Cuba CA, Miles MA, Vexenat A, Barker DC, McMahon-Pratt D, Butcher J, Barreto AC, Marsden PD. A focus of mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia, Brazil characterization and identification of *Leishmania* stocks isolated from man and dogs. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 1985;79(4):500-7.
- Das BK, Mishra S, Padhi PK, Manish R, Tripathy R, Sahoo PK, Ravindran B. Pentoxifylline adjunct improves prognosis of human cerebral malaria in adults. *Trop Med Int Health.* 2003;8(8):680-4.

- Das Gupta S, Ghosh DK, Majumder HK. A cloned kinetoplast DNA mini-circle fragment from a *Leishmania* spp. specific for post-kala-azar dermal leishmaniasis strains. *Parasitology*, 1991;102(2):187-91.
- De Carsalade GY, Achirafi A, Flageul B. Pentoxifylline in the treatment of erythema nodosum leprosum: results of an open study. *J Dermatol*. 2003;30(1):64-8.
- Di Lella F, Vincenti V, Zennaro D, Afeltra A, Baldi A, Giordano D, Pasanisi E, Bacciu S, Di Lella G. Mucocutaneous leishmaniasis: report of a case with massive involvement of nasal, pharyngeal and laryngeal mucosa. *Int J Oral Maxillofac*. 2006;35(9):870-2.
- Doherty GM, Jensen JC, Alexander HR, Buresh CM, Norton JA. Pentoxifylline suppression of tumor necrosis factor gene transcription. *Surgery*. 1991;110(2):192-8.
- Eigler A, Sinha B, Hartmann G, Endres S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunol Today*. 1997;18(10): 487-92.
- Ellis, D. Amphotericin B: spectrum and resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2002;49(Suppl.1):7-10.
- Ephros M, Bitnun A, Shaked P, Waldman E, Zilberstein D. Stage-specific activity of pentavalent antimony against *Leishmania donovani* axenic amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1999;43(2):278-82.
- Falqueto A, Sessa PA, Ferreira AL, Vieira VP, Santos CB, Varejão JBM, Cupolillo E, Porrozzi R, Carvallho-Paes LE, Grimaldi Jr G. Epidemiological and clinical features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98(8):1003-10.

- Faria DR, Gollob KJ, Barbosa Jr J, Schriefer A, Machado PR, Lessa HA, Carvalho LP, Romano-Silva MA, de Jesus AR, Carvalho EM, Dutra WO. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immunol.* 2005;73(12):7853-9.
- Faria DR, Barbieri LC, Koh CC, Machado PR, Barreto CC, Figueiredo CM, Lessa MM, Carvalho EM, Gollob KJ, Dutra WO. In situ cellular response underlying successful treatment of mucosal leishmaniasis with a combination of pentavalent antimonial and pentoxifylline. *Am J Trop Med Hyg.* 2019;101(2):392-401.
- Follador I, Araujo C, Orge G, Cheng LH, de Carvalho LP, Bacellar O, Almeida RP, Carvalho EM. Immune responses to an inactive vaccine against American cutaneous leishmaniasis together with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Vaccine,* 2002;20(9-10):1365-8.
- Franke ED, Wignall FS, Cruz ME, Cruz ME, Rosales E, Tovar AA, Lucas CM, Llanos-Cuentas A., Berman JD. Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis. *Ann Intern Med.* 1990;113(12):934-40.
- Franke ED, Llanos-Cuentas A, Echevarria J, Cruz ME, Campos P, Tovar AA, Lucas CM, Berman JD. Efficacy of 28-day and 40-day regimens of sodium stibogluconate (Pentostam) in the treatment of mucosal leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;51(1):77-82.
- Finkelman FD, Katona IM, Mosmann TR, Coffman RL. IFN-g regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. *J. Immunol.* 1988;140(4):1022-7.
- Golenser J, Domb A. New formulations and derivatives of amphotericin B for treatment of leishmaniasis. *Mini Rev Med Chem.* 2006;6(2):153–62.

- Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;36(1):71-80.
- Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010;8(4):419-33.
- Grant A, Spraggs PD, Grant HR, Bryceson AD. Laryngeal leishmaniasis. *J Laryngol Otol.* 1994;108(12):1086-8.
- Grimaldi GJ, David JR, McMahon-Pratt D. Identification and distribution of New World Leishmania species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg.* 1987;36:270-87.
- Guerreiro JB, Cruz AA, Barral A, Lessa HA, Rocha H, Carvalho EM. Mucosal leishmaniasis: quantitative nasal cytology as a marker of disease activity and indicator of healing. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2000;109(1):89-94.
- Guimarães LH, Machado PR, Lessa HA, Lessa MM, D'Oliveira A, Carvalho EM. Aspectos clínicos da leishmaniose tegumentar. *Gaz Méd Bahia.* 2005;75(1):66-74
- Gutierrez Y, Salinas GH, Palma G, Valderrama LB, Santrich CV, Saravia NG. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in Leishmania braziliensis infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;45:281-289.
- Jara M, Adai V, Valencia BM, Martinez D, Alba M, Castrillon C, Cruz M, Cruz I, Van der Auwera G, Llanos-Cuentas A, Dujardin JC, Arevalo A. Real-Time PCR Assay for Detection and Quantification of Leishmania (Viannia) Organisms in Skin and Mucosal Lesions: Exploratory Study of Parasite Load and Clinical Parameters. *J Clin Microbiol.* 2013;51(6):1826-33.

- Jirmanus L, Glesby MJ, Guimarães LH, Lago E, Rosa ME, Machado PR, Carvalho EM. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;86(3): 426-33.
- Jha TK, Sundar S, Thakur CP, Bachmann P, Karbwang J, Fischer C, Voss A, Berman J. Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med.* 1999;341(24):1795-800.
- Jones TC, Johnson WD, Barreto AC, Lago E, Badaró R, Cerf B, Reed SG, Netto EM, Tada MS, Franca TF, Wiese K, Golightly L, Fikrig E, Costa JML, Cuba CC, Marsden PD. Epidemiology of american cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J Infect Dis.* 1987;156(1):73-83.
- Lainson R, Shaw JJ. A brief history of genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian. *Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science.* 1992;44:94-106.
- Lessa HA, Carvalho EM, Marsden PD. Eustachian tube blockage with consequent middle ear infection in mucosal leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1994;27(2):103.
- Lessa, HA. Aspectos Clínicos, Imunológicos e Terapêuticos da Leishmaniose Mucosa [tese]. Salvador: Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia; 1999.
- Lessa HA, Machado P, Lima F, Cruz AA, Bacellar O, Guerreiro J, Carvalho LM. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65(2):87-9.

- Lessa HA, Lessa MM, Guimaraes LH, Lima CM, Arruda S, Machado PR, Carvalho EM. A proposed new clinical staging system for patients with mucosal leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012;106(6):376-81.
- Lessa MM, Lessa HA, Oliveira A, Castro TWN, Scherifer A, Machado P. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2007;73(6):843-7.
- Llanos-Cuentas EA, Marsden PD, Cuba CC, Barreto AC, Campos M. Possible risk factors in development of mucosal lesion in leishmaniasis. *Lancet.* 1984;4(2):295.
- Luna Santos SB, Nascimento M, Porto MA, Muniz AL, Carvalho EM, Jesus AR. Effect of TNF- α production inhibitors on the production of pro-inflammatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells from HTLV-1-infected individuals. *Braz J Med Biol Res.* 2011;44(11):1134-40.
- Machado-Coelho GL, Caiaffa WT, Genaro O, Magalhaes PA, Mayrink W. Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2005;99(1):55-61.
- Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Lago EL, Cuba CC, Barreto AC, Costa JML, Jones TC. Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia-Brazil. An area of *Leishmania braziliensis braziliensis* transmission. III - Mucosal disease presentation and initial evolution. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1984;17:179-86.
- Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1986;80(6):859-76.
- Marsden PD. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Três Braços, Bahia-Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1994;27(2):93-101.

- Martin JFB, Jiménez JL, Munoz-Fernández MA. Pentoxifylline and severe acute respiratory syndrome (SARS): a drug to be considered. *Med Sci Monit.* 2003;9(6):SR29-34.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet.* 2005;366(9496):1561-77.
- Nacher M, Carme B, Sainte Marie D, Couppié P, Clyti E, Guibert P, Pradinaud R. Influence of clinical presentation on the efficacy of a short course of pentamidine in the treatment of cutaneous leishmaniasis in French Guiana. *Ann Trop Med Parasitol.* 2001;95(4):331-6.
- Netto EM, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Costa JML, Cuba CC, Barreto AC, Badaró R, Johnson WD, Jones TC. Long-term follow-up of patients with *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection and treated with Glucantime. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1990;84(3):367-70.
- Neuner P, Klosner G, Schauer E, Pourmojib M, Macheiner W, Grünwald C, Knobler R, Schwarz A, Luger TA, Schwarz T. Pentoxifylline in vivo down-regulates the release of IL-1p, IL-6, IL-8 and tumor necrosis factor- α by human peripheral blood mononuclear cells. *Immunology.* 1994;83(2):262-7.
- Neuner P, Klosner G, Pourmojib M, Knobler R, Schwarz T. Pentoxifylline in vivo and in vitro down-regulates the expression of the intercellular adhesion molecule-1 in monocytes. *Immunology.* 1997;90(3):435-9.
- Nonata R, Sampaio R, Marsden PD. Mucosal leishmaniasis unresponsive to glucantime therapy successfully treated with AmBisome. *Trans R Soc Trop Med Hyg,* 1997;91(1):77.

- Oliveira CCG, Lacerda HG, Martins DRM, Barbosa, JDA, Monteiro, GR, Queiroz JW. Changing epidemiology of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in Brazil: a disease of the urban-rural interface. *Acta Trop.* 2004;90(2):155-62.
- Oliveira-Neto, MP, Schubach A, Mattos M, Goncalves-Costa SC, Pirmez C. A low-dose antimony treatment in 159 patients with American cutaneous leishmaniasis: extensive follow-up studies (up to 10 years). *Am J Trop Med Hyg.* 1997a;57(6):651-5.
- Oliveira-Neto, MP, Schubach A, Mattos M, Goncalves-Costa SC, Pirmez C. Treatment of American cutaneous leishmaniasis: a comparison between low dosage (5 mg/kg/day) and high dosage (20 mg/kg/day) antimony regimens. *Pathol Biol.* 1997;45(6):496-9.
- Oliveira-Neto MP, Mattos M, Pirmez C, Fernandes O, Goncalves-Costa SC, Souza CF, Grimaldi Jr G. Mucosal leishmaniasis ("espundia") responsive to low dose of N-methyl glucamine (Glucantime) in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop.* 2000;42(6):321-5.
- O'Neil CE, Labrada M, Saraiva NG. Leishmania (Viannia) panamensis-specific IgE and IgA antibodies relation to expression of human tegumentary leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1993;49(2):181-8.
- Organização Mundial da Saúde (OMS). Control of Leishmaniasis: report of Who Expert Committee; World Health Organization, Geneve:1-15, 2010.
- Organização Mundial da Saúde (OMS). Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected tropical diseases. Geneva, World Health Organization; 2015.

- Osorio RC, Barbosa D, Martins M, Leal R, Nascimento D, Fernandes E, Nascimento EG, Nascimento A, Machado CC, Barral A, Costa JML. Tegumentary Leishmaniasis caused by *Leishmania Viannia braziliensis* in Genital Organs. *Gaz Med Bahia*. 2009;79(3):91-4.
- Pedras MJ, Orsini M, Castro M, Passos VMA, Rabello A. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003;47(3):477-85.
- Reed SG, Badaró R, Mansur H, Carvalho EM, Lorenço L, Teixeira RAR, Johnson Jr WD, Jones TC. Selection of a Skin test antigen for American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1986;35(1):79-85.
- Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho. EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*. 1998;31(1):143-8.
- Rojas R, Valderrama L, Valderrama M, Varona MX, Ouellette M, Saravia NG. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. *J Infect Dis*. 2006;193(10):1375-83.
- Rodrigues AM, Hueb M, Santos TARR, Fontes CJF. Factors associated with treatment failure of cutaneous leishmaniasis with meglumine antimoniate. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(2):139-45.
- Romero GA, Lessa HA, Orge MG, Macêdo VO, Marsden PD. Treatment of mucosal leishmaniasis with aminosidine sulfate: results of two-year follow-up. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1998;31(6):511-6.
- Ruas ACN, Lucena MM, Costa AD, Vieira JR, Araújo-Melo MH, Terceiro BRF, Torraca TSS, Schubach AO, Valete-Rosalino CM. Voice disorders in mucosal leishmaniasis. *PLoS One*. 2014;9(7):e101831.

- Sadeghian G, Nilforoushzadeh MA. Effect of combination therapy with systemic glucantime and pentoxifylline in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol*. 2006;45(7):819-21.
- Samant M, Sahasrabuddhe AA, Singh N, Gupta SK, Sundar S, Dube A. Proteophosphoglycan is differentially expressed in sodium stibogluconate-sensitive and resistant indian clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Parasitol*. 2007;134(9):1175-84.
- Santos JB, Ribeiro-de-Jesus A, Machado PR, Magalhães A, Salgado K, Carvalho EM, Almeida RP. Antimony plus recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor applied topically in low doses enhances healing of cutaneous leishmaniasis ulcers: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Infect Dis*. 2004;190(10):1793-6.
- Scott P. Impaired macrophage leishmanicidal activity at cutaneous temperature. *Parasite Immunol*. 1985;7(3):277-88.
- Shaw JJ, Lainson R. Leishmaniasis in Brazil: X. Some observations of intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1975;69(3):323-35.
- Shaw J. The leishmaniasis--survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102:541-7.
- Sher A, Gazzinelli RT, Oswald IP, Clerici M, Kullberg M, Pearce EJ, Berzofsky JA, Mosmann TR, James SL, Morse HC 3rd. Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. *Immunol Rev*. 1992;127:183-204.

- Shirabe S, Nakamura T, Tsujino A, Nishiura Y, Furuya T, Goto H, Suenaga A, Nakane S, Yoshimura T, Nagataki S. Successful application of pentoxifylline in the treatment of HTLV-I associated myelopathy. *J Neurol Sci.* 1997;151(1):97-101.
- Singh S. New Developments in Diagnosis of Leishmaniasis. *Indian J Med Res.* 2006;123(3):311-30.
- Soto J, Arana BA, Toledo J, Rizzo N, Vega JC, Diaz A, Luz M, Gutierrez P, Arboleda M., Berman JD, Junge K, Engel J, Sindermann H. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 2004;38(9):1266-1272.
- Soto J, Toledo J, Valda L, Balderrama M, Rea I, Parra R, Ardiles J, Soto P, Gomez A, Molleda F, Fuentelsaz C, Anders G, Sindermann H, Engel J, Berman, J. Treatment of Bolivian mucosal leishmaniasis with miltefosine. *Clin Infect Dis.* 2007;44(3):350-6.
- Souza MA, Silva AG, Afonso-Cardoso SR, Favoreto Junior S, Ferreira MS. Perfil de isotipos de imunoglobulinas e subclasses de IgG na leishmaniose tegumentar americana Immunoglobulin isotype and IgG subclass profiles in american tegumentary leishmaniasis. *Rev Soc Bras de Med Trop.* 2005;38(2):137-41.
- Spina AL, Maunsell R, Sandalo K, Gusmão R, Crespo A. Correlation between voice and life quality and occupation. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2009;75(2):275-9.
- Sundar S, Rai M. Advances in treatment of leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis.* 2002;15(6):593-8.

- Travi BL, Osorio Y, Melby PC, Chandrasekar B, Arteaga L, Saravia NG. Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp. *Infect Immun*. 2002; 70(5):2288-96.
- Trujillo C, Ramírez R, Vélez ID, Berberich C. The humoral immune response to the kinetoplastid membrane protein-11 in patients with American Leishmaniasis and Chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes. *Immunol Lett*. 1999;70(3):203-9.
- Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson WD Jr, Carvalho EM. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis*. 2002;186(12):1829-34.
- Ustunsoy H, Sivrikoz MC, Tarakcioglu M, Bakir K, Guldur E, Celkan MA. The effects of pentoxifylline on the myocardial inflammation and ischemia-reperfusion injury during cardiopulmonary bypass. *J Card Surg*. 2006;21(1):57-61.
- Ward A, Clissold SP. Pentoxifylline: a review of its pharmacodynamics and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. *Drugs*. 1987;34(1):50-97.
- Weigle KA, Santrich C, Martinez F, Valderrama L, Saravia NG. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Colombia: environmental and behavioral risk factors for infection, clinical manifestations, and pathogenicity. *J Infect Dis*. 1993;168:709-14.
- Weigle K, Saravia NG. Natural history, clinical evaluation, and the host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. *Clinics Dermatol*. 1996;14(5):433-50.

Zajtchuk JT, Casler JD, Netto EM, Grogl M, Neafie RC, Hessel CR, Magalhães AV, Marsden PD. Mucosal leishmaniasis in Brazil. *Laryngoscope*. 1989;99(9):925-39.