

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas



Instituto Nacional de Infectologia

Evandro Chagas

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS
PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM PESQUISA
CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

JOÃO GUSTAVO CORRÊA REIS

ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DA
TUBERCULOSE LARÍNGEA

Rio de Janeiro

2015

TESE DPCDI – INI J.G.C. REIS 2015

ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DA TUBERCULOSE LARÍNGEA

JOÃO GUSTAVO CORRÊA REIS

Tese apresentada ao Curso de Pós Graduação em Pesquisas Clínicas em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas Para obtenção do grau de Doutor em Ciências.
Orientadoras: Dra. Cláudia Maria Valete Rosalino e Dra Fátima Conceição-Silva

Rio de Janeiro

2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

R375 Reis, João Gustavo Corrêa

Aspectos clínicos e laboratoriais da Tuberculose laríngea / João
Gustavo Corrêa Reis. – Rio de Janeiro, 2015.
xvi, 87 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Nacional de Infectologia Evandro
Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas,
2015.

Bibliografia: f. 82-87

1. Laringe. 2. Tuberculose. 3. Fatores de risco. 4. Hábito de fumar.
5. Disfonia. 6. Diagnóstico. 7. Diagnóstico diferencial. 8. Histologia. I.
Título.

CDD 614.542

JOÃO GUSTAVO CORRÊA REIS

ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DA TUBERCULOSE LARÍNGEA.

Tese apresentada ao Curso de Pós Graduação em Pesquisas Clínicas em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas Para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador (as): Dra. Cláudia Maria Valete Rosalino
Dra. Fátima Conceição-Silva

BANCA EXAMINADORA

Dra. Maria de Fátima Madeira (Presidente e Revisora)

Dra. Tânia Salgado de Sousa Torraca

Dra. Valéria Cavalcanti Rolla

Dra. Fernanda Nazaré Morgado

Dra. Raquel de Vasconcellos Carvalhaes de Oliveira

Dr. Leonardo Pereira Quintella (suplente)

Aos meus filhos, que me impulsionam
a cada sorriso puro.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Claudia Maria Valete-Rosalino por ter sido uma orientadora presente em todas as etapas de elaboração e revisão desta tese, sempre amiga e disponível a me orientar e a me apoiar nos momentos difíceis deste projeto.

À Dra Fátima Conceição-Silva por sua contribuição fundamental nos estudos imunohistoquímicos e nos processos de revisão desse trabalho e pela forma brilhante através da qual me ensinou inúmeros fundamentos necessários para confecção deste trabalho.

Ao Dr. Leonardo Pereira Quintella pela paciência e por todo auxílio e orientação acerca dos estudos histopatológicos desta tese.

À Dra Maria de Fátima Madeira pela correção minuciosa, participando de todos os seminários, desde o início deste projeto.

À Dra Raquel de Vasconcellos Carvalhães de Oliveira pela paciência no ensino da Estatística.

À Dra Fernanda Morgado pela disponibilidade e auxílio nos procedimentos relacionados às técnicas laboratoriais de imunohistoquímica e de contagem de células.

À Dra. Valéria Cavalcanti Rolla por desenvolver protocolos de informações que são ricas fontes de pesquisa para muitos trabalhos, como esta tese.

Aos colegas Daniel César Silva da Costa, Márcia Mendonça Lucena e Mariana Reuter Palmeiro, parceiros do dia a dia deste trabalho e na confecção dos artigos.

Ao biólogo Luiz Cláudio Ferreira pela fundamental contribuição na realização das técnicas de imunohistoquímica.

À Dra. Maria Helena de Araújo Melo pelo incentivo e ajuda iniciais, sem os quais este estudo nunca teria se iniciado.

À Dra. Tânia Salgado de Sousa Torraca por me incentivar a prosseguir com a execução deste projeto nos momentos difíceis.

À minha esposa Clarissa, pelo amor e família que construímos juntos e pela sua participação fundamental na execução deste trabalho.

Reis, JGC. **Aspectos clínicos e laboratoriais da tuberculose laríngea**, Rio de Janeiro, 2015, 106 folhas. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A tuberculose laríngea (TBL) é a doença granulomatosa mais frequente da laringe e apresenta características clínicas e endoscópicas variáveis. Assim, exames complementares são necessários para o diagnóstico diferencial desta doença. **OBJETIVO:** Caracterizar as apresentações clínicas e achados laboratoriais da TBL. **MÉTODO:** Esta tese é composta por três artigos com dados de pacientes atendidos entre 2004 e 2014 no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz. No primeiro, foi realizado um estudo transversal com dados de 36 prontuários médicos de pacientes com TBL através da avaliação de fatores associados às características clínicas, epidemiológicas e laboratoriais da TBL. Foram realizadas análises estatísticas para a verificação de associação entre os dados obtidos; P-valores < 0,05 indicaram diferenças significativas. No segundo artigo, descrevemos as características anatômicas, por videolaringoscopia, e a qualidade vocal, por testes fonoaudiológicos, em 24 pacientes com TBL ativa. O terceiro artigo descreve um caso de criptococose de laringe como diagnóstico diferencial de TBL. **RESULTADOS:** No primeiro artigo, observamos que disfonia e tosse foram os principais sintomas apresentados pelos pacientes e as pregas vocais foram o sítio laríngeo mais acometido. O tempo mediano de evolução da doença dos pacientes com disfonia foi significativamente superior ao dos pacientes que não apresentaram este sintoma. Foi observada associação entre disfonia e lesão em prega vocal, e entre odinofagia e lesões em epiglote, aritenóides e pregas ariepiglóticas. A presença de odinofagia foi mais frequente entre os indivíduos com lesões em quatro ou mais sítios laríngeos. O emagrecimento igual ou superior a 10% do peso corporal foi mais frequente nos pacientes com odinofagia como primeiro sintoma e nos pacientes com lesão ulcerada. A presença de dispneia aos esforços foi mais frequente entre os indivíduos com lesões laríngeas mais extensas. O percentual de tabagistas que apresentavam lesões em quatro ou mais sítios laríngeos foi maior do que o encontrado entre os não-tabagistas. A positividade tanto da baciloscopia quanto da cultura do fragmento tecidual laríngeo foram inferiores a positividade dos mesmos exames no escarro. Os resultados do segundo artigo mostraram disfonia e alteração da qualidade vocal em 23 (95.8%) pacientes. Os sítios laríngeos mais frequentemente afetados foram pregas vocais (87.5%), pregas vestibulares (66.7%), epiglote (41.7%), aritenóides (50%) e pregas ariepiglóticas (33.3%) e região interaritenóidea (33.3%). No terceiro artigo relatamos um caso de um paciente com lesão laríngea e acometimento pulmonar concomitantes, com hipótese diagnóstica inicial de tuberculose, com confirmação diagnóstica de criptococose por exame histopatológico de fragmento da lesão laríngea. **CONCLUSÃO:** A TBL provoca lesões sem padrões clínicos e endoscópicos pré-definidos, que podem causar disfonia e alterações na qualidade vocal na maioria dos pacientes. A extensão das lesões laríngeas está associada à dispneia aos esforços e à odinofagia com consequente prejuízo do estado nutricional dos pacientes. Além disso, o tabagismo é um fator importante no desenvolvimento de quadros mais graves de TBL, por estar associado ao desenvolvimento de lesões mais extensas.

No grupo estudado, não foram encontradas associações entre as características microscópicas das lesões com apresentações clínicas da TBL. Em relação ao diagnóstico desta doença, uma vez que a positividade dos exames bacteriológicos em escarro parece não refletir necessariamente o comprometimento laríngeo, o exame histopatológico é fundamental para confirmação diagnóstica de TBL, além de fornecer diagnóstico diferencial com outras doenças, como demonstrado pelo raro caso de criptococose laríngea.

Palavras chave: laringe; tuberculose; fatores de risco; hábito de fumar; disfonia; diagnóstico; diagnóstico diferencial; histologia.

Reis, JGC. **Clinical and laboratory aspects of laryngeal tuberculosis**, 2015. Thesis. 106 pages. [PhD in Clinical Research in Infectious Diseases] Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Tuberculosis is the most frequent larynx granulomatous disease. There are no pathognomonic clinical and endoscopic features of laryngeal tuberculosis (LTB). Thus, microbiological and histopathological tests are essential for the diagnosis of LTB and need to be better characterized to facilitate the differential diagnosis. **OBJECTIVE:** To characterize the clinical features and laboratory findings of LTB. **METHOD:** This thesis consists of three articles which evaluate patients with LTB treated at the Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases–Oswaldo Cruz Foundation from 2004 to 2014. In the first, we conducted a cross-sectional study from the medical records of 36 patients and evaluated factors associated to clinical, epidemiological and laboratory features of LTB. Statistical analyzes were performed to check association between the results obtained. P-values <0.05 indicated significant differences. In the second article, we describe the anatomical features, by videolaryngoscopy, and rate the vocal quality of 24 patients with active LTB by means of speech-language tests. The third article describes a case of laryngeal cryptococcosis as a differential diagnosis of LTB. **RESULTS:** In the first article, dysphonia and cough were the main symptoms presented by patients and the vocal folds the most frequently affected site. Average disease evolution duration was significantly higher in patients with dysphonia than in patients without this symptom. We observed association between dysphonia and vocal fold lesions and between odynophagia and lesions in the epiglottis, arytenoids and aryepiglottic folds. Odynophagia was more frequent in individuals with lesions in four or more laryngeal sites. Weight loss equal or above 10% of the body weight was more frequent in patients with odynophagia as first symptom and in patients with ulcerated lesion. Dyspnea on exertion was more frequent in individuals with larger laryngeal lesions. The percentage of smokers with lesions in four or more laryngeal sites was greater than that found in non-smokers. Positive laryngeal tissue fragment bacilloscopy and culture were less than positive sputum examinations. The results of the second article showed dysphonia and alteration of the vocal quality in 23 (95.8%) patients. The most frequently affected laryngeal sites were: vocal folds in 87.5%; vestibular folds in 66.7%; epiglottis in 41.7%; arytenoid in 50%; aryepiglottic folds in 33.3%; and interarytenoid region in 33.3% patients. In the third article we report a case of a patient with laryngeal lesion and concomitant pulmonary involvement, with an initial diagnosis of tuberculosis. The histopathological examination of the laryngeal lesion fragment confirmed the diagnosis of cryptococcosis. **CONCLUSION:** LTB causes lesions without clinical and endoscopic predefined patterns, which can lead to dysphonia and vocal quality alteration in most patients. The extent of laryngeal lesions is associated with dyspnea on exertion and odynophagia with consequent impairment of the nutritional status. Moreover, smoking may be an important factor in the development of more severe forms of LTB, since it appears to be associated with more extensive LTB lesions. In relation to the diagnosis of this disease, the histopathological examination is essential for diagnostic confirmation of TBL, because the positivity of sputum bacteriologic examination seems not to necessarily

reflect laryngeal involvement. In addition, it provides differential diagnosis with other diseases, as demonstrated by the rare case of laryngeal cryptococcosis.

Keywords: larynx; tuberculosis; risk factors; smoking; dysphonia; diagnosis; diagnosis, differential; histology.

LISTA DE IMAGENS

TESE

- | | | |
|-------------|---|----|
| Figura 1 – | Posição da laringe no pescoço – vista anterior. | 2 |
| Figura 2 – | Posição da laringe no pescoço – vista lateral. | 2 |
| Figura 3 – | Cartilagens da laringe, vista anterior da laringe. | 3 |
| Figura 4 – | Músculos extrínsecos da laringe. | 4 |
| Figura 5 – | Ação dos músculos intrínsecos da laringe. | 5 |
| Figura 6 – | Laringoscopia direta (parte inferior da imagem corresponde à porção posterior): sítios e estruturas anatômicas da laringe normal, em posição respiratória, com pregas vocais abduzidas (rima da glote aberta). | 6 |
| Figura 7 – | Laringoscopia direta (parte inferior da imagem corresponde à porção posterior): sítios e estruturas anatômicas da laringe normal, em posição adotada durante a fonação, com pregas vocais aduzidas (rima da glote fechada). | 6 |
| Figura 8 – | Estrutura histológica de toda a laringe. | 8 |
| Figura 9 – | Ilustração esquemática das camadas da prega vocal. | 10 |
| Figura 10 – | Imagem de videolaringoscopia (laringoscopia indireta) de paciente com laringite crônica por tuberculose com lesão exofítica acometendo as regiões glótica e supraglótica da laringe. | 19 |
| Figura 11 – | Imagem de videolaringoscopia (laringoscopia indireta) de paciente com laringite crônica por tuberculose com lesão granulosa acometendo a região supraglótica da laringe e com ulcerações nas | 19 |

pregas ariepiglóticas.

- Figura 12 – Imagem de videolaringoscopia (laringoscopia indireta) de paciente com laringite crônica por tuberculose com processo inflamatório inespecífico caracterizado por hiperemia da prega vocal direita. 20
- Figura 13 – Imagem de videolaringoscopia (laringoscopia indireta) de paciente com laringite crônica por tuberculose com lesão erosiva parcial acometendo a metade direita da epiglote. 20
- Figura 14 – Resumo esquemático das conclusões obtidas a partir das associações presentes entre os fatores clínicos e topográficos na tuberculose laríngea. 79

ARTIGO 1

- Figura 1 – Pictures of images obtained by Videolaryngoscopy: 56
- a- Hyperemic and flat lesion with smooth surface of right true vocal fold - example of nonspecific inflammatory lesion. b- Hyperemic lesion, with exophytic appearance and rough surface located in the false vocal folds – example of granulomatous lesion. c- Example of ulcerated lesion with fibrin located in aryepiglottic fold and right arytenoid region. d- Example of erosive lesion of the right half of the epiglottis.

ARTIGO 2

Figura 1 – Videolaryngoscopy images and diagrams of 63 phonation deviation in 3 patients with laryngeal tuberculosis, Evandro Chagas, National Institute of Infectious Diseases, Brazil, 2014. *(A) epiglottis with granular appearance with amputation of the edges with uninjured vocal folds (B) phonatory deviation diagram from the normal range (C) granulous infiltrate of the vallecula, necronis area of the epiglottis, infiltration of aryepiglottic folds and arytenoid, precluding visualization of the vocal folds (D) phonatory deviation diagram from the normal range (E) presence of infiltration and hyperemia of the arytenoid, left vocal fold and left vestibular fold (F) phonatory deviation diagram from the normal range.

ARTIGO 3

Figura 1 – Endoscopic and microscopic images of laryngeal 78 lesions caused by *Cryptococcus neoformans* in a renal transplanted patient: Arrow indicates laryngeal ulcerated lesion in the mucosa of the right arytenoid region and adjacent half of the aryepiglottic fold; b e c) Hematoxylin-eosin, x100 e x200. Laryngeal mucosa with scarce inflammatory infiltrate without granulomas and intact epithelium (without ulceration);

d) Grocott's methenamine stain x1000. Numerous, round, fungi forms -one with a single budding (Arrow);
e) PAS-Alcian Blue (pH 2,5) x1000. Staining of fungal wall in red (PAS) and of its capsule in blue (Alcian Blue); f) Mucicarmin x1000. Staining of fungal capsule in reddish pink, characteristic of *Cryptococcus* sp.;
g,h,i) Immunohistochemical study using peroxidase-AEC system (positively stained cells, brown color) for identification of: neutrophils x100 (g), macrophages x1000 (h) e natural killer cells x400 (i). Arrows indicate positively stained cells; observe in "h" numerous fungi forms inside the broken macrophage and in "i" a heterogeneous distribution of natural killer cells, even around blood vessels.

LISTA DE QUADROS

- | | | |
|-----------|--|----|
| Quadro 1- | Esquema básico para tratamento da tuberculose em adultos e adolescentes. | 27 |
| Quadro 2- | Esquemas de tratamento de acordo com o quadro clínico do paciente e unidades de atendimento. | 28 |

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
E	Etambutol
Et	Etionamida
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
H	Isoniazida
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
INI	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
PNCT	Programa Nacional de Controle da Tuberculose
PPD	Antígeno Proteico Purificado
R	Rifampicina
S	Estreptomicina
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
TB	Tuberculose
TBL	Tuberculose Laríngea
TDO	Tratamento Diretamente Observado
TRM-TB	Teste rápido molecular
TSA	Teste de sensibilidade antimicrobiana
Z	Pirazinamida

SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO	1
1.1) LARINGE	1
1.1.1) Anatomia da laringe.....	1
1.1.2) Histologia da laringe.....	7
1.1.3) Fisiologia da laringe.....	10
1.1.4) Métodos de avaliação da laringe e da voz	12
1.2) TUBERCULOSE	13
1.2.1) Histórico/epidemiologia.....	13
1.2.2) Fisiopatogenia da tuberculose laríngea.....	17
1.2.3) Características das lesões laríngeas.....	17
1.2.4) Sintomatologia do envolvimento laríngeo	21
1.2.5) Diagnóstico da tuberculose	22
1.2.6) Diagnóstico diferencial.....	26
1.2.7) Tratamento.....	26
2) JUSTIFICATIVA	31
3) OBJETIVOS	32
3.1) OBJETIVO GERAL	32
3.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4) MÉTODOS E RESULTADOS	33
4.1) ARTIGO 1	34
4.2) ARTIGO 2	57
4.3) ARTIGO 3	65
5) CONCLUSÃO	79
6) REFERÊNCIAS	82

1) INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa endêmica em nosso país (1) e pode acometer vários sítios anatômicos e órgãos humanos, dentre eles, a laringe (2-4). A tuberculose laríngea, apesar de ser a mais frequente doença granulomatosa deste órgão (5, 6), apresenta características clínicas e laboratoriais que ainda necessitam ser melhor elucidadas. Desta forma, conhecer a laringe, suas interações com outras regiões do corpo, assim como as diversas formas de infecção e doenças deste sítio anatômico é fundamental para o diagnóstico diferencial, acompanhamento e cura de lesões nos pacientes acometidos.

1.1) LARINGE

1.1.1) Anatomia da laringe

A laringe é um órgão que pode ser entendido como um cilindro membranoso e muscular, ímpar, mediano, situado anteriormente no pescoço e que mede, em média, 4,5 cm no homem e 3,5 cm nas mulheres. Este tubo é revestido internamente por uma mucosa e protegido, externamente, à maneira de um escudo, pela cartilagem tireoide. Superiormente, sua estrutura tubular se fixa no osso hioide, abrindo-se para a faringe e, inferiormente, se fixa e estabelece comunicação com a traqueia (figuras 1 e 2). Apresenta um esqueleto osseocartilaginoso que, unido por ligamentos, serve de inserção de músculos que participam da fisiologia laríngea. A laringe está ligada às funções de proteção das vias aéreas (principalmente durante a deglutição), de manutenção da permeabilidade da via aérea (respiração) e de fonação (7, 8).

Vista Anterior

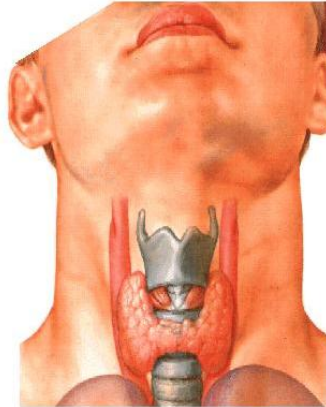


Figura. 1- Posição da laringe no pescoço – vista anterior (Netter, 2011) (9).

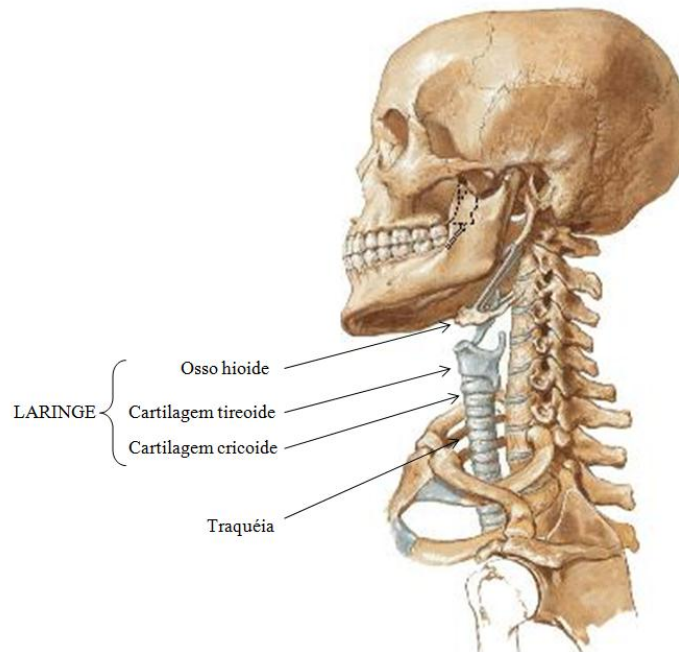


Figura. 2- Posição da laringe no pescoço – vista lateral (Netter, 2011) (9).

O esqueleto laríngeo é constituído pelo osso hioide e pelas cartilagens tireóide, epiglote, cricóide, corniculada e cuneiforme. As três primeiras são maiores, ímpares e medianas, enquanto que as restantes são pares e pósterolaterais. Os

ligamentos que interligam as estruturas deste esqueleto são a membrana tireo-hióidea, o ligamento cricotireóideo, ligamento vocal e ligamento vestibular (figura 3) (7).

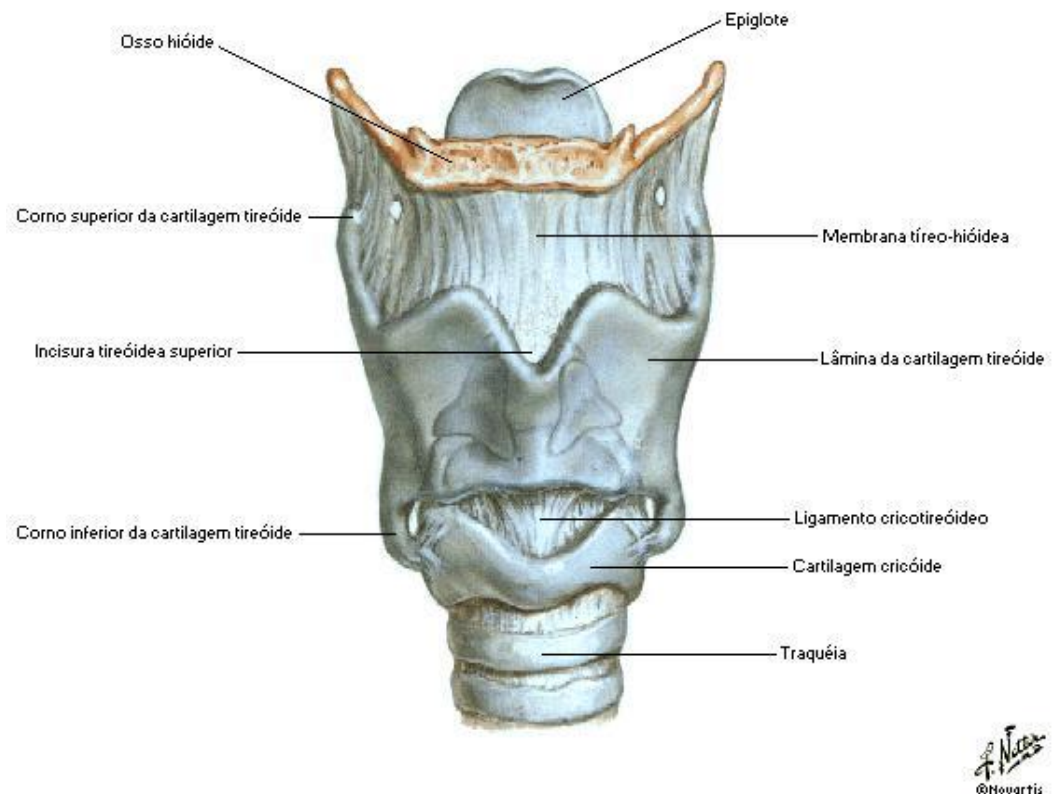


Figura. 3 - Cartilagens da laringe, vista anterior da laringe (Netter, 2011) (9).

Os músculos laríngeos são anatomicamente divididos em extrínsecos e intrínsecos. Os primeiros são aqueles que movimentam a laringe como um todo e podem ser classificados como levantadores e depressores. Os levantadores incluem os músculos tireo-hióideo, estilo-hióideo, milo-hióideo, estilofaríngeo, palatofaríngeo e digástrico e os depressores, o esterno-hióideo, omo-hióideo e esternotireóideo (figura 4) (7).

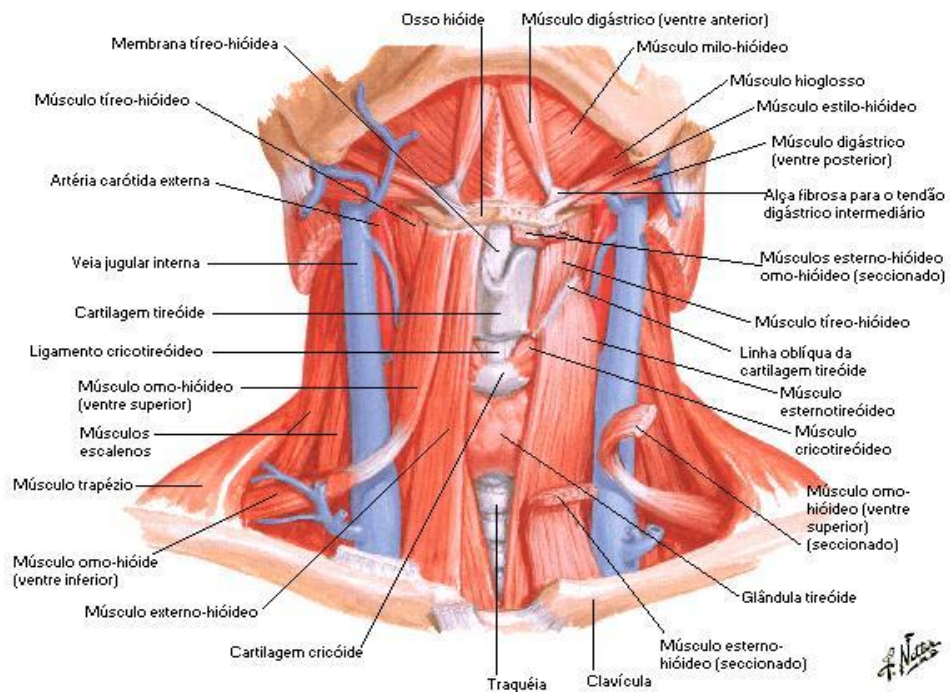


Figura. 4- Músculos extrínsecos da laringe (Netter, 2011) (9).

Os músculos intrínsecos da laringe são o tireoaritenóideo, o cricoaritenóideo lateral, o cricoaritenóideo posterior, os aritenóideos transverso e oblíquo e o cricotíreoideo (7), sendo responsáveis pela adução, abdução e tensão das pregas vocais. O músculo tireoaritenóideo é dividido em porção lateral e porção medial, também chamada de músculo vocal (10). Os músculos adutores são o cricoaritenóideo lateral e os aritenóideos transverso e oblíquo; os abdutores são os cricoaritenóideos posteriores e os tensores são o cricotíreoideo e o tireoaritenóideo (figuras 5, 6 e 7) (7, 10). Toda a inervação motora destes diferentes músculos é fornecida pelo nervo laríngeo inferior ou recorrente, com exceção do cricotíreoideo, cuja motricidade é fornecida pelo nervo laríngeo superior, nervo misto que é também responsável pela sensibilidade da mucosa laríngea (11).

As cartilagens e suas conexões (ligamentos e musculatura intrínseca) determinam o relevo interno observado através da cavidade do cilindro laríngeo (figuras 6 e 7) (7, 8).

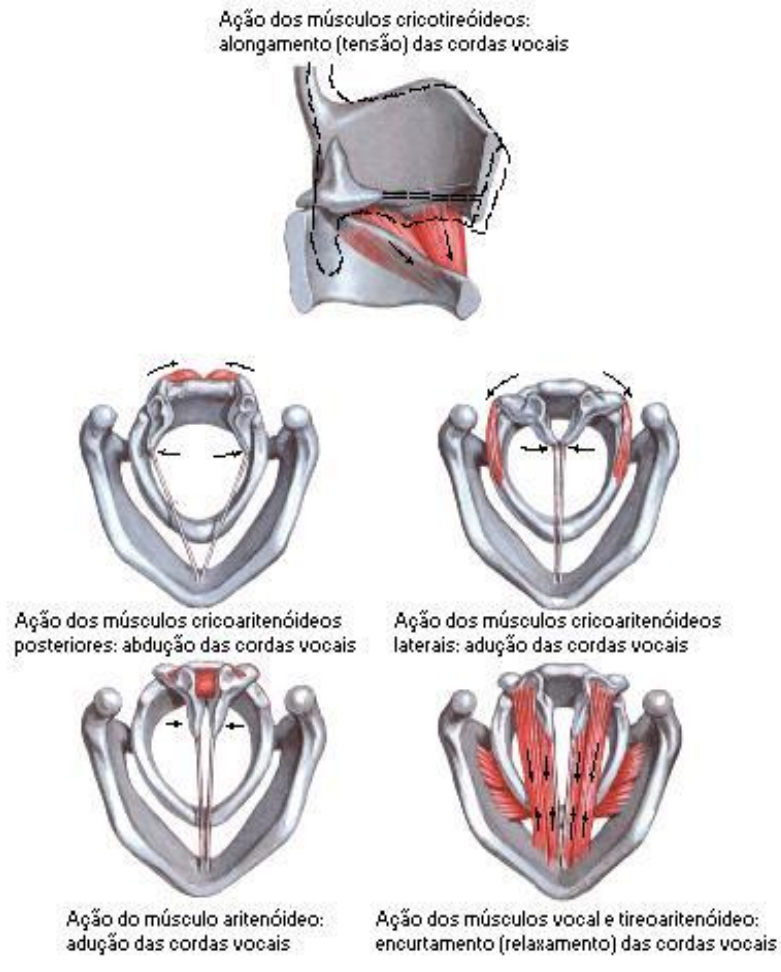


Figura. 5- Ação dos músculos intrínsecos da laringe (Netter, 2011 (9)).

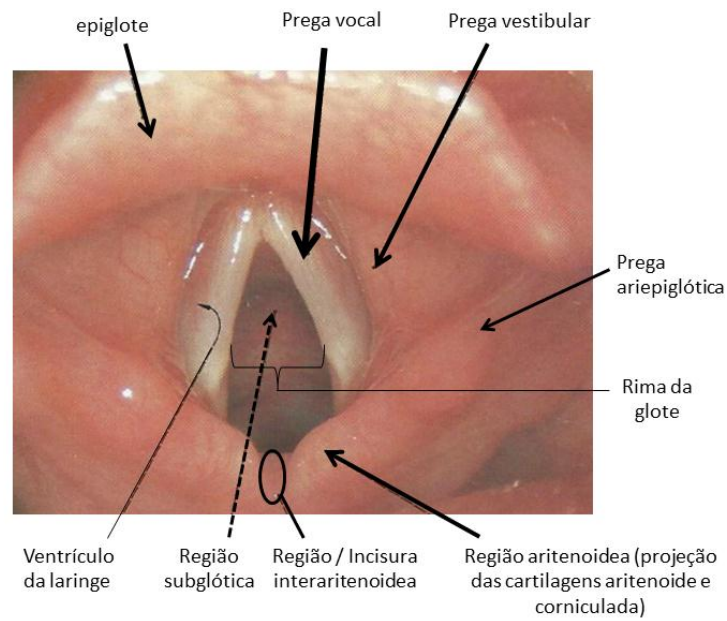


Figura. 6 - Laringoscopia direta (parte inferior da imagem corresponde à porção posterior): sítios e estruturas anatômicas da laringe normal, em posição respiratória, com pregas vocais abduzidas (rima da glote aberta) (adaptada, Sobotta, 1993) (12).

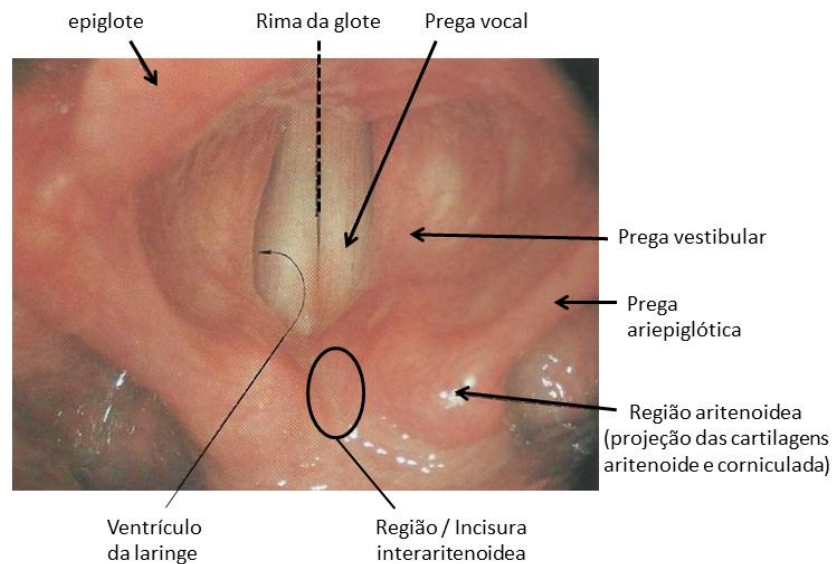


Figura. 7 - Laringoscopia direta (parte inferior da imagem corresponde à porção posterior): sítios e estruturas anatômicas da laringe normal, em posição adotada durante a fonação, com pregas vocais aduzidas (rima da glote fechada) (adaptada Sobotta, 1993) (12).

Do ponto de vista anatômico, a laringe pode ser dividida em três regiões cujos limites não são precisos: supraglote, glote e subglote. A supraglote inclui os seguintes subsítios: epiglote, prega ariepiglótica, aritenóide, pregas vestibulares e ventrículo. A glote é representada pelas pregas vocais e pelas comissuras anterior e posterior. A subglote compreende o segmento delimitado pelo limite inferior da glote até a borda inferior da cartilagem cricoide (figura 8) (8).

1.1.2) Histologia da laringe

A mucosa da laringe é contínua com a da faringe e da traqueia. Um epitélio pavimentoso estratificado reveste a superfície lingual e uma pequena extensão da superfície faríngea da epiglote e das pregas vocais verdadeiras. Nas demais regiões, o epitélio é pseudoestratificado cilíndrico ciliado com células caliciformes. As glândulas seromucosas da laringe são encontradas por toda lâmina própria, exceto ao nível das pregas vocais. A lâmina própria é composta por tecido conjuntivo frouxo, geralmente rico em mastócitos (figura 8) (13).

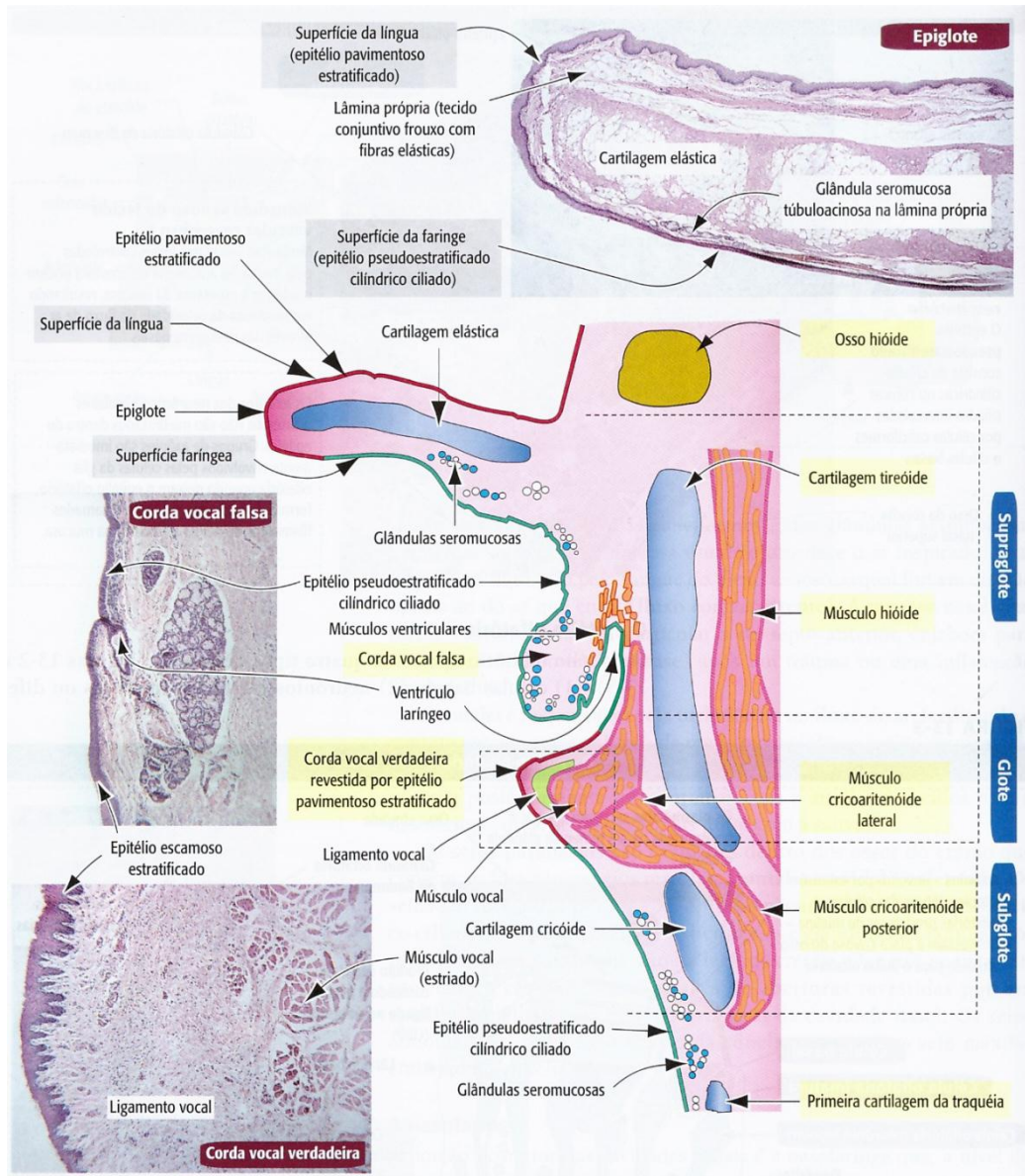


Figura 8 - Estrutura histológica de toda a laringe (Kierszenbaum, 2004) (13).

A borda vibratória da prega vocal é formada por cinco camadas. O revestimento epitelial fino e lubrificado constitui a área de contato entre as pregas vocais e funciona como uma cápsula auxiliadora na manutenção de seu contorno. O epitélio é escamoso estratificado, mais adaptado a suportar o trauma gerado pelo contato entre as pregas. A camada superficial da lâmina própria, também conhecida como espaço de Reinke, é composta por matriz e tecido conjuntivo frouxo, contendo poucos fibroblastos. A camada intermediária, por sua vez, consiste

fundamentalmente em fibras elásticas e não contem fibroblastos. A camada profunda da lâmina própria é formada principalmente por fibras colágenas e é rica em fibroblastos. O músculo vocal forma o corpo da prega vocal. As camadas intermediária e profunda das pregas vocais constituem o ligamento vocal e situam-se imediatamente abaixo do espaço de Reinke (10).

Mecanicamente, as estruturas das pregas vocais atuam como três camadas: cobertura (formada pelo epitélio e espaço de Reinke), transição (constituída pelas camadas intermediária e profunda da lâmina própria) e corpo (músculo vocal). Há uma diferença gradual na rigidez das pregas vocais devido à diminuição de fibras elásticas e aumento de fibras colágenas da cobertura em direção ao corpo. A camada superficial da lâmina própria é bastante flexível ao passo que o músculo vocal é bastante rígido. O espaço de Reinke é a camada que vibra mais intensamente durante a fonação (14, 15). A compreensão da histologia das pregas vocais é importante para a abordagem terapêutica adequada para cada tipo de doença, uma vez que processos patológicos distintos podem acometer as diferentes camadas deste sítio anatômico laríngeo (10).

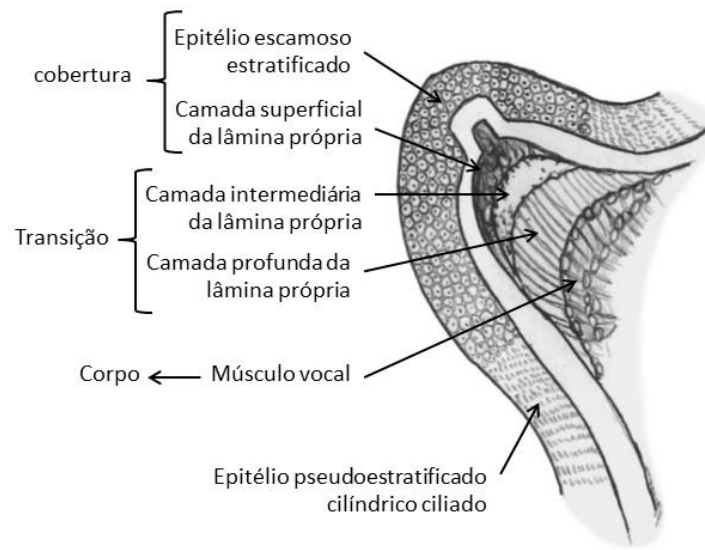


Figura 9 - Ilustração esquemática das camadas da prega vocal (Ballengers, 2003) (16).

1.1.3) Fisiologia da laringe

As funções da laringe são proteção das vias aéreas baixas, respiração e fonação. O desempenho destas funções requer um perfeito sistema neuromuscular capaz de responder a estímulos voluntários e involuntários apresentados à laringe (16).

Os principais mecanismos protetores das vias respiratórias baixas são fechamento da laringe, apneia e tosse (16, 17). O reflexo de fechamento glótico é um reflexo polissináptico que protege a árvore traqueobrônquica contra a aspiração ou penetração de corpos estranhos (16). A apneia, cessação da respiração pelo fechamento da laringe, pode ser desencadeada pela estimulação mecânica deste órgão ou em resposta a agentes químicos (17). Estas respostas protetoras, quando exacerbadas, podem resultar em laringoespasmos (16, 17). A tosse exerce papel protetor auxiliando na limpeza da árvore traqueobrônquica e permeabilidade das

vias respiratórias, podendo ser uma ação voluntária ou uma resposta involuntária da laringe ou de receptores pulmonares (17). Adicionalmente, a elevação faringo-laríngea, pela contração dos músculos suprahióideos, sobre a base da língua já recuada, representa um papel protetor das vias aéreas durante a deglutição (18).

A laringe apresenta importante papel na regulação da respiração. Este órgão é contíguo com a traqueia, e é capaz não somente de realizar abertura e fechamento rápidos, mas também de sofrer alterações abruptas de resistência. Desta maneira, a laringe é mais adaptada do que qualquer outra porção do aparelho respiratório para regular o fluxo de ar. As alterações de resistência resultantes das respostas laríngeas a estímulos respiratórios tais como pressão de ar negativa e alterações gasosas na corrente sanguínea têm efeito benéfico na ventilação (19).

A fisiologia da produção vocal é extremamente complexa. A voz é influenciada por vários sistemas do organismo e a laringe representa importante papel, uma vez que é o componente mais expressivo e sensitivo do processo de produção vocal (10).

A produção vocal voluntária inicia-se no córtex cerebral, que após uma sequência de complexas interações, transmite estímulos necessários para a musculatura laríngea, torácica e abdominal, e para o trato vocal. O processo normal de fonação necessita de suporte respiratório adequado, no qual os pulmões, auxiliados pela contração do diafragma, dos músculos intercostais e da parede abdominal, impulsionam para cima a coluna de ar existente nos brônquios e na traqueia. Esta coluna de ar, ao atingir a glote, resulta na vibração das pregas vocais (11), que representam os componentes oscilatórios do mecanismo de produção vocal (10). Os movimentos rápidos e sucessivos de adução e abdução das pregas vocais que entrecortam a coluna de ar em passagem pela glote originam a vibração

destas estruturas e produção do som (11). A frequência de fechamento e abertura glóticos é determinante para a qualidade vocal (10).

1.1.4) Métodos de avaliação da laringe e da voz

Os principais métodos de avaliação da laringe incluem a videoendoscopia e a estroboscopia. A videolaringoscopia é uma ferramenta para avaliação da estrutura anatômica e da função laríngea durante o exame clínico do paciente. Este exame, associado ou não à estroboscopia, é utilizado para diagnosticar processos patológicos, realizar acompanhamento destas doenças ao longo do tempo e fornecer informações acerca de resultados de tratamentos respiratórios e/ou fonoaudiológicos. A estroboscopia é útil para avaliação de alterações nos padrões vibratórios das pregas vocais, avaliação da flexibilidade mucosa, do fechamento glótico e das alterações estruturais mínimas (17).

A videolaringoscopia pode ser realizada com endoscópios rígidos ou flexíveis. A endoscopia rígida é indicada nos casos em que se deseja avaliar a integridade das estruturas e mucosa laríngeas e pode ser realizada com telescópios de 70º ou 90º. O exame com endoscópio flexível, por sua vez, é preferencialmente utilizado para avaliação do movimento da laringe, como, por exemplo, durante a fonação e canto, ao invés do aspecto estrutural e mucoso deste órgão (17).

A avaliação vocal pode ser realizada através de ferramentas que incluem a Avaliação Perceptiva Auditiva Vocal e a Análise Acústica da Voz. Um dos métodos de avaliação perceptiva auditiva vocal é a escala GRBASI, considerada um instrumento eficaz para a avaliação perceptiva de alterações vocais relacionadas à irregularidade vibratória das pregas vocais. A sigla GRBASI significa G (*grade*) =

grau geral de rouquidão; R (*roughness*) = rugosidade; B (*breathiness*) = soprosidade; A (*asteny*) = astenia; S(*strain*) = tensão e I (*instability*) = instabilidade. A classificação das alterações varia de 0 a 3, considerando (0) sem alteração, (1) levemente alterado, (2) moderadamente alterado e (3) alteração grave (14, 20).

A análise acústica vocal avalia a voz de forma mais objetiva, através da quantificação do sinal sonoro. Suas vantagens são o aumento da precisão diagnóstica e a identificação e documentação da qualidade vocal. Os parâmetros vocais acústicos analisados são *Jitter* que indica a variabilidade da frequência fundamental a curto prazo; *Shimmer* que indica a variabilidade da amplitude da onda sonora a curto prazo; e *Glottal-to-noise excitation ratio*, relacionado à presença e proporção de ruído na glote (15).

1.2) TUBERCULOSE

1.2.1) Histórico/epidemiologia

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa de evolução crônica que se caracteriza anátomo-patologicamente pela presença de granulomas e necrose caseosa central, sendo causada pela bactéria denominada *Mycobacterium tuberculosis*. Sua transmissão ocorre predominantemente por via aérea e acomete em especial os pulmões, mas pode atingir qualquer outro órgão do corpo (2, 3).

A TB foi uma doença altamente prevalente em humanos por muitas décadas até o início do século passado. Após o advento de antimicrobianos, de programas de prevenção e de melhoria nas condições socioeconômicas, a incidência de TB caiu significativamente até a década de 80 do século XX (21, 22). Entretanto, nos anos

subsequentes, a disseminação da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), o uso não controlado de antimicrobianos e o surgimento de cepas bacterianas multirresistentes resultaram no novo aumento da incidência desta doença (2, 6, 21).

A TB é um dos mais sérios problemas de saúde global. Nove milhões de novos casos de tuberculose foram registrados em 2013 pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Após o surgimento do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) ela se tornou a segunda causa de morte por um único agente infeccioso. Em 2013, 1,5 milhões de pessoas morreram de tuberculose no mundo, incluindo 360.000 de pessoas HIV-positivas (23). No Brasil, em 2014, a TB representou a 4ª causa de morte por doenças infecciosas e a primeira causa de morte por doença identificada entre pessoas com HIV (24).

Segundo estimativas da OMS, 22 países, entre eles o Brasil, são responsáveis por 80% da carga mundial de TB e por isto são considerados países prioritários para as ações de controle da infecção. O Brasil ocupa a 16ª posição em número absoluto de casos; por sua vez, Índia, China e África do Sul são os países com maior carga da doença. Ao ser considerado o coeficiente de incidência, o Brasil ocupa a 22ª posição entre esses países (25).

Em 2013, foram registrados 83.310 casos de TB no Brasil (23). Observa-se redução do coeficiente de incidência da doença, passando de 41,5/100 mil habitantes em 2005 para 33,5 por 100 mil habitantes em 2014, o que corresponde a uma redução média de 2,3% ao ano nesse período. O Estado do Rio de Janeiro apresentou o 2º maior coeficiente de incidência do país em 2013 (25). O coeficiente de mortalidade por TB também apresentou redução no período de 2004 a 2013. Em 2013, os estados com maiores coeficientes foram Rio de Janeiro (5,0 óbitos/100 mil hab.), Pernambuco (3,8/100 mil hab.) e Acre (3,6/100 mil hab.). Apesar das reduções

nos coeficientes de incidência e de mortalidade, a doença ainda é endêmica no país, concentrando-se em grandes centros urbanos, nos aglomerados populacionais e, sobretudo, em populações mais vulneráveis, como a população privada de liberdade. Além disso, devido às altas proporções de abandono de tratamento, a TB resistente aos fármacos tem se tornado uma importante apresentação desta doença no Brasil (1).

O advento da epidemia do HIV/AIDS, nos países nos quais a TB é endêmica, tem acarretado aumento significativo de tuberculose pulmonar com baciloscopia negativa, sendo crescente a incidência das formas extrapulmonares, dentre estas, a tuberculose laríngea, que é a mais frequente doença granulomatosa infecciosa da laringe (5, 26). Na notificação de TB no Brasil, não existe um campo especificando que se trata de tuberculose laríngea. A forma laríngea é notificada junto às outras extrapulmonares. No Brasil ocorreu um aumento da frequência das taxas de detecção de casos das formas extrapulmonares em relação às pulmonares, de 4,85% em 2010 para 11,97% em 2012 (27).

A TB é transmitida por via aérea em praticamente a totalidade dos casos. A infecção ocorre a partir da inalação de núcleos secos de gotículas contendo bacilos expelidos pela tosse, fala ou espirro de doente com tuberculose ativa de vias respiratórias (pulmonar ou laríngea) (3, 26). Os doentes bacilíferos, isto é, aqueles cuja baciloscopia de escarro é positiva, são a principal fonte de infecção. Doentes com tuberculose pulmonar e baciloscopia negativa, mesmo que tenham resultado positivo à cultura, são muito menos eficientes como fontes de transmissão, embora, ainda assim, isto possa ocorrer (26).

A TB pode acometer as vias aéreo-digestivas superiores, causando lesões de aspecto infiltrante liso, granuloso ou ulcerado e, por vezes, com erosão parcial ou

total das estruturas anatômicas atingidas. A tuberculose laríngea (TBL) é geralmente secundária à infecção pulmonar primária, mas pode também ocorrer pela inoculação direta do microorganismo na laringe através de aerossóis ou pela disseminação hematogênica do bacilo (2, 6, 28). Dados de outros países mostram que a TBL representa menos de 2% dos casos de TB extrapulmonar (21, 29) e sua incidência entre os pacientes diagnosticados com TB pulmonar varia de 0,08 a 5,1% (2, 30, 31). No entanto, a incidência exata de TBL é difícil de ser estimada, sendo provável que esta doença seja mais frequente do que é documentada (30, 32, 33). Mesmo nos países onde é mensurada, a TBL é provavelmente subnotificada devido à recomendação da OMS de que os casos de TBL devem ser classificados como casos de TB pulmonar para fins de registro epidemiológico (27, 34).

As características da TBL sofreram alterações ao longo dos anos e o diagnóstico desta doença tornou-se um desafio para otorrinolaringologistas. No passado, a TBL acometia tipicamente adultos jovens, na 2ª ou 3ª décadas de vida, portadores de TB pulmonar avançada. Os sintomas incluíam tosse, hemoptise, febre, perda de peso e sudorese noturna. As lesões laríngeas, geralmente ulcerogranulomatosas, localizavam-se na porção posterior da laringe devido ao acúmulo de escarro na região aritenóidea de pacientes acamados (2, 33, 35).

A TBL acomete principalmente indivíduos do sexo masculino, com uma proporção homem–mulher variando de 1.5:1 a 9:1 entre os estudos (6, 36-38). A doença acomete principalmente indivíduos na quinta ou sexta décadas de vida (4, 6, 35, 37) e com a mesma distribuição de idade entre homens e mulheres (35), apesar de já ter sido observada uma idade média significativamente menor entre mulheres portadoras de TBL (4). Fatores como desnutrição, moradia precária e comprometimento imunológico de certos grupos populacionais, como coinfeção

pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) podem contribuir para o desenvolvimento da TBL (3, 25).

1.2.2) Fisiopatogenia da tuberculose laríngea

Há duas teorias que tentam explicar a forma de contaminação da laringe pelo *M. tuberculosis*. A teoria broncogênica fundamenta-se na disseminação direta de bacilos provenientes do escarro contaminado da árvore endobrônquica a partir da infecção pulmonar por esta micobactéria. Na teoria hematogênica, a laringe seria infectada através de vasos sanguíneos ou linfáticos a partir de outros focos infecciosos primários distantes, ao invés da disseminação direta pelas vias aéreas (33). A maioria dos autores concorda que a teoria broncogênica é a regra, ou seja, a infecção laríngea é geralmente secundária à infecção pulmonar (4, 35, 39, 40). A TBL primária seria excepcional, com suspeitas de que pouca exploração acerca de TB pulmonar teria sido conduzida (28). Em vários estudos, não se identificou nenhum caso de TBL primária (28, 31, 35, 37, 38). Outros autores, no entanto, apoiam a teoria hematogênica e relatam que sua frequência tem aumentado atualmente, resultando em consequente elevação na incidência de TBL primária (5, 6, 41, 42).

1.2.3) Características das lesões laríngeas

No passado, a TBL era classicamente caracterizada pela presença de lesões múltiplas, ulceradas em sua maioria, que acometiam a porção posterior da laringe devido à contaminação pelo escarro em pacientes acamados (35). Atualmente, observa-se uma diversidade de aparência endoscópica das lesões entre diferentes estudos, não havendo características patognomônicas indicativas desta doença (4).

O exame endoscópico da mucosa laríngea pode revelar lesões de aspectos variáveis tais como lesões exofíticas (figura 10), nodulares, ulceradas (figura 11), hiperêmicas e/ou edemaciadas (figura 12), além de menos frequentemente o surgimento de lesões erosivas (figura 13) (6). Lesões ulceradas ainda são observadas (43, 44), mas alguns autores sugerem que as lesões são hipertróficas ou até mesmo exofíticas na maioria dos casos, e difíceis de distinguir das laringites crônicas de outras etiologias (2, 39-41).

Em relação à localização das lesões, qualquer porção da laringe pode ser acometida. envolvimento clássico da porção posterior não é mais um sinal cardinal de TBL (33). Apesar de alguns autores não relatarem predileção por nenhum sítio anatômico (32, 43), e alguns ainda confirmarem o envolvimento clássico da porção posterior da laringe (36, 38, 41), a maioria relata acometimento principal das pregas vocais (2, 6, 44, 45). As lesões podem ser uni ou bilaterais (4, 6, 35) e podem acometer mais de uma estrutura anatômica da laringe (4, 37).

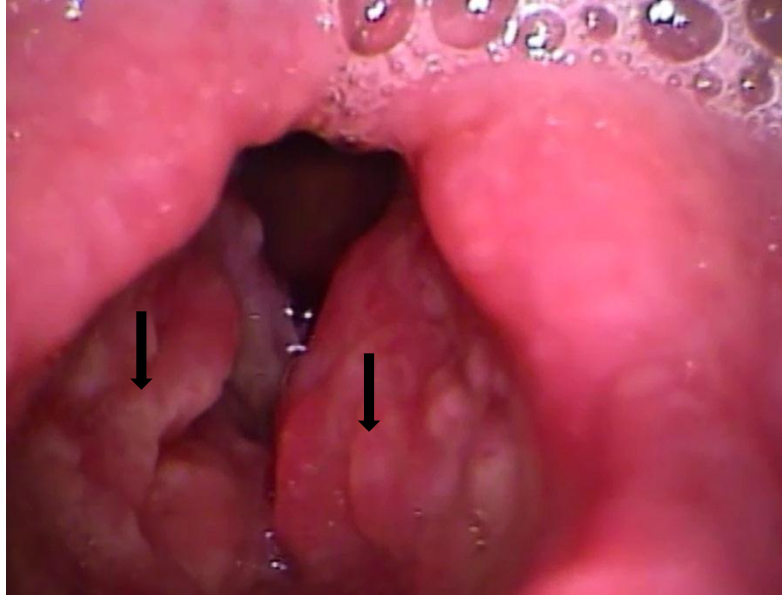


Figura 10 - Imagem de videolaringoscopia (laringoscopia indireta) de paciente com laringite crônica por tuberculose com lesão exofítica (setas) acometendo as regiões glótica e supraglótica da laringe (Arquivo INI/Fiocruz, 2013).

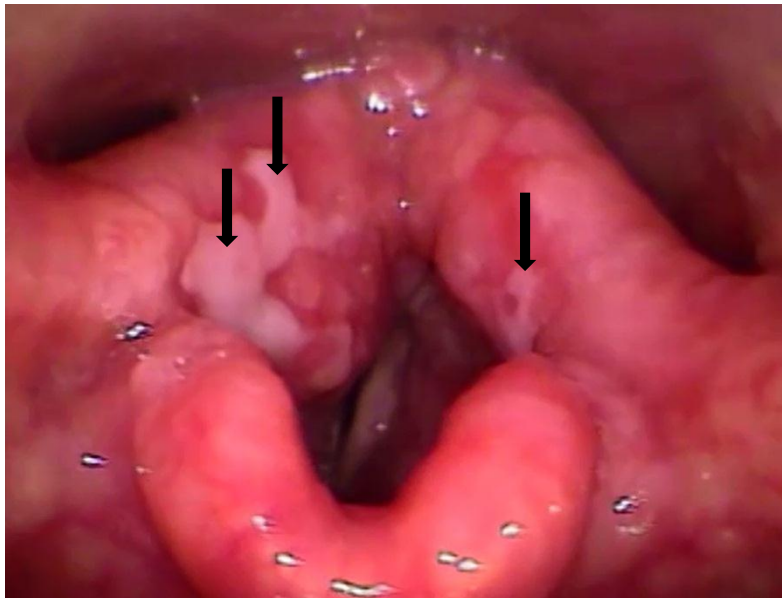


Figura 11 - Imagem de videolaringoscopia (laringoscopia indireta) de paciente com laringite crônica por tuberculose com lesão granulosa acometendo a região supraglótica da laringe e com ulcerações nas pregas ariepiglóticas (setas) (Arquivo INI/Fiocruz, 2013).

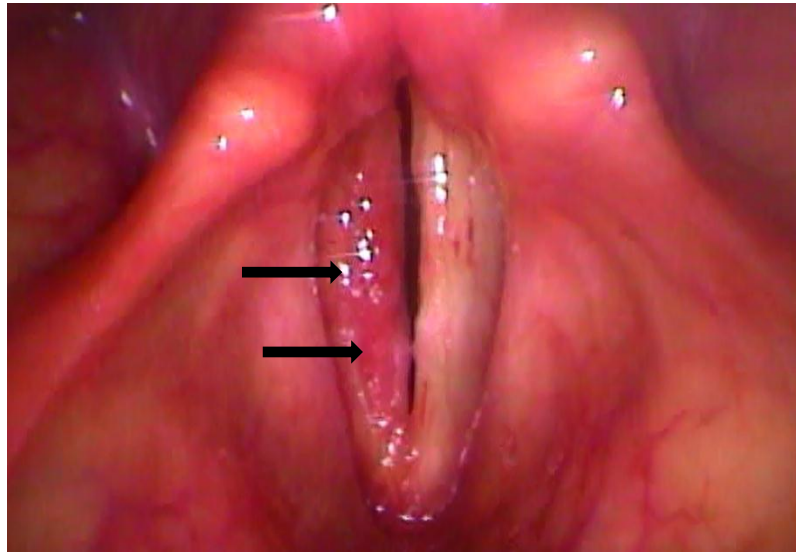


Figura 12 - Imagem de videolaringoscopia (laringoscopia indireta) de paciente com laringite crônica por tuberculose com processo inflamatório inespecífico caracterizado por hiperemia da prega vocal direita (setas) (Arquivo INI/Fiocruz, 2013).

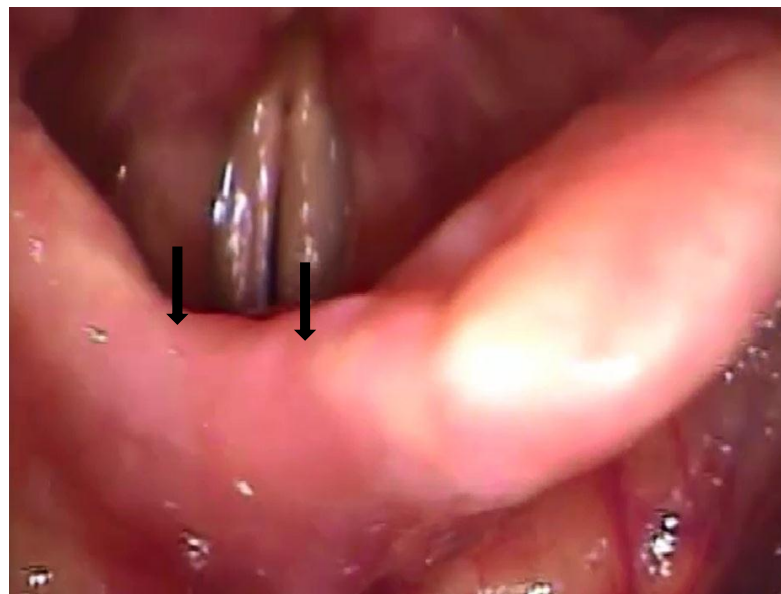


Figura 13 - Imagem de videolaringoscopia (laringoscopia indireta) de paciente com laringite crônica por tuberculose com lesão erosiva parcial (setas) acometendo a metade direita da epiglote (Arquivo INI/Fiocruz, 2013).

1.2.4) Sintomatologia do envolvimento laríngeo

Ao longo dos anos, alterações nos sintomas apresentados por pacientes portadores de TBL têm sido observadas. No passado, estes geralmente apresentavam doença pulmonar avançada com tosse produtiva e sintomas sistêmicos marcantes, como perda de peso, sudorese noturna e febre. Disfonia era o sintoma laríngeo mais comum, mas era frequentemente acompanhada por odinofagia e disfagia (35).

Apesar de sintomas sistêmicos serem menos observados (4, 6, 35, 43), alguns autores ainda relatam presença de febre e perda de peso em até 73,6% dos pacientes (28, 38-40, 44, 46, 47). A disfonia ainda é relatada como o sintoma mais comum, presente em 100% dos pacientes em alguns estudos (4, 6, 43) e permanece presente em mais de 80% dos pacientes mesmo após o tratamento medicamentoso da TBL, sendo passível de melhora com o tratamento fonoterápico (48). A frequência de odinofagia variou de 9 a 50% entre os estudos revisados (2, 6, 33) e, a ocorrência de tosse, geralmente atribuída ao tabagismo, variou de 14,6 a 94,7% (4, 37, 39).

A inespecificidade dos sintomas iniciais da TBL pode gerar dificuldade e retardo no diagnóstico desta doença. O intervalo de tempo decorrido entre o surgimento do primeiro sintoma e o diagnóstico é irregular, podendo variar de 2 semanas a 24 meses (4, 36, 44). Este retardo no diagnóstico pode estar relacionado à dificuldade de acesso dos pacientes ao sistema de saúde, a deficiências de infraestrutura e de recursos humanos, além da inerente dificuldade de diagnóstico desta doença. Além disso, a elevada duração dos sintomas pode também sugerir diagnóstico inicial equivocado (4).

1.2.5) Diagnóstico da tuberculose

A pesquisa bacteriológica é importante para o diagnóstico da TB pulmonar e extrapulmonar (26). O método mais comum para diagnóstico de TB no mundo é o exame direto do escarro para pesquisa de bacilo álcool-ácido-resistente (BAAR) (3). Este é um método de baixo custo e requer padrões mínimos de biossegurança, sendo muito utilizado nos países em desenvolvimento, entre eles o Brasil, não apenas para o diagnóstico, mas também para o controle do tratamento TB (3, 25). Em 2013, dos 60.948 casos novos de TB pulmonar registrados no país, 85,4% realizaram baciloscopia no momento do diagnóstico e, destes, 39.757 (65,2%) tiveram o resultado positivo. Apesar de ser um exame relativamente simples e de fácil acesso, a baciloscopia apresenta sensibilidade baixa em torno de 65%, o que pode estar relacionado à baixa qualidade das amostras e às dificuldades no transporte e processamento (25). Além disso, este método não fornece informações acerca da sensibilidade antimicrobiana e não diferencia o complexo *M. tuberculosis* de outras micobacterias (3, 25). Este método está indicado em casos com suspeita clínica de TB extrapulmonar (26), mas não parece ser um método confiável para diagnóstico da TBL (4).

A cultura do escarro é o método “padrão ouro” para o diagnóstico de TB e permite um acréscimo de até 30% no número de casos diagnosticados, quando comparada à baciloscopia. Se associada ao teste de sensibilidade, possibilita a detecção dos casos de resistência a fármacos. No Brasil, nos últimos anos, o processo de descentralização da cultura em meio sólido (Ogawa-Kudoh) vem sendo ampliado, assim como a realização da cultura automatizada (em meio líquido) (49). Apesar do diagnóstico de TB através da cultura ser considerado padrão de referência, a realização deste exame requer laboratórios equipados com funcionários

altamente treinados e um sistema de transporte eficiente para assegurar a viabilidade dos espécimes (3). A cultura é um método de elevada especificidade e sensibilidade para o diagnóstico da TB extrapulmonar, apesar de produzir resultados tardiamente. Permite a posterior identificação da espécie de micobactéria isolada através de métodos bioquímicos, fenotípicos e moleculares, assim como a realização de teste de sensibilidade aos fármacos antituberculose (50, 51). O Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) recomenda a realização de cultura com teste de sensibilidade (para detecção de bacilos resistentes ao esquema de tratamento padrão), principalmente para populações consideradas de maior risco como: pacientes com tratamento prévio, pessoas que vivem com HIV/AIDS, contatos sintomáticos de casos de TB resistente e populações especiais (pessoas privadas de liberdade, indígenas, entre outros) (26).

Atualmente, testes mais rápidos e com maior sensibilidade estão disponíveis para complementar ou substituir os exames convencionais no diagnóstico da TB pulmonar e extrapulmonar (3). O teste rápido molecular (TRM-TB) utiliza técnicas de biologia molecular (reação em cadeia da polimerase em tempo real) para identificar o DNA do *M. tuberculosis* e apresenta sensibilidade de 90% e especificidade de 99%. O resultado é liberado em apenas duas horas, favorecendo o início oportuno do tratamento convencional. Além disso, o TRM-TB também detecta a resistência à rifampicina, um dos principais fármacos usados no tratamento da TB, o que possibilita identificar os casos de resistência ao esquema básico, diminuindo o tempo necessário para o início do tratamento com medicamentos de 2ª linha (25). Este teste não está indicado para o acompanhamento do tratamento de TB, nem para diagnóstico de casos de retratamento (recidivas e reingressos após abandono). Como o TRM-TB detecta o DNA do bacilo, o teste pode ter resultado positivo por um

prazo indefinido, não sendo possível, portanto, comprovar o resultado da terapia antituberculose. Diante disso, ressalta-se a importância da realização das baciloscopias durante o acompanhamento do tratamento (1, 52). A cultura de escarro com teste de sensibilidade antimicrobiana (TSA) deve ser realizada para todos os pacientes com TRM-TB positivo ou para os casos suspeitos de TB em que será realizada a baciloscopia. Além disso, utiliza-se a cultura de escarro para todas as populações mais vulneráveis, independentemente do resultado desses dois testes. O TSA deve ser realizado para comprovar a resistência à rifampicina detectada pelo TRM-TB e a resistência a outros fármacos. Nos locais onde não se realiza o TRM-TB, a cultura de escarro e o TSA permitirão a identificação de todas as resistências (1).

A prova tuberculínica (técnica de Mantoux), realizada através da injeção intradérmica do antígeno proteico purificado (PPD), também faz parte dos métodos de abordagem diagnóstica e está indicada para investigação da infecção latente no adulto e infecção latente e TB doença em crianças (26). Este teste, se não reator, não exclui a presença de TBL (40, 41, 45). A positividade do PPD na TBL é altamente variável (45% a 90,9%) (28, 40, 45).

A hipótese diagnóstica de TBL é raramente considerada pelos otorrinolaringologistas (2, 43). O diagnóstico da TBL necessita de alto grau de suspeição, pois o aspecto endoscópico das lesões é inespecífico e variado, podendo simular outras doenças laríngeas (28, 44, 53).

O exame histopatológico é o método empregado na investigação das formas extrapulmonares ou nas formas pulmonares que se apresentam radiologicamente como doença difusa. A biópsia com confirmação histopatológica é considerada essencial para o diagnóstico de TBL pela grande maioria dos autores (2, 4, 36, 38),

além de excluir a presença de neoplasia (2, 4, 36), visto que a coexistência de TBL e carcinoma de laringe já foi relatada (4, 35, 45, 54). Ao exame histopatológico observam-se reações inflamatórias, com granulomas constituídos de células gigantes, podendo ocorrer necrose caseosa central (2, 55). A baciloscopia dos cortes histológicos pode revelar a presença de BAAR através da coloração de Ziehl Neelsen (2, 4, 6) e de Wade. Nos pacientes não imunossuprimidos, a baciloscopia do tecido usualmente é negativa, e a presença de um granuloma, com necrose de caseificação, é compatível com o diagnóstico de TB. Nos pacientes imunossuprimidos, é menos frequente a presença de granuloma com necrose caseosa, mas é mais frequente a positividade da baciloscopia no material de biópsia (26).

A OMS recomenda a utilização do TRM-TB como teste alternativo a baciloscopia, cultura e exame histopatológico em espécimes de pacientes com hipótese diagnóstica de TB extrapulmonar (56) e, em dezembro de 2014, o Ministério da Saúde publicou Nota Informativa, recomendando a utilização deste teste para amostras de exames extrapulmonares, como líquido e amostras de gânglios e outros tecidos e indica, prioritariamente, a utilização do TRM-TB para o diagnóstico de TB pulmonar e TBL em adultos e crianças (52).

A radiografia de tórax é um método auxiliar na investigação da TBL, pois achados radiológicos sugestivos de TB pulmonar em indivíduos com lesões laríngeas podem sugerir o diagnóstico de TBL (4, 33).

1.2.6) Diagnóstico diferencial

A TBL tem como diagnóstico diferencial as neoplasias, as granulomatoses não infecciosas e as outras granulomatoses infecciosas deste órgão (55, 57, 58). A instalação dos sintomas é insidiosa, o que atrasa o diagnóstico (55). Na TBL, os exames de imagem e a laringoscopia simulam o diagnóstico de carcinoma, que somente pode ser confirmado por biópsia e seu estudo histopatológico (59). Apesar de não haver uma estatística oficial na literatura, em Centros de excelência no tratamento de neoplasia laríngeas, são descritos casos de coexistência de carcinoma e TBL (35, 45). Entre as granulomatoses infecciosas, os principais diagnósticos diferenciais da TBL se fazem com a paracoccidiodomicose e leishmaniose tegumentar americana (55). Nos pacientes em uso prolongado de drogas imunossupressoras ou outras condições que interfiram na capacidade de resposta imune, deve-se alentar também o diagnóstico de outras infecções micóticas da laringe como criptococose e histoplasmose (60). As semelhanças de aspecto endoscópico e a falta de padrões clínicos definidos tornam os estudos laboratoriais fundamentais para o diagnóstico diferencial das granulomatoses infecciosas da laringe.

1.2.7) Tratamento

O sistema de tratamento para TB preconizado pelo MS era composto pelo Esquema I (2RHZ/4RH) para os casos novos; Esquema I reforçado (2RHZE/4RHE) para retratamentos; Esquema II (2RHZ/7RH) para a forma meningoencefálica; e Esquema III (3SZEet/9EEt) para falência. Em 2009, devido a um aumento de resistência primária à isoniazida (de 4,4% para 6%), houve a introdução do

etambutol como quarto fármaco na fase intensiva de tratamento (dois primeiros meses) do Esquema básico e extinção do Esquema I reforçado e do Esquema III. A apresentação farmacológica do Esquema básico passa a ser comprimidos de doses fixas combinadas dos quatro medicamentos (RHZE), nas seguintes dosagens: R 150mg, H 75mg, Z 400mg e E 275mg (Quadro 1) (26).

Regime	Fármacos	Faixa de peso	Unidade/dose	Meses
2 RHZE Fase Intensiva	RHZE 150/75/400/275 comprimido em dose fixa combinada	20kg a 35kg	2 comprimidos	2
		36kg a 50kg	3 comprimidos	
		> 50kg	4 comprimidos	
4 RH Fase de manutenção	RH Comprimido ou cápsula 300/200 ou 150/100	20 a 35kg	1 comprimido ou cápsula 300/200mg	4
		36kg a 50kg	1 comprimido ou cápsula 300/200mg + 1 comprimido ou cápsulas 150/100mg	
		> 50kg	2 comprimidos ou cápsulas 300/200mg	

Quadro 1: esquema básico para tratamento da tuberculose em adultos e adolescentes (MS, 2011) (26)

O Esquema básico está indicado em (Quadro 2):

- Casos novos adultos e adolescentes (> 10 anos), de todas as formas de TB pulmonar e extrapulmonar (exceto a forma meningoencefalica), infectados ou não por HIV;
- Retratamento: recidiva (independentemente do tempo decorrido do primeiro episódio) ou retorno após abandono com doença ativa em adultos e adolescentes (> 10 anos), exceto a forma

meningoencefálica, até os resultados da cultura, da identificação bacteriana e do teste de sensibilidade.

Situação	Esquema Indicado	Local de realização
Caso novo	Esquema Básico	Atenção Básica
Com tratamento anterior: Recidiva após cura – RC Retorno após abandono – RA	Esquema Básico até o resultado da cultura e TS	Atenção Básica ↓ Referência terciária (dependendo do resultado do TS)
Tratamentos especiais: hepatopatias, efeitos colaterais maiores, HIV/aids e uso de imunossupressores.	Esquemas Especiais	Referência Secundária
Tuberculose meningoencefálica	Esquema para Meningoencefalite	Hospitais inicialmente
Falência por multirresistência, mono e polirresistência ao tratamento antiTB.	Esquema Especiais para mono/poli e multirresistência	Referência Terciária

Quadro 2: Esquemas de tratamento de tuberculose de acordo com o quadro clínico do paciente e unidades de atendimento (MS,2011) (26).

O tratamento das formas extrapulmonares (exceto a meningoencefálica) tem a duração de seis meses, assim como o dos pacientes coinfectados com HIV, independentemente da fase de evolução da infecção viral. Em casos individualizados, cujas evoluções clínicas iniciais não sejam satisfatórias, o tratamento pode ser prolongado na sua segunda fase (26). O regime terapêutico para os casos de TB multidrogarresistente, caracterizados pela resistência à isoniazida e rifampicina, é mais longo e requer uso de esquemas especiais (27).

Embora o MS preconize o uso do Esquema básico por 6 meses para tratamento dos casos de TBL (26), o tempo de tratamento é variável na literatura, sendo frequentemente superior a 6 meses, podendo estender-se a 1 ano (2, 4, 36-38, 61). A administração dos fármacos também é variável nos estudos revisados,

seguindo as seguintes dosagens: R 600mg/dia, H 400mg/dia, E 1200mg/dia e Z 1500mg/dia (2, 40).

A associação medicamentosa adequada, as doses corretas e o uso por tempo suficiente são os princípios básicos para o tratamento, evitando a persistência bacteriana e o desenvolvimento de resistência aos fármacos e, assim, assegurando a cura do paciente. A esses princípios soma-se o TDO como estratégia fundamental para o sucesso do tratamento (26). O TDO, reconhecido mundialmente e recomendado pelo PNCT, é uma estratégia para a adesão ao tratamento que consiste na observação diária da ingestão dos medicamentos por um profissional de saúde, e, excepcionalmente, por uma pessoa que tenha vínculo com o usuário. Nesses casos, o profissional de saúde deve acompanhar semanalmente o suporte ao tratamento (25).

Novos medicamentos estão sendo avaliados para possíveis incorporações no tratamento da TB, como a rifapentina e a bedaquilina. A rifapentina pertence à família das rifamicinas. Deve ser utilizada em associação com a isoniazida para o tratamento da infecção latente da TB, reduzindo o tempo de tratamento de seis para quatro meses, com uso diário da medicação, perfazendo 12 doses semanais. A redução do tempo de tratamento pode contribuir para o aumento da adesão e, conseqüentemente, auxiliar na prevenção de casos de TB. A bedaquilina, por sua vez, é o primeiro novo fármaco, em mais de 40 anos, produzido especificamente para TB, tendo sido aprovado pelo Food and Drug Administration em 2012 e pela OMS em 2013. Representa um importante medicamento para incorporação no tratamento da TB com resistência extensiva, em que as possibilidades terapêuticas ainda são limitadas (1).

O sucesso no manejo de pacientes com TBL baseia-se no diagnóstico precoce e o início rápido do tratamento quimioterápico adequado (2). Devido ao alto grau de destruição tecidual que pode ocorrer na TBL, uma intervenção precoce e adequada é essencial pra minimizar a possibilidade de sequelas, como a estenose laríngea (55).

2) JUSTIFICATIVA

A TBL é uma importante causa de infecção laríngea, fazendo parte dos diagnósticos diferenciais das lesões crônicas deste órgão. A importância do presente estudo deve-se às seguintes razões: (i) Necessidade de melhor caracterização do diagnóstico clínico da TBL, uma vez que os achados clínicos e endoscópicos das lesões são variáveis, não havendo uma característica única específica que forneça o diagnóstico definitivo da infecção por *M. tuberculosis* (55). (ii) Necessidade de demonstrar a importância das análises laboratoriais a partir de espécimes obtidos por biópsias da laringe visando a realização de estudos microbiológicos e histológicos para complementação diagnóstica a partir do espécime tecidual, já que testes cutâneos e análises do escarro nem sempre fornecem diagnóstico da infecção (51). Este dado poderia auxiliar o diagnóstico diferencial da TBL com outras doenças crônicas deste órgão tais como neoplasias, outras doenças granulomatosas infecciosas e não infecciosas.

Apesar desta necessidade, as biópsias de laringe ainda são pouco realizadas devido a dificuldades de acesso do paciente a estruturas médico-hospitalares capazes de realizar o procedimento. Além disso, as dificuldades anatômicas de acesso tornam as biópsias de laringe menos realizadas do que as de outros sítios afetados na região da cabeça e pescoço. Estes detalhes fazem com que o conhecimento gerado sobre as lesões da TBL seja ainda fragmentado e escasso. Por outro lado, a realização sistemática desse procedimento poderia trazer subsídios para o esclarecimento da fisiopatogenia e diagnóstico da TBL, além de trazer à luz alguns fatores associados à evolução das lesões de TBL.

3) OBJETIVOS

3.1) OBJETIVO GERAL

Descrever e analisar as características clínicas e laboratoriais da TBL.

3.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Identificar fatores associados às características clínicas, à localização e à extensão das lesões da TBL.
- 2) Descrever as alterações vocais em pacientes com TBL.
- 3) Descrever um caso raro de criptococcose laríngea como diagnóstico diferencial de TBL.

4) MÉTODOS E RESULTADOS

Os resultados desta tese são apresentados no formato de artigos científicos publicados ou em fase de publicação. Nesta seção estão anexados quatro artigos da seguinte forma:

Artigo nº 1: identifica fatores associados às características clínicas, à localização e à extensão das lesões da TBL a partir de um estudo transversal retrospectivo dos prontuários de 36 pacientes.

Artigo nº 2: descreve as características anatômicas e a qualidade vocal em 24 pacientes com TBL ativa.

Artigo nº 3: descreve um caso de criptococose de laringe como diagnóstico diferencial de TBL.

4.1) ARTIGO 1

Factors Associated to Clinical and Topographical Features of Laryngeal Tuberculosis - Artigo submetido para publicação na revista PLOS One em 27 de outubro de 2015.

PLOS ONE
Factors Associated to Clinical and Topographical Features of Laryngeal Tuberculosis
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PONE-D-15-47020
Article Type:	Research Article
Full Title:	Factors Associated to Clinical and Topographical Features of Laryngeal Tuberculosis
Short Title:	Factors Associated to Laryngeal Tuberculosis
Corresponding Author:	Cláudia Maria Valete-Rosalino, PhD INI - FIOCRUZ RIO DE JANEIRO, BRAZIL
Keywords:	larynx; tuberculosis; diagnosis; smoking; dysphonia; true vocal folds
Abstract:	<p>Introduction: Laryngeal tuberculosis (LTB) is the most frequent granulomatous disease of the larynx and represents less than 2% of extrapulmonary TB cases. There are no pathognomonic clinical and endoscopic features of this disease and studies on LTB that can assist in its diagnostic characterization are lacking.</p> <p>Objective: To identify factors associated to clinical and topographical features of LTB.</p> <p>Method: a retrospective cross-sectional study was conducted from the medical records of 36 patients with confirmed LTB diagnosis.</p> <p>Results: Dysphonia and cough were the main symptoms presented by patients and the true vocal folds the most frequently affected site. The average of the duration of the disease evolution was significantly higher in patients with dysphonia than in patients without this symptom. We observed association between dysphonia and true vocal fold lesions and between odynophagia and lesions in the epiglottis, arytenoids and aryepiglottic folds. Odynophagia was more frequent in individuals with lesions in four or more laryngeal sites. Weight loss equal or above 10% of the body weight was more frequent in patients with odynophagia as first symptom and in patients with ulcerated lesion. Dyspnea on exertion was more frequent in individuals with more extensive laryngeal lesions. The percentage of smokers with lesions in four or more laryngeal sites was greater than that found in non-smokers. Laryngeal tissue fragment bacilloscopy and culture examinations were less positive than sputum ones.</p> <p>Conclusions: Smoking is associated with the development of more extensive LTB lesions. The extent of the laryngeal lesions is also associated to dyspnea on exertion and to odynophagia with consequent impairment of the nutritional status. We emphasize the need for histopathologic confirmation, once positive sputum bacteriological examinations seems not to necessarily reflect laryngeal involvement.</p>
Order of Authors:	João Gustavo Corrêa Reis Clarissa Souza Mota Reis Daniel César Silva da Costa Márcia Mendonça Lucena Armando de Oliveira Schubach Raquel de Vasconcellos Carvalhães Oliveira Valéria Cavalcanti Rolla Fátima Conceição-Silva Cláudia Maria Valete-Rosalino, PhD

Este artigo corresponde ao objetivo número um desta tese. Neste artigo descrevemos aspectos clínicos e laboratoriais da TBL e identificamos fatores associados às características clínicas, à localização e à extensão das lesões desta doença. Observamos que o tabagismo está associado com o desenvolvimento de lesões mais extensas de TBL e que a extensão das lesões laríngeas também está associada à dispneia aos esforços e à odinofagia, com consequente prejuízo do estado nutricional. Além disso, constatamos a necessidade de confirmação histopatológica para o diagnóstico da TBL, já que a positividade dos exames bacteriológicos em escarro parece não refletir necessariamente o comprometimento laríngeo.

Factors Associated to Clinical and Topographical Features of Laryngeal Tuberculosis

Short Title: Factors Associated to Laryngeal Tuberculosis

João Gustavo Corrêa Reis^{1,2,3}; Clarissa Souza Mota Reis¹; Daniel César Silva da Costa^{1,2}; Márcia Mendonça Lucena^{1,4}; Armando de Oliveira Schubach¹; Raquel de Vasconcellos Carvalhaes de Oliveira¹; Valéria Cavalcanti Rolla¹; Fátima Conceição-Silva^{2,*}; Cláudia Maria Valete-Rosalino^{1,4,*}.

- 1- Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases (INI), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
- 2- Laboratory of Immunoparasitology, Oswaldo Cruz Institute (IOC), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
- 3- Department of Bronchoesophagolaryngology and Head and Neck Surgery, Bonsucesso Federal Hospital, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
- 4- Department of Otorhinolaryngology and Ophthalmology, Faculty of Medicine, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

*Correspondence to :

claudia.valete@ini.fiocruz.br (CMVR); fconcei@ioc.fiocruz.br (FCS)

Abstract

Introduction: Laryngeal tuberculosis (LTB) is the most frequent granulomatous disease of the larynx and represents less than 2% of extrapulmonary TB cases. There are no pathognomonic clinical and endoscopic features of this disease and studies on LTB that can assist in its diagnostic characterization are scarce.

Objective: To identify factors associated to clinical and topographical features of LTB.

Method: A retrospective cross-sectional study was conducted from the medical records of 36 patients with confirmed LTB diagnosis.

Results: Dysphonia and cough were the main symptoms presented by patients and the true vocal folds the most frequently affected site. The average of the duration of the disease evolution was significantly higher in patients with dysphonia than in patients without this symptom. We observed association between dysphonia and true vocal fold lesions and between odynophagia and lesions in the epiglottis, arytenoids and aryepiglottic folds. Odynophagia was more frequent in individuals with lesions in four or more laryngeal sites. Weight loss equal or above 10% of the body weight was more frequent in patients with odynophagia as first symptom and in patients with ulcerated lesion. Dyspnea on exertion was more frequent in individuals with more extensive laryngeal lesions. The percentage of smokers with lesions in four or more laryngeal sites was greater than that found in non-smokers. Laryngeal tissue fragment bacilloscopy and culture examinations were less positive than sputum ones.

Conclusions: Smoking is associated with the development of more extensive LTB lesions. The extent of the laryngeal lesions is also associated to dyspnea on exertion and to odynophagia with consequent impairment of the nutritional status. We emphasize the need for histopathologic confirmation, once positive sputum bacteriological examinations seems not to necessarily reflect laryngeal involvement.

Key words: larynx; tuberculosis; diagnosis; smoking; dysphonia; true vocal folds.

Introduction

Tuberculosis (TB) is a contagious infectious disease of chronic evolution caused by *Mycobacterium tuberculosis*. Despite progress in relation to the goals of disease control, TB is still a global public health problem [1,2]. Nine million new cases of this disease were registered in the world in 2013 by the World Health Organization (WHO) and of these, 83,310 cases were reported in Brazil, which is one of the 22 countries prioritized by WHO, because they concentrate 80% of TB global burden. Additionally, following the emergence of the Human Immunodeficiency Virus (HIV), it has become the second leading cause of death by a single infectious agent. In 2013, of 1.5 million people who died of TB, 360,000 were HIV-positive [2].

TB affects mainly the lungs but can occur in any organ. Laryngeal tuberculosis (LTB) represents less than 2% of extrapulmonary TB cases [3,4] and is the most frequent granulomatous disease of this organ [5-7]. Literature data indicates that LTB incidence rate among patients diagnosed with pulmonary TB varies between 0.08 and 5.1% [8-10]. However, the exact incidence of LTB in patients with pulmonary TB is difficult to be determined because systematic otorhinolaryngologic evaluation of these patients is not usually conducted and it is likely that this disease is more frequent than diagnosed [8,11,12]. The hypothesis of LTB diagnosis is rarely considered by otorhinolaryngologists, which may delay its diagnosis and consequently increase the incidence of complications [10,13].

TB can affect any laryngeal anatomic site, with variable clinical and endoscopic features [12,14]. Skin tests and sputum analyses are considered auxiliary methods in LTB diagnosis [15,17]. On the other hand, histopathologic and microbiological analyses of laryngeal lesion fragments obtained by biopsy are essential for the diagnosis [7,12,17] and differentiation from other chronic diseases such as neoplasia [3,8,17], other granulomatous infectious diseases such as leishmaniasis and paracoccidioidomycosis [14], and non-infectious granulomatous diseases such as Wegener's granulomatosis and amyloidosis [5,18].

To date, there is lack of studies on LTB that can assist in the diagnostic characterization of the disease. The objective of this study is to identify factors associated to clinical and topographical features of LTB.

Material and methods

A retrospective cross-sectional study was conducted from the medical reports of LTB patients diagnosed by the presence of videolaryngoscopic signs of chronic laryngitis associated with mycobacterium identification by at least one of the following methods: sputum bacilloscopy or culture and/or analysis of tissue fragments obtained by laryngeal biopsy through direct examination, culture or histopathologic examination with Wade staining technique.

All patients were treated at the outpatient clinics for tuberculosis and otorhinolaryngology of the Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases (INI) – Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) from 2004 to 2014 and monitored by a previously defined protocol. As exclusion criterion we used presence of immunosuppression or lack of information in the medical records. This study was approved by the Ethics in Research Committee of INI- FIOCRUZ under the number 12243513.2.0000.5262 and a consent form was signed by all the patients.

The sociodemographic profile of the patients was evaluated using the following variables: age, gender, economic status, education level, comorbidities, smoking and drinking habits. Patients who had the habit of smoking daily regardless of the amount were considered smokers and those who consumed any alcoholic beverage and gave a positive response to at least two questions in the CAGE questionnaire were considered drinkers [19].

Clinical variables included signals, symptoms and endoscopic features of lesions identified by videolaryngoscopy using a 70 degree rigid videolaryngoscope (Karl Storz, Germany), video camera (Toshiba, Japan), video recorder (LG, USA) and video monitor (Sony, USA).

All LTB patients who presented signals of active infectious focus in the lungs through clinical examination and chest X-ray were considered as having pulmonary TB.

For a better understanding and topographical analysis of LTB involvement we divided the larynx in the following anatomic sites: epiglottis, aryepiglottic fold, arytenoid region, interarytenoid region, false vocal folds, true vocal folds and subglottis. To assess the extent of the lesions we used two variables classified as follows: unilateral or bilateral involvement; number of affected laryngeal sites (up to three affected sites or four or more affected sites). Since there is no standardization of the endoscopic description of LTB lesions in the literature [17], we defined four categories of videolaryngoscopic appearances: nonspecific inflammatory lesion (hyperemic lesion with flat or exophytic appearance with smooth surface) (Fig.1a); granulomatous lesion (hyperemic lesion with exophytic appearance with rough surface) (Fig. 1b); ulcerated lesion (Fig. 1c) and erosive lesion (Fig. 1d).

Fig 1- Pictures of images obtained by Videolaryngoscopy:

- a- Hyperemic and flat lesion with smooth surface of right true vocal fold - example of nonspecific inflammatory lesion.
- b- Hyperemic lesion, with exophytic appearance and rough surface located in the false vocal folds – example of granulomatous lesion.
- c- Example of ulcerated lesion with fibrin located in aryepiglottic fold and right arytenoid region.
- d- Example of erosive lesion of the right half of the epiglottis.

Source: Files of the Department of Otorhinolaryngology of the Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases (INI)-FIOCRUZ.

Complementary tests included: chest X-ray, skin test “Purified Protein Derivative” (PPD), considering the result as positive when induration was equal or above 5mm; analysis of sputum and tissue fragments (obtained by laryngeal biopsies) for acid-alcohol resistant bacillus (BAAR) detection through the Ziehl-Neelsen technique with assessment of bacterial load (0, +, ++, +++) [20] and culture in Lowenstein-Jensen/Ogawa-Kudoh medium and by the

Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) system, determining bacterial growth load (0,+, ++, +++) [20]; and histopathologic examination of the same tissue specimens through 5 μ m sections stained with hematoxylin-eosin and Wade stain, examined under an optical microscope (Zeiss, Jena, Germany). Direct examination and culture bacterial loads, from both, sputum and laryngeal specimens were categorized into two groups; one with load up to two plus signs and the other with loads of three plus signs.

The Statistical Package for Social Science for Windows (SPSS) program version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for data analysis. The simple frequencies of the categorical variables were described as well as the summary measures (mean \pm standard deviation (SD), median, interquartile range (IQR, minimum and maximum) of the continuous variables. The association between categorical variables was verified by Fisher's exact test. The Shapiro-Wilk normality test indicated escape from normality of the variable time of laryngeal symptoms up to LTB diagnosis. As consequence the Mann-Whitney test was used to compare the median of duration of laryngeal symptoms. On the other hand, as normality was accepted for the variable age, the T test was used to compare mean age by gender. In both cases P-values < 0.05 indicated significant differences.

Results

Of 41 individuals initially identified with LTB, three (7.3%) patients were excluded because of co-infection with HIV or concomitant immunosuppressive therapy and two (4.9%) because of lack of information in the medical records. Thirty six patients with LTB were included. The age of the individuals at diagnosis ranged from 22 to 82 years, with mean of 47.08 \pm 14.75 years. Twenty-eight (77.8%) patients were male (gender ratio 3.5:1) and there was no age difference between men and women ($p=0.460$). Other clinical and bacteriological features of the patients are described in Table 1.

Table 1 – Epidemiological and clinical characteristics of 36 patients with laryngeal tuberculosis diagnosed at the Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases - FIOCRUZ, from 2004 to 2014.

Variable	n	%
Gender	male	28 77.8
	female	8 22.2
Monthly income	up to US\$ 590	30 83.3
	more than US\$ 590	6 16.7
Education level	primary school completed	24 66.7
	high school or more	12 33.3
Past medical history	<i>diabetes mellitus</i>	4 11.1
	previous pulmonary tuberculosis	6 16.7
	contact with pulmonary tuberculosis	9 25
Habits	smoking	16 44.4
	alcohol drinking	13 36.1
	concomitant smoking and alcohol use	8 22.2
Symptoms	dysphonia	32 88.9
	cough	32 88.9
	odynophagia	27 75
	dyspnea on exertion	19 52.8
	dysphagia	11 30.6
	dyspnea at rest	5 13.9
	reflex otalgia	2 5.6
1 st symptom of clinical manifestation	dysphonia	26 72.2
	odynophagia	13 36.1
	cough	12 33.3
	dyspnea	2 5.6
	dysphagia	1 2.8
Affected laryngeal sites	epiglottis	21 58.3
	aryepiglottic fold	22 61.1
	arytenoid region	18 50
	Interarytenoid region	12 33.3
	false vocal fold	24 66.7
	true vocal fold	32 88.9
Number of affected sites	1 up to 3	14 38.9
	4 or more	22 61.1
Number of affected sides	unilateral	8 22.2
	bilateral	28 77.8
Endoscopic appearance	granulomatous lesion	24 66.7
	nonspecific inflammatory lesion	19 52.8
	ulcerated lesion	14 38.9
	erosive lesion	8 22.2

n – number of patients

The interval between the onset of laryngeal symptoms and diagnosis was between one and 36 months, with median of five and a half months (IQR=3-12). All patients were symptomatic with one to six symptoms (median=4). Weight loss equal or above 10% of body weight was observed in 19 (52.8%) patients.

The simultaneous involvement of more than one larynx anatomic structure was identified in 31 (86.1%) patients and the extent of the lesion to the pharynx in seven (19.4%). In the five (13.9%) cases restricted to a single laryngeal site, the inflammatory process was located in the vocal folds. Erosive lesions, when present, were identified only in the epiglottis. Regarding vocal fold motility, two (5.6%) patients had unilateral paresis, two (5.6%) unilateral paralysis and one (2.8%) bilateral paralysis and laryngeal stenosis. The later underwent tracheostomy.

Results of complementary examinations are shown in Table 2. Bacilloscopy and culture of sputum and laryngeal specimen of the only patient with LTB without concomitant pulmonary involvement were negative. In this case, disease diagnosis was just confirmed by the histopathologic examination through the identification of chronic, granulomatous inflammatory process with identification of rare BAAR by Wade stain. In 35 patients (97.2%) with radiological abnormalities compatible with pulmonary TB, there were changes on auscultation that corroborated this diagnosis. Involvement of four or more laryngeal sites was observed in 50% patients with positive PPD and in all patients with negative PPD. There was no association between the duration of LTB evolution, location, endoscopic appearance, laryngeal lesion extent degree and PPD results ($p>0.05$). No associations were found between bacterial loads (in BAAR and culture) of sputum or laryngeal tissue specimens with smoking habits, alcohol consumption, symptoms related to TB, extension of laryngeal involvement, endoscopic appearance of the lesion and PPD ($p>0.05$).

Table 2 – Results of complementary examination of 36 patients with laryngeal tuberculosis treated at the Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases- FIOCRUZ, from 2004 to 2014.

Complementary examination	Results	n	%
Chest X-ray suggesting pulmonary tuberculosis (N=36)	yes	35	97.2
	no	1	2.8
Skin test with Purified Protein Derivative (PPD) (N=28)	positive	24	85,7
	negative	4	14,3
Determination of BAAR in sputum by Ziehl-Neelsen technique (N=36)	positive	29	80.6
	negative	7	19.4
BAAR load in sputum (N=29)	+	13	36.1
	++	9	25.0
	+++	7	19.4
Sputum culture (N=35)	positive	33	94.3
	negative	2	5.7
Load of bacterial growth in sputum culture (N=31)	+	9	25.0
	++	9	25.0
	+++	15	41.7
Determination of BAAR in laryngeal biopsy tissues (Ziehl-Neelsen technique) (N=14)	positive	2	14.3
	negative	12	85.7
Culture of laryngeal biopsy tissues (N=12)	positive	6	50.0
	negative	6	50.0
Histopathologic examination - inflammatory process (N=19)	granulomatous	17	89.5
	nonspecific	2	10.5
Determination of BAAR in laryngeal biopsy tissues (Wade stain) (N=16)	positive	8	50.0
	negative	8	50.0

n – number of patients

N – valid numbers

BAAR – Acid-alcohol resistant bacillus

No associations were found between presence of dysphagia and cough with endoscopic appearance and lesion location ($p>0.05$). All patients with lesions in four or more sites had coughing. In addition, 27 (84.4%) patients with cough and only one (25%) of the patients without cough presented bilateral involvement ($p=0.028$).

The median time for disease evolution at LTB diagnosis of patients with dysphonia (6 months) was significantly higher than that of patients without this symptom (2.5 months) ($p=0.038$). On the other hand, no significant difference was observed of the median time of disease progression in relation to presence or absence of other symptoms ($p>0.05$). In

addition, this median time was not significantly different between the groups of individuals with uni or bilateral lesions, in relation to the presence or absence of each endoscopic appearance and between the patients grouped by the number of involved sites ($p>0.05$).

The epiglottis was the only laryngeal site associated with the endoscopic appearance of the lesion. The frequency of the ulcerated lesion in patients with lesion in the epiglottis (57.1%) was higher to that found in patients without lesions in this anatomic site (13.3%) ($p=0.008$). Additionally, the endoscopic appearance of the lesions were not associated to laryngeal symptoms ($p>0.05$).

The distribution of dysphonia and odynophagia symptoms according to the anatomic sites (laryngeal topographical features) are described in Tables 3 and 4 respectively.

Table 3: Topographical features of the lesions of 36 patients with laryngeal tuberculosis according to the presence/absence of dysphonia. Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases - FIOCRUZ, 2004 a 2014.

	Presence of dysphonia				p-value ^a
	Yes (N=32)		No (N=4)		
Laryngeal topographical features	n	%	n	%	
Lesions in the epiglottis	17	53.1	4	100	*
Lesions in the aryepiglottic fold	19	59.4	3	75.0	1.000
Lesions in the arytenoid region	16	50.0	2	50.0	1.000
Lesions in the interarytenoid region	9	28.1	3	75.0	0.098
Lesions in the false vocal fold	24	75.0	0	0.0	**
Lesions in the true vocal fold	31	96.9	1	25.0	0.002
Lesions in the subglottic region	4	12.5	0	0.0	**
Lesions in four or more sites	20	62.5	2	50.0	0.634
Bilateral lesions	25	78.1	3	75.0	1

N - total number, n - valid number, **bold - significant p value**

^a - p-value calculated by the Fisher's Exact Test

* - association analysis was not possible due to the presence of lesion in the epiglottis in all patients without dysphonia

** - association analysis was not possible due to absence of lesion in the false vocal fold and subglottic region in patients without dysphonia

Table 4: Topographical features of the lesions of 36 patients with laryngeal tuberculosis according to the presence/absence of odynophagia. Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases - FIOCRUZ, 2004 a 2014.

	Presence of odynophagia				p-value ^a
	Yes (N=27)		No (N=9)		
Laryngeal topographical features	n	%	n	%	
Lesions in the epiglottis	19	70.4	2	22.2	0.019
Lesions in the aryepiglottic fold	21	77.8	1	11.1	0.001
Lesions in the arytenoid region	17	63.0	1	11.1	0.018
Lesions in the interarytenoid region	11	40.7	1	11.1	0.219
Lesions in the false vocal fold	20	74.1	4	44.4	0.126
Lesions in the true vocal fold	23	85.2	9	100	*
Lesions in the subglottic region	3	11.1	1	11.1	1.000
Lesion extended to the pharynx	7	25.9	0	0.0	**
Lesions in four or more sites	21	77.8	1	11.1	0.001
Bilateral lesions	24	88.9	4	44.4	0.013

N - total number, n - valid number, **bold - significant p value**

^a - p-value calculated by the Fisher`s Exact Test

* - association analysis was not possible due to the presence of lesions in vocal folds in all patients without odynophagia

** - association analysis was not possible due to the presence of odynophagia in all patients with lesion extended to the pharynx

Weight loss equal or above 10% of body weight was observed in 76.9% patients with odynophagia as first symptom and in only 39.1% patients without this initial symptom (p=0.029). The frequency of ulcerated lesions in patients with weight loss equal or above 10% (57.9%) was higher to that found in patients without this sign (17.6%) (p=0.013). Weight loss equal or above 10% of body weight was not associated with other symptoms, smoking habits, alcohol consumption, extent of the disease, location and other endoscopic appearance of the lesions (p>0.05).

The analyses of association between the variables dyspnea on exertion and the topographical features are displayed in Table 5. There was no significant difference in the occurrence of dyspnea at rest between the groups of individuals with uni- or bilateral lesions, with vocal fold paresis or paralysis and between patients grouped by the number of affected

sites ($p>0.05$). No association was observed between presence of dyspnea at rest and presence of dyspnea on exertion with smoking habits ($p>0.05$).

Table 5: Comparison of the presence or not of dyspnea on exertion with topographical features of the lesions of 36 patients with laryngeal tuberculosis. Evandro Chagas National Institute of infectious diseases - FIOCRUZ, 2004 a 2014.

	Presence of dyspnea on exertion				
	Yes (N=19)		No (N=17)		p-value
	n	%	n	%	
Laryngeal topographical features					
Lesions in the epiglottis	13	68.4	8	47.1	0.194 ^b
Lesions in the aryepiglottic fold	15	78.9	7	41.2	0.020 ^b
Lesions in the arytenoid region	12	63.2	6	35.3	0.095 ^b
Lesions in the interarytenoid region	8	42.1	4	23.5	0.238 ^b
Lesions in the false vocal fold	16.7	84.2	8	47.1	0.018 ^b
Lesions in the true vocal fold	18	94.7	14	82.4	0.326 ^a
Lesions in the subglottic region	3	15.8	1	5.9	0.605 ^a
Lesions in four or more sites	15	78.9	10	58.8	0.020 ^b
Bilateral lesions	18	94.7	10	58.8	0.016 ^a

N - total number, n - valid number, **bold - significant p value**

^a - p-value calculated by the Fisher's Exact Test

^b - p-value calculated by the Pearson's Chi-Square Test

The association between smoking habits and coughing could not be evaluated because all smokers had this symptom. All smokers presented bilateral lesions. In addition, lesions in four or more sites were more frequent among smokers (81.2%) than among non-smokers (45%) ($p=0.041$). Tobacco use was not associated with the endoscopic appearance of the lesions ($p>0.05$). Also, we did not find association between location, extent and endoscopic appearance of laryngeal lesions with alcoholism or concomitant use of tobacco and alcohol.

Discussion

In this study, when assessing one of the largest series of cases described of LTB, we observed that dysphonia and odynophagia are associated with the location of LTB lesions,

that odynophagia as first symptom and ulcerated lesion are associated with weight loss and, that smoking, dyspnea on exertion, cough and odynophagia are associated with a greater extension of the laryngeal lesions.

The predominance of men in the fifth or sixth decade of life, with no significant age difference between genders, observed in our study, has been frequently reported [17,21-23], although a lower age of female patients has been described [17]. Most of the patients had low socioeconomic conditions, such as low income and low education level which were factors described as facilitators for the development of the disease [15,24,25].

As noted in our study, LTB patients may present history of previous pulmonary TB treatment [10,17,26] and, although a long evolution of the disease, with periods of up to two years, has already been described [7,17,27], the observation that this time is higher in patients with dysphonia is unprecedented. Probably this symptom is undervalued by sick people who take longer to seek for medical attention. On the other hand, we observed that symptoms such as odynophagia occur with greater discomfort, decreased food intake and consequent weight loss which can reduce the time for seeking for medical help [28,29]. In the same manner, the lack of specific symptoms [3] and the insidious nature of LTB, together with the difficult access of patients to medical attention and specialized exams [14], may delay diagnosis. However, similarly to Wang *et al* (2007), we found no evidence that the delay in the diagnosis predisposes the patient to larger laryngeal lesions [17]. It is possible that the extent of the laryngeal lesion is not necessarily part of the natural history of the disease, but a more serious outcome in some patients [28].

Dysphonia as the main symptom and true vocal folds as the main affected site are usually observed [13,17,21], but the association of these variables in LTB was described by the first time in this study. The true vocal folds are directly related to voice quality, once they are the oscillatory component of voice production [30].

The higher frequency of cough found in our study may be related to a greater concomitance of LTB with pulmonary TB, different from others, where the frequency of this symptom was smaller, probably because they had a higher percent of isolated LTB

[21,23,27,31]. The association between cough and bilateral lesions shows that this symptom is related to a more extensive larynx involvement, probably triggering afferent stimuli in a greater number of cough receptors of this organ. In accordance with this hypothesis, we observed that all patients with lesions in four or more laryngeal sites had cough. In addition, all the smokers that participated in our study had cough. Assign the presence of cough to smoking habit frequently observed in patients with LTB [26,27,32], can cause that this symptom is not considered important and that it persists for several months without seeking for diagnostic investigation [11].

We also observed a higher frequency of odynophagia than usually reported [13,17,21], besides it being associated with the involvement of the epiglottis, aryepiglottic folds and arytenoid regions. These laryngeal sites have greater contact with the food bolus and their movement during swallowing leads to a painful condition. It is assumed that the intensity of odynophagia is related to the degree of laryngeal lesions, mainly of the epiglottis [33]. In addition, we observed association of this symptom with higher number of laryngeal sites, and also its presence in all patients with lesion extended to the pharynx, suggesting that more extensive lesions have greater potential for generation of painful stimuli.

It can be suggested that the associations found between odynophagia, ulcerated lesion, epiglottis lesion and weight loss are part of a sequence of events with causal link, in which ulcerated lesions in the epiglottis cause odynophagia, which in turn, reduces food intake thus causing weight loss. This association between painful lesions in upper aerodigestive tract with weight loss has already been reported in cases of tegumentary leishmaniasis [29].

Dyspnea on exertion was associated with extent of the laryngeal lesions, once this symptom was more frequently found among patients with bilateral involvement or involvement of four or more anatomic sites of this organ, probably due to greater narrowing of larynx lumen, reducing the breathing space. On the other hand, dyspnea at rest seems to relate better with the degree of lung involvement of TB, because we did not detect association between this symptom and the extent of the laryngeal lesion.

Tobacco use has been widely accepted as TB determinant factor, because it alters all the defense mechanisms of the respiratory tree and reduces oxygen concentration in blood, enhancing lesion severity [1,34]. However, the association between smoking habits and LTB lesions in four or more sites had not yet been described. Considering this association and the fact that, in our study all the smokers had bilateral laryngeal involvement, we suggest that smoking be considered a risk factor for the development of more extensive lesions, since, as described in this paper, the extent of LTB lesions is not directly associated with the duration of disease progression.

In our study, the most frequent endoscopic presentation was a lesion of granulomatous appearance. Due to the lack of standardization of the endoscopic findings, it is difficult to compare our results with those in the literature. In the 1980s, a classical description consisted in multiple lesions, frequently ulcerated [22]. Currently, ulcerated lesions are still observed [13,27,35], but some authors suggest that the lesions are hypertrophic or exophytic in most cases, and difficult to distinguish from chronic laryngitis of other etiologies [10,15,35]. Considering that the endoscopic appearance of the lesions is nonspecific and varied, and can mimic other laryngeal diseases, LTB diagnosis requires high degree of suspicion [26,27,33].

According to our results and other reported in the literature, the true vocal folds are usually the most frequently affected anatomic site [17,21,22,27], although some studies do not report preference for any portion of the larynx [11,13]. Our study, like others that identified higher incidences of epiglottis involvement, reports a percentage of concomitant pulmonary TB higher than 80% [21,36]. Based on this observation and the fact that the glosso-epiglottic valleculae, adjacent to the epiglottis, present higher potential for residue accumulation, we suggest the hypothesis that secretions from the lower airways can remain in higher amount and for longer periods of time, restrained there, contributing to the development of infection in this laryngeal structure. Similarly, the highest percentages of concomitant involvement of more than one larynx anatomic structure and bilateral involvement of this organ in the present study, can be related to the prevalence of pulmonary

TB, as previously suggested [10,21]. The classic involvement of the posterior portion of the larynx due to accumulation of infected secretion in bedridden patients, although still observed [7,15,23], is no longer a cardinal sign of LTB as it was in the past [12].

It is believed that LTB originates in the hematogenous spread from a distant primary focus (hematogenous theory) or by direct spread of bacilli in bronchial secretions (bronchogenic theory) [12,17,22]. Our observation of a pulmonary infection focus in 97.2% of LTB patients supports that direct spread from a bronchial focus is the most frequent mechanism, in agreement with most of the reviewed studies [17,21,22]. Thus, chest X-ray is an important complementary examination, since images suggestive of pulmonary TB in individuals with laryngeal lesions raise the suspicion of LTB [12,17].

The skin test with PPD presented variable results in different studies (45% to 90.9%) [13,26,27,31,37], and a negative result does not exclude the presence of LTB [15,31,35]. In addition, although with no association, the fact that all the patients in this study with negative PPD had involvement of four or more laryngeal sites, makes us suppose that the more extensive the infection, the more likely the compromise of the immune response leading to a negative result in the test. In the same way, we observed no association between bacterial load and PPD.

The positivity of sputum direct examination in this study was similar to that observed in the literature [21,32,36], but the higher frequency of positive results in sputum culture in our study [13,17,21] may be related to the fact of having a higher number of patients with associated pulmonary TB, beyond the fact that INI-FIOCRUZ is a reference center for the diagnosis of tuberculosis and other infectious and parasitic diseases, which can contribute to a higher percent of positive sputum due to the expertise of the local laboratory and the professionals that help the patient to collect a suitable specimen. However, despite this higher positivity, we did not find association between bacterial load and greater LTB extent. The positivity of both, bacilloscopy and culture of laryngeal tissue fragment well below that of sputum suggests that the lung focus is the direct responsible for the elimination of mycobacteria through the sputum. The fact that a single patient with no lung involvement

presented negative bacilloscopy by the Ziehl-Neelsen technique and culture in both, sputum and laryngeal tissue fragment, corroborates our hypothesis. Still in this case, although BAAR were identified by Wade stain in the fragments, they were described as rare. On the other hand, the negative results of the bacteriological tests in this LTB case without concomitant lung focus demonstrates the importance of the laryngeal biopsy to obtain tissue specimens, whose histopathologic studies, together with clinical features, can confirm the diagnosis of the disease.

In the histopathologic examination of the specimens obtained by laryngeal biopsy we observed percentages of granulomatous, chronic inflammatory processes similar to those reported in the literature [7,27,36]. In non-immunosuppressed patients tissue bacilloscopy is usually negative and the presence of granuloma with caseous necrosis suggests TB [1].

We also observed some cases of impaired laryngeal mobility. Vocal fold paralysis is an aspect that LTB shares with laryngeal cancer, and its presence raises the suspicion of malignant neoplasm, impairing the differential diagnosis [12,17,23]. In addition, the coexistence of malignant neoplasm of the larynx and pulmonary TB has been described [22,31], enhancing the importance of LTB diagnosis through histologic examination.

We did not find studies in the literature describing the factors associated to clinical and topographical features of LTB as reported in the present study. Our results suggest that smoking is associated with the development of more extensive LTB lesions. In turn, the extent of the laryngeal lesions is also associated to dyspnea on exertion and to odynophagia with consequent impairment of the nutritional status. Thus, smoking seems to be an important factor in the development of more severe manifestations of LTB. On the other hand, in relation to the diagnosis of this disease, it is important to emphasize the need for histopathologic confirmation, because the positivity of sputum bacteriologic examination seems not to necessarily reflect laryngeal involvement.

Acknowledgements

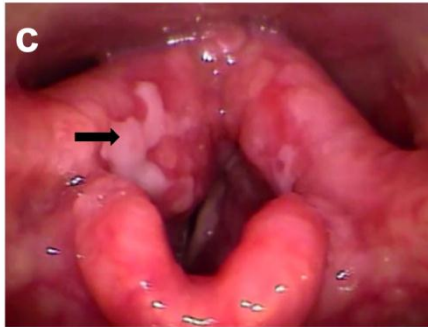
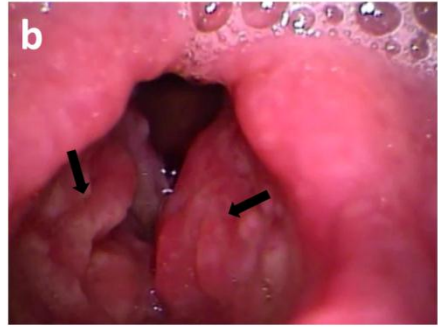
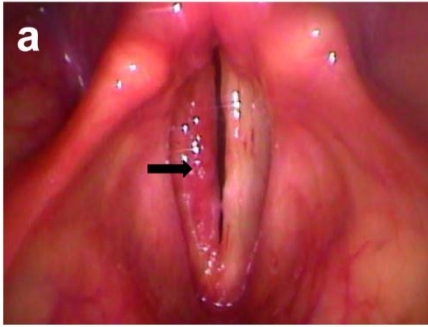
We would like to thank João Soares Moreira, Ana Cristina da Costa Martins, Mariana Reuter Palmeiro, Benivaldo Ferreira Terceiro, Mateus Pereira Bom Braga, Frederico Pereira Bom Braga e Tânia Salgado de Sousa Torraca.

References

1. Brasil. Manual de Recomendações para Controle da Tuberculose no Brasil. Ministério da Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica.; 2011 [updated 2011; cited 11/15/2014]; Available from: bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_controle_tuberculose.pdf.
2. WHO. Tuberculosis. [<http://www.who.int/gho/tb/en/>]: WORLD HEALTH ORGANIZATION; 2015 [updated 2015; cited 2015 15/03/2015]; Available from: <http://www.who.int/gho/tb/en/>
3. Rizzo PB, Da Mosto MC, Clari M, Scotton PG, Vaglia A, Marchiori C. Laryngeal tuberculosis: an often forgotten diagnosis. *Int J Infect Dis.* 2003 Jun;7(2):129-31.
4. Nalini B, Vinayak S. Tuberculosis in ear, nose, and throat practice: its presentation and diagnosis. *Am J Otolaryngol.* 2006 Jan-Feb;27(1):39-45.
5. Loehrl TA, Smith TL. Inflammatory and granulomatous lesions of the larynx and pharynx. *Am J Med.* 2001 Dec 3;111 Suppl 8A:113S-7S.
6. Morales Puebla JM, Padilla Parrado M, Diaz Sastre MA, Chacon Martinez J, Galan Morales JT, Lasso Luis MO, et al. [Laryngeal tuberculosis. Incidence between 1994 and 2004]. *An Otorrinolaringol Ibero Am.* 2006;33(6):591-8.
7. Gandhi S, Kulkarni S, Mishra P, Thekedar P. Tuberculosis of larynx revisited: a report on clinical characteristics in 10 cases. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2012 Sep;64(3):244-7.
8. Topak M, Oysu C, Yelken K, Sahin-Yilmaz A, Kulekci M. Laryngeal involvement in patients with active pulmonary tuberculosis. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2008 Mar;265(3):327-30.
9. Ricciardiello F, Martufi S, Cardone M, Cavaliere M, D'Errico P, Iengo M. Otorhinolaryngology-related tuberculosis. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2006 Feb;26(1):38-42.
10. Shin JE, Nam SY, Yoo SJ, Kim SY. Changing trends in clinical manifestations of laryngeal tuberculosis. *Laryngoscope.* 2000 Nov;110(11):1950-3.
11. Levenson MJ, Ingerman M, Grimes C, Robbett WF. Laryngeal tuberculosis: review of twenty cases. *Laryngoscope.* 1984 Aug;94(8):1094-7.

12. Ramadan HH, Tarazi AE, Baroudy FM. Laryngeal tuberculosis: presentation of 16 cases and review of the literature. *J Otolaryngol.* 1993 Feb;22(1):39-41.
13. Nishiike S, Irifune M, Doi K, Sawada T, Kubo T. Laryngeal tuberculosis: a report of 15 cases. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2002 Oct;111(10):916-8.
14. Silva L, Damrose E, Bairao F, Nina ML, Junior JC, Costa HO. Infectious granulomatous laryngitis: a retrospective study of 24 cases. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2008 Jun;265(6):675-80.
15. Kandiloros DC, Nikolopoulos TP, Ferekidis EA, Tsangaroulakis A, Yiotakis JE, Davilis D, et al. Laryngeal tuberculosis at the end of the 20th century. *J Laryngol Otol.* 1997 Jul;111(7):619-21.
16. Ministério da saúde SdVeS, Programa Nacional de Controle de Tuberculose. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2010.
17. Wang CC, Lin CC, Wang CP, Liu SA, Jiang RS. Laryngeal tuberculosis: a review of 26 cases. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007 Oct;137(4):582-8.
18. Couldery AD. Tuberculosis of the upper respiratory tract misdiagnosed as Wegener's granulomatosis--an important distinction. *J Laryngol Otol.* 1990 Mar;104(3):255-8.
19. Ewing JA. Detecting alcoholism. The CAGE questionnaire. *JAMA.* 1984 Oct 12;252(14):1905-7.
20. Brasil. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. Ministério da Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica; 2008 [updated 2008; cited 2014]; Available from: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_laboratorial_tuberculose.pdf.
21. Lim JY, Kim KM, Choi EC, Kim YH, Kim HS, Choi HS. Current clinical propensity of laryngeal tuberculosis: review of 60 cases. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2006 Sep;263(9):838-42.
22. Bailey CM, Windle-Taylor PC. Tuberculous laryngitis: a series of 37 patients. *Laryngoscope.* 1981 Jan;91(1):93-100.
23. Bhat VK, Latha P, Upadhya D, Hegde J. Clinicopathological review of tubercular laryngitis in 32 cases of pulmonary Kochs. *Am J Otolaryngol.* 2009 Sep-Oct;30(5):327-30.
24. Garcia R, Cecatto SB, Mendonça R, Barcelos C, Santos RO, Rapoport PB. Tuberculose e blastomicose laríngeas: relato de três casos e revisão de literatura. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia* 2004;70:255-9.
25. Brasil. Boletim epidemiológico- O controle da tuberculose no Brasil: avanços, inovações e desafios. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde; 2014 [updated 2014; cited 2014]; Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/>.

26. Porras Alonso E, Martin Mateos A, Perez-Requena J, Avalos Serrano E. Laryngeal tuberculosis. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)*. 2002;123(1):47-8.
27. Hasibi M, Yazdani N, Asadollahi M, Sharafi M, Dehghan Manshadi SA. Clinical features of laryngeal tuberculosis in Iran. *Acta Med Iran*. 2013 Sep;51(9):638-41.
28. da Costa DC, Palmeiro MR, Moreira JS, Martins AC, da Silva AF, Madeira Mde F, et al. Oral manifestations in the American tegumentary leishmaniasis. *PLoS One*. 2014;9(11):e109790.
29. Oliveira AG, Brito PD, Schubach AO, Oliveira RV, Saheki MN, Lyra MR, et al. Influence of the nutritional status in the clinical and therapeutical evolution in adults and elderly with American Tegumentary Leishmaniasis. *Acta Trop*. 2013 Oct;128(1):36-40.
30. Sataloff RT, Heman-Ackah YD, Hawkshaw MJ. Clinical anatomy and physiology of the voice. *Otolaryngol Clin North Am*. 2007 Oct;40(5):909-29, v.
31. Prasad KC, Sreedharan S, Chakravarthy Y, Prasad SC. Tuberculosis in the head and neck: experience in India. *J Laryngol Otol*. 2007 Oct;121(10):979-85.
32. Galietti F, Giorgis GE, Gandolfi G, Astesiano A, Miravalle C, Ardizzi A, et al. Examination of 41 cases of laryngeal tuberculosis observed between 1975-1985. *Eur Respir J*. 1989 Sep;2(8):731-2.
33. Sa LC, Meirelles RC, Atherino CC, Fernandes JR, Ferraz FR. Laryngo-pharyngeal Tuberculosis. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2007 Nov-Dec;73(6):862-6.
34. WHO. The union monograph on TB and tobacco control: joining efforts to control two related global epidemics. Geneva: World Health Organization; 2007 Contract No.: Document Number|.
35. Ling L, Zhou SH, Wang SQ. Changing trends in the clinical features of laryngeal tuberculosis: a report of 19 cases. *Int J Infect Dis*. 2010 Mar;14(3):e230-5.
36. Soda A, Rubio H, Salazar M, Ganem J, Berlanga D, Sanchez A. Tuberculosis of the larynx: clinical aspects in 19 patients. *Laryngoscope*. 1989 Nov;99(11):1147-50.
37. Agarwal P, Bais AS. A clinical and videostroboscopic evaluation of laryngeal tuberculosis. *J Laryngol Otol*. 1998 Jan;112(1):45-8.



4.2) ARTIGO 2

"Evaluation of voice disorders in patients with active laryngeal tuberculosis." PLoS One **10**(5): e0126876. Publicado na revista PLoS One em 25 de maio de 2015.

Neste artigo, que corresponde ao objetivo número dois desta tese, descrevemos as características anatômicas e a qualidade vocal de pacientes com TBL ativa. Os sítios laríngeos mais frequentemente afetados foram as pregas vocais (87,5%), pregas vestibulares (66,7%), epiglote (41,7%), aritenóides (50%), pregas ariepiglóticas (33,3%) e região interaritenóidea (33,3%). A queixa de disфонia foi observada em 95,8% e na análise acústica vocal observamos alterações dos testes Jitter em 58,3%, de Shimmer em 83,3% e do GNE em 70,8%. Alterações vocais encontradas na TBL ativa foram semelhantes às encontradas após a cura das mesmas, sugerindo que sequelas e mecanismos de ajuste vocal podem se instalar na fase aguda da doença e se perpetuar durante a fase de cura, com impacto negativo sobre a qualidade vocal destes pacientes.


RESEARCH ARTICLE

Evaluation of Voice Disorders in Patients with Active Laryngeal Tuberculosis

Marcia Mendonça Lucena^{1,2}, Fernanda dos Santos da Silva¹, Ananda Dutra da Costa¹, Gabriela Rodrigues Guimarães³, Ana Cristina Nunes Ruas², Frederico Pereira Bom Braga¹, Mateus Pereira Bom Braga¹, João Gustavo Corrêa Reis¹, Daniel César Silva da Costa¹, Mariana Reuter Palmeiro¹, Valéria Cavalcanti Rolla⁴, Cláudia Maria Valete-Rosalino^{1,5*}

1 Laboratory of Clinical Research and Surveillance in Leishmaniasis, Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, **2** Department of Speech Pathology, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, **3** Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, **4** Laboratory of Clinical Research in Mycobacteriosis, Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, **5** Department of Otolaryngology and Ophthalmology, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

* claudia.valete@ini.fiocruz.br


 OPEN ACCESS

Citation: Lucena MM, da Silva FS, da Costa AD, Guimarães GR, Ruas ACN, Braga FPB, et al. (2015) Evaluation of Voice Disorders in Patients with Active Laryngeal Tuberculosis. *PLoS ONE* 10(5): e0126876. doi:10.1371/journal.pone.0126876

Academic Editor: José-María García-García, Hospital San Agustín, Aviles, Asturias, Spain, SPAIN

Received: January 21, 2015

Accepted: April 8, 2015

Published: May 26, 2015

Copyright: © 2015 Lucena et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was funded by National Institute of Infectious Diseases (INI) (PA2010-2013)-FIOCRUZ, Papes VIFIOCRUZ/Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (407759/2013-7), and Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of Rio de Janeiro State (FAPERJ) (E-26/102.183/2013), Brazil. CMMR is the recipient of fellowships from FAPERJ. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Introduction

Laryngeal tuberculosis (LTB) is the most frequent larynx granulomatous disease. In general there is lung involvement, but in an important proportion of cases you can find LTB without pulmonary disease. The lesions observed in LTB, such as ulceration and fibrosis, can interfere in the process of voice production. The involvement of the mucous lining of the vocal folds can change their flexibility and, consequently, change voice quality, and the main symptom is dysphonia present in almost 90% of cases.

Objective

To describe the anatomical characteristics and voice quality in LTB patients.

Material and Method

A descriptive cross-sectional study was conducted with 24 patients.

Result

The most frequently affected sites were vocal folds in 87.5% patients, vestibular folds in 66.7%, epiglottis in 41.7%, arytenoid in 50%, aryepiglottic folds in 33.3%, and interarytenoid region in 33.3% patients. We found 95.8% cases of dysphonia. The voice acoustic analysis showed 58.3% cases of Jitter alterations, 83.3% of Shimmer and 70.8% of GNE.

Conclusion

Voice disorders found in active laryngeal tuberculosis are similar to those reported after clinical healing of the disease, suggesting that sequelae and vocal adjustments may install

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

during the active phase of the disease, negatively impacting the process of vocal quality reestablishment.

Introduction

Tuberculosis (TB) is a contagious infectious disease of chronic evolution caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), an anatomico-pathologically characterized by the presence of granulomas and central caseous necrosis. The transmission occurs predominantly by air and particularly affects the lungs, but can occur in any organ [1].

In Brazil, the Notifiable Diseases Information System [2] reported 70,047 new cases in 2012. According to the World Health Organization (WHO) Brazil occupies the 17th position in relation to the number of cases. The state of Rio de Janeiro presents the highest incidence rate of the disease in the country. In 2011, Rio de Janeiro presented an incidence rate of 72.3 cases, with the emergence of 11,651 new cases [2,3].

According to WHO 2012 report, of 84,137 TB new cases and relapses reported in Brazil (2011), 10,067 (11.97%) were of the extrapulmonary forms of the disease [2]. HIV infection not only changed the epidemiological trend of the disease, but its clinical presentation, raising the incidence of extrapulmonary forms [1]. The most recurrent forms of extrapulmonary TB are: pleural, peritoneal, pericardial, lymphatic, laryngeal, genitourinary, adrenal, bone, meningeal, intestinal, ophthalmic and cutaneous [4].

TB lesions can be observed in the head and neck in 10% cases [5]. Manifestations in this region are predominant in the larynx. Disorders in external and middle ear, tonsils, cervical lymph nodes, pharynx, oral cavity and salivary glands are less common [6].

Laryngeal tuberculosis (LTB) is the most frequent larynx granulomatous disease. In general there is lung involvement but in an important proportion of cases you can find LTB without pulmonary disease [1,7,8,9]. The lesions observed in LTB, such as ulceration and fibrosis can interfere in the process of voice production [1]. The involvement of the mucous lining of the vocal folds can change their flexibility and, consequently, change voice quality, and the main symptom is dysphonia present in almost 90% of cases [8,10]. The objective of the present paper is to describe the anatomical characteristics and voice quality of patients with active LTB.

Material and Method

A descriptive cross-sectional study was conducted by an interdisciplinary team of infection disease specialists, otorhinolaryngologists and speech therapists at the Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases (INI)-Fiocruz, from 2010 to 2013, in a cohort of 24 patients with LTB diagnosed by the identification of *M. tuberculosis* by at least one of the following methods: sputum analysis through direct examination or culture and/or analysis of tissue samples obtained by biopsy laryngeal through direct examination, culture or histopathology with Wade staining technique. This study was approved by the Ethics in Research Committee—Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases under protocol number 09991613.4.0000.5262 and an informed consent form was signed by all the patients.

During anamnesis the patients were asked about the presence of dysphonia and examined by an otorhinolaryngologist with a 70 degree Karl Storz rigid videolaryngoscope (Tuttlingen, Germany) to assess the presence and location of the mucosal lesions. The study of voice quality was performed simultaneously by three speech therapists through:

Table 1. Clinical and vocal characteristics of 24 patients with active laryngeal tuberculosis, Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation, 2014.

N ^a	Gender*	Age	Smoking	Associated pulmonary tuberculosis	Lesion location	Dysphonia	Voice disorder	Grade of hoarseness
1	M	61	No	Yes	vocal folds and vestibular folds	Yes	Yes	Severe
2	M	56	Yes	Yes	vocal folds and vestibular folds	Yes	Yes	Moderate
3	M	19	No	Yes	vocal folds and vestibular folds	Yes	Yes	Moderate
4	M	69	No	Yes	vocal folds	Yes	Yes	Moderate
5	M	34	Yes	Yes	vocal folds, epiglottis, arytenoid and aryepiglottic folds	Yes	Yes	Moderate
6	F	42	Yes	Yes	vocal folds, epiglottis and arytenoid	Yes	Yes	Severe
7	F	82	No	Yes	vestibular folds and aryepiglottic folds	Yes	Yes	Moderate
8	M	64	No	Yes	vocal folds, vestibular folds and interarytenoid region	Yes	Yes	Severe
9	M	28	No	Yes	vocal folds, vestibular folds, epiglottis, arytenoid and interarytenoid region	Yes	Yes	Moderate
10	M	24	Yes	Yes	vocal folds, vestibular folds, epiglottis, arytenoid, aryepiglottic folds and interarytenoid region	Yes	Yes	Moderate
11	M	40	Yes	Yes	vocal folds, vestibular folds, epiglottis, arytenoid, aryepiglottic folds and interarytenoid region	Yes	Yes	Severe
12	M	54	No	Yes	vocal folds, vestibular folds and arytenoid	Yes	Yes	Moderate
13	M	54	No	No	vocal folds	Yes	Yes	Moderate
14	M	65	No	Yes	vocal folds, vestibular folds, epiglottis, arytenoid and interarytenoid region	Yes	Yes	Moderate
15	M	49	Yes	Yes	vocal folds and vestibular folds	Yes	Yes	Severe
16	M	61	Yes	Yes	vocal folds	Yes	Yes	Moderate
17	M	65	Yes	Yes	Epiglottis and aryepiglottic folds	Yes	Yes	Moderate
18	M	65	Yes	Yes	vocal folds, vestibular folds, epiglottis, arytenoid, aryepiglottic folds and interarytenoid region	Yes	Yes	Severe
19	F	45	No	Yes	vocal folds, vestibular folds, epiglottis and aryepiglottic folds	Yes	Yes	Moderate
20	M	51	Yes	Yes	vocal folds	Yes	Yes	Severe
21	F	48	No	Yes	vocal folds	Yes	Yes	Moderate
22	M	61	Yes	Yes	vocal folds, vestibular folds, arytenoid, and interarytenoid region	Yes	Yes	Severe
23	M	30	No	Yes	vocal folds	Yes	Yes	Moderate
24	F	53	No	No	vestibular folds and epiglottis	No	No	No alteration

*M- male; F- female

doi:10.1371/journal.pone.0126876.t001

1- Analysis of vocal auditory perception, through the GRBASI scale⁽¹¹⁾ (G = grade of hoarseness, R = level of roughness, B = breathiness, A = asthenia, S = strain, and I = instability) which are classified from 0 to 3, with 0 = no alteration; 1 = slight alteration; 2 = moderate alteration; and 3 = severe alteration [12].

2—Vocal acoustic analysis with VoxMetria software (CTS Informática, Pato Branco, Brasil), with voice recording of all patients in quiet environment, directly in the computer for better voice capture. We used a Plantronix-model A-20 microphone, with a 10 cm mouth-microphone distance, during the emission of the /e/ sustained vowel at normal condition [13]. The

Table 2. Degree of voice perturbation in the GRBASI* scale in 24 patients with laryngeal tuberculosis, Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, 2014.

Grade	G		R		B		A		S		I	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
No	1	4,2	1	4,2	1	4,2	24	100	7	29,2	6	25
Slight	0		11	45,8	7	29,2	0		10	41,7	13	54,2
Moderate	15	62,5	12	50	8	33,3	0		7	29,2	5	20,8
Severe	8	33,3	0		8	33,3	0		0		0	

n= number.

*GRBASI scale.

G—hoarseness, R—roughness B—breathiness; A—asthenia; S—strain

doi:10.1371/journal.pone.0126876.t002

parameters used in the present study were: Jitter which indicates the variability of the fundamental frequency perturbation in the short term, with normal pattern up to 0.6%; Shimmer, which indicates the variability of the amplitude of the vocal note in the short term and with normal values above 6.5% and measures of Glottal to Noise Excitation Ratio (GNE), which is an acoustic measure to assess noise in a pulse train that is typically generated by the oscillation of the vocal folds, with normal values below 0.5 (dimensionless).

Dysphonia was defined as the hoarseness symptom reported by the patient regardless the specific vocal assessment. Change in voice quality was defined as a modification in the vocal auditory perception analysis and / or in the vocal acoustic analysis.

The frequencies of the categorical variables were estimated. The values of Shimmer, Jitter and GNE did not present normality in the Shapiro-Wilk test. Therefore, the median and interquartile range were calculated for those variables and the mean \pm standard deviation were calculated for the age. The Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 16.0 (IBM Company) was used for data analysis.

Results

We evaluated 24 LTB patients, with mean age of 50.83 years (SD \pm 15.68), with 19 (79.2%) males. Twenty two (91.7%) patients presented concomitant pulmonary TB. Of the two patients with laryngeal tuberculosis with no concomitant pulmonary TB, one had a history of previously treated pulmonary TB and the other was diagnosed with tuberculosis for the first time.

Comorbidities were observed in nine patients and, three of them presented association with more than one disease: 3 cases of hypertension, 2 cases of HIV, 2 cases of bronchitis, 1 case of chronic obstructive pulmonary disease, 1 case of diabetes mellitus, 1 case of skin cancer, 1 case of hepatitis C and 1 case of leprosy. Of the 24 patients, 11 (45.8%) were smokers and 17 (70.8%) consumed alcohol.

Table 1 shows the main data of the 24 patients. We found 23 (95.8%) patients with dysphonia and alteration of the vocal quality. The most frequently affected laryngeal sites were: vocal folds in 87.5%; vestibular folds in 66.7%; epiglottis in 41.7%; arytenoid in 50%; aryepiglottic folds in 33.3%; and interarytenoid region in 33.3% patients. The results of the analysis of vocal auditory perception through the GRBASI scale are shown in Table 2.

In the vocal acoustic analysis, 20 (83.3%) patients presented alteration in Shimmer, 14 (58.3%) in Jitter and 17 (70.8%) in GNE. We obtained the following median values: Jitter = 0.97 (IIQ = 0.29–5.55), Shimmer = 10.31 (IIQ = 6.78–18.36) and GNE = 0.31 (IIQ = 0.23–0.51).

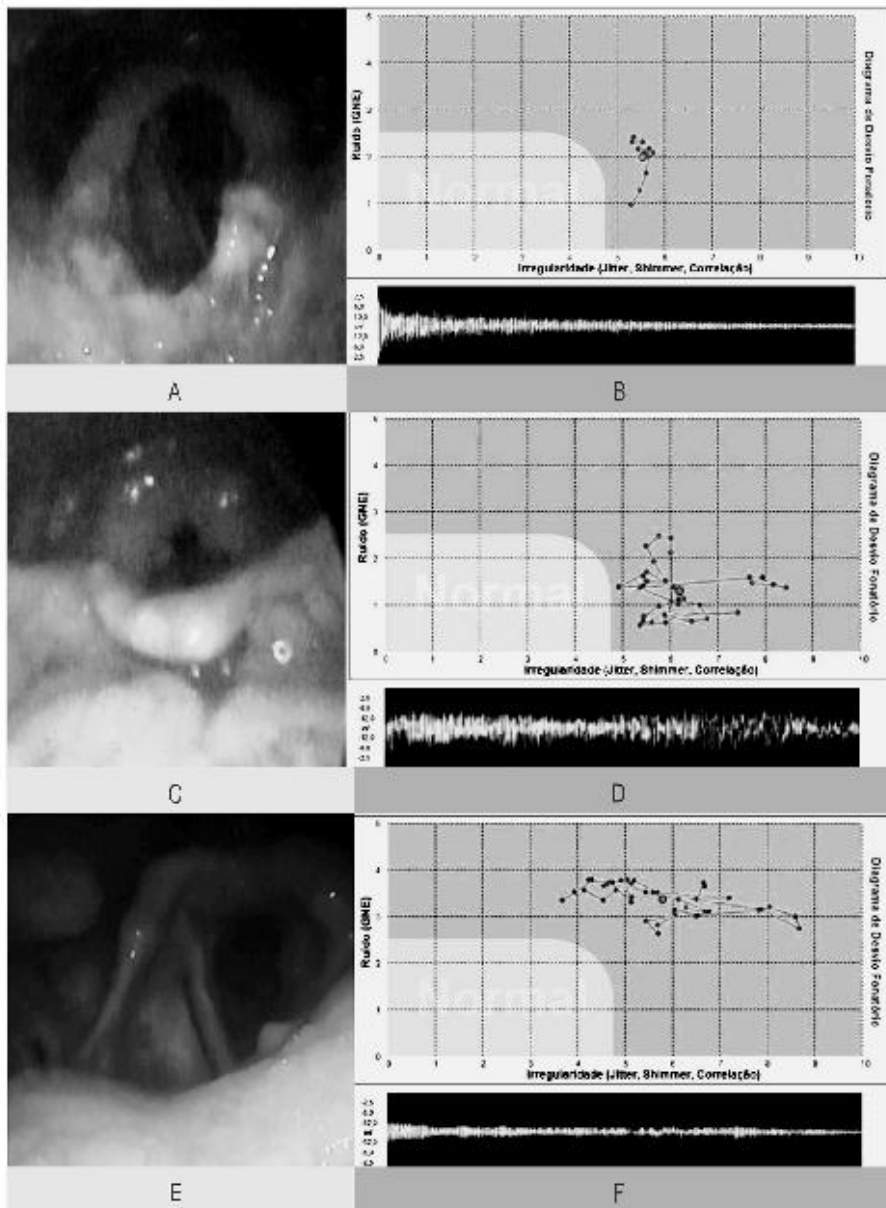


Fig 1. Videolaryngoscopy images and diagrams of phonation deviation in 3 patients with laryngeal tuberculosis, Evandro Chegas, National Institute of Infectious Diseases, Brazil, 2014. * (A) epiglottitis with granular appearance with amputation of the edges with uninjured vocal folds (B) phonatory deviation diagram from the normal range (C) granulous infiltrate of the vallecula, necrosis area of the epiglottis, infiltration of aryepiglottic folds and arytenoid, precluding visualization of the vocal folds (D) phonatory deviation diagram from the normal range (E) presence of infiltration and hyperemia of the arytenoid, left vocal fold and left vestibular fold (F) phonatory deviation diagram from the normal range.

doi:10.1371/journal.pone.0126876.g001

Fig 1 shows videolaryngoscopy images and the Diagram of Phonation Deviation of three patients.

Discussion

The anatomical and voice disorders of LTB patients were analyzed. There was prevalence of adult males, as already described in literature [1,7,8,9]. The vocal fold was the most involved anatomical site and dysphonia the most frequent symptom, consistent with other studies [7,8,9]. All the patients with lesions in the vocal folds reported dysphonia. The production of a good quality sound depends on the flexibility of the vocal folds and wave formation in the mucous layer and also on a proper and interdependent function of all the muscles acting on its production and the integrity of the vocal tract tissues [11,14]. Therefore, even patients without lesions in the vocal folds may have dysphonia, particularly if they have lesions in the aryepiglottic folds, which are involved in the adduction and abduction processes of the vocal folds. This explains why, of the three patients who did not have lesions of the vocal folds, the only one who had neither dysphonia nor vocal disorder also had no lesions in the aryepiglottic folds.

The grade of hoarseness of patients with voice disorders varied from moderate to severe. The analyses of the alterations found in the GRBASI scale patterns and in the parameters of the acoustic analysis are consistent with the anatomic alterations of the main larynx sites affected, where lesions of the vocal folds and vestibular folds stand out. The alteration of these parameters is directly linked to alterations of the glottal source, such as lack of vibration control and decreased adduction capacity of the vocal folds, reduced glottal resistance and mass lesions in those structures [14].

We did not find in the literature a single report on voice disorder assessment in LTB patients with active lesions. The papers published report functional alterations after medical treatment [13,15]. Considering that voice disorders were still present in more than 80% treated LTB cases [13], we can assume that this alteration begins during the active phase of the disease and is perpetuated due to the LTB lesion scarring process or by functional adjustment mechanisms developed during the phase of voice functional limitation. It is possible that speech-language guidance given to patients during LTB treatment is able to prevent the compensatory mechanisms that lead to the perpetuation of voice disorders, thus restoring the quality of communication and reducing vocal and social impacts of the disease, even before the end of medical treatment.

Conclusion

Voice disorders found in active laryngeal tuberculosis are similar to that reported in the literature after clinical healing of the disease, suggesting that sequelae and vocal adjustments may install during the active phase of the disease negatively impacting voice quality restoring process.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MML FSS ADC ACNR FPBB MPBB JGCR DCSC VCR CMVR. Performed the experiments: MML FSS ADC ACNR FPBB MPBB JGCR DCSC MRP VCR CMVR. Analyzed the data: MML FSS ADC ACNR GRG VCR CMVR. Contributed

reagents/materials/analysis tools: MML FSS ADC ACNR VCR CMVR. Wrote the paper: MML FSS ADC ACNR GRG FPBB MPBB JG CR DCSC VCR CMVR.

References

1. Porras AE, Martín MA, Pérez-Requena J, Avalos SE (2002). Laryngeal tuberculosis. *Rev Laryngol Otol Rhinol.* 123: 47–48. PMID: [12201001](#)
2. Ministério da saúde, Portal da Saúde (2012). Available: <http://portal.saude.gov.br/portal/cfm?cdm=31109>. Accessed march 13.
3. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica (2013). Available: http://portal.saude.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=741-secretaria-svs/vigilancia-de-e-e-z/tuberculose-tratamento. Accessed 2013 march 13.
4. Talarmin AB (2002). Doenças pulmonares—Tuberculose extrapulmonar. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 5: 324–34.
5. Martínez A, Lede A, Fernández JA (2010). Tuberculosis rinofaríngea primaria: una localización infrecuente. *España: Acta Otorrinolaringológica Española.* 62(5): 401–403.
6. Sans PM, Almeida CI, Valle LOD, Costa LH, Angeli ML (2008). Tuberculose de orelha, doença profissional. *Bez J Otorrinolaringol.* 74: 621–7. PMID: [18852933](#)
7. Ling L, Zhou SH, Wang SQ (2010). Changing trends in the clinical features of laryngeal tuberculosis: a report of 19 cases. *International Journal of Infectious Diseases.* 14 (3): 230–235.
8. Lim JY, Kim KM, Choi EC, Kim YH, Kim HS, Choi HS (2006). Current clinical propensity of laryngeal tuberculosis: review of 60 cases. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 263(9):838–42. PMID: [16893574](#)
9. Gandhi S, Kulkarni S, Mishra P, Thekedar P (2012). Tuberculosis of Larynx. Revisited: a report on clinical characteristics in 10 cases. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg.* 64(3):244–247. doi: [10.1007/s12070-011-0333-4](#) PMID: [23998026](#)
10. Ozüdoğru E, Caklı H, Altıntaş EE, Güzüz MK (2005). Effects of laryngeal tuberculosis on vocal fold functions: case report. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 25(6):374–377. PMID: [16749807](#)
11. Hirano M (1981). *Clinical examination of voice* (Vol. 5). Springer:Pg 100.
12. Haddad L, Abrahão M, Cervantes O, Ceccon FP, Gielow I, Carvalho JR et al. (2006). Avaliação da voz em pacientes submetidos à cordectomia com laser de CO2. *Rev. bras. otorrinolaringol.* 72(3):295–302.
13. Ruas ACN, Folla VC, Araújo-Melo MH, Moreira JS, Valet e-Rosalino CM (2010). Vocal quality of patients treated for laryngeal tuberculosis, before and after speech therapy. *J Laryngol Otol.* 124 (11):1153–7. doi: [10.1017/S0022215110001106](#) PMID: [20643405](#)
14. Behlau M, Madazio G, Feijó D, Pontes P (2001). Voz—O Livro do Especialista: Avaliação da Voz. Rio de Janeiro: Revinter. 1(3): 86–180.
15. Fagundes RCF, Cury RI, Bastos WA, Silva L, Duprat A (2011). Tuberculose laríngea: proposta de intervenção fonaudiológica nas sequelas de voz após o tratamento farmacológico. *Rev. soc. bras. fonocardiol.* São Paulo. 16(1):99–103.

4.3) ARTIGO 3

“A 42-year-old immunocompromised man with pulmonary and larynx lesions: diagnosis, histopathology and immunohistochemistry study”

Artigo submetido como Simpósio para revista científica PLoS Neglected Tropical Diseases em 28 de outubro de 2015.

PLOS Neglected Tropical Diseases

"A 42-year-old immunocompromised man with pulmonary and larynx lesions: diagnosis, histopathology and immunohistochemistry study"

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	"A 42-year-old immunocompromised man with pulmonary and larynx lesions: diagnosis, histopathology and immunohistochemistry study"
Short Title:	Pulmonary and larynx lesions in immunocompromised patient
Article Type:	Symposium
Keywords:	cryptococcosis; larynx; lung injury; diagnosis, differential; immunosuppression; organ transplantation; tuberculosis; paracoccidioidomycosis; histoplasmosis
Corresponding Author:	Cláudia Maria Valete-Rosalino, PhD INI - FIOCRUZ RIO DE JANEIRO, BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	INI - FIOCRUZ
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	João Gustavo Corrêa Reis
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	João Gustavo Corrêa Reis Clarissa Souza Mota Reis Luiz Claudio Ferreira Leonardo Pereira Quintella Mariana Reuter Palmeiro Fátima Conceição-Silva Cláudia Maria Valete-Rosalino, PhD
Order of Authors Secondary Information:	

Este artigo corresponde ao objetivo número quatro desta tese. Relatamos o caso de um paciente transplantado em uso de imunossupressores, com lesão laríngea e sinais de infecção pulmonar concomitante, com hipótese diagnóstica não confirmada de tuberculose. Como apresentou piora clínica considerável e, não podendo mais aguardar a confirmação do diagnóstico, iniciou tratamento específico empiricamente. Evoluiu com efeito adverso ao tratamento que foi suspenso. Neste ínterim, obtive confirmação diagnóstica de criptococose através do exame histopatológico, tendo então iniciado tratamento antifúngico, obtendo melhora seguida de cura das lesões. Este resultado ressalta a importância da histopatologia para o diagnóstico diferencial das granulomatoses infecciosas e não infecciosas da laringe.

“A 42-year-old immunocompromised man with pulmonary and larynx lesions: diagnosis, histopathology and immunohistochemistry study”

João Gustavo Corrêa Reis^{1,2,3}; Clarissa Souza Mota Reis¹; Luiz Cláudio Ferreira¹; Leonardo Pereira Quintella¹; Mariana Reuter Palmeiro^{1,2}; Fátima Conceição-Silva^{2*}; Cláudia Maria Valete-Rosalino^{1,4*}

- 1- Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases (INI), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
- 2- Laboratory of Immunoparasitology, Oswaldo Cruz Institute (IOC), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
- 3- Department of Bronchoesophagology and Head and Neck Surgery, Bonsucesso Federal Hospital, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
- 4- Department of Otorhinolaryngology and Ophthalmology, Faculty of Medicine, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

*Correspondence to :

claudia.valete@ini.fiocruz.br (CMVR); fconcei@ioc.fiocruz.br (FCS)

Case description

A 42-year-old man was hospitalized presenting three weeks symptoms of myalgia, prostration and appetite loss. In the last 10 days evolved with cough, dyspnea upon moderate exertion, and fever, especially in the night. He reported that, eight years earlier due to agenesis of the left kidney and repeated infections in the right kidney, he progressed to kidney failure and hemodialysis. One year after, he was submitted to transplantation, having kept ever since the continuous use of prednisone (5mg/day), mycophenolate mofetil (1g/day), tacrolimus (2g/day), atenolol (50mg/day) and clonidine hydrochloride (0.2mg/day).

He is retired, nonsmoker, non-drinker, urban resident and claimed not to attend to rural areas or to getting in touch with soil, domestic or non-domestic animals. At admission, there were no significant abnormalities in the physical examination. The initial laboratory exams indicated slight anemia, normal white blood cell count and absence of urinary infection signs. The anti-HIV, hepatitis and cytomegalovirus serologies were all negative. Computerized tomographies of thorax and abdomen showed bilateral subpleural nodules, with lung cavitation at the right, of mediastinal lymph node enlargement and several spleen nodules. Initially, he was given clarithromycin (1g/day) and amoxicillin with potassium clavulanate (3g/day), which were suspended on the sixth day of treatment, due to lack of improvement of the clinical manifestations and slight increase of hepatic enzymes.

At this point, which are the main differential diagnoses and which additional exams should be conducted?

Since the patient was immunosuppressed and presented refractory pulmonary infection, other diagnostic hypothesis were raised, such as tuberculosis, paracoccidioidomycosis and histoplasmosis. Blood culture, serology for histoplasmosis and acid fast smears for detection of acid-alcohol resistant bacillus were performed in sputum (3 samples), as well as upper gastrointestinal endoscopy and bronchoscopy with sample collection for examination. No signs of lesions or pathogenic infectious agents were identified in those exams, but a laryngeal ulcerated lesion was identified in the right arytenoid mucosa and half of the aryepiglottic fold (Fig. 1a). The laryngeal motility was preserved.

Evolution and diagnosis confirmation

Still with no nosological diagnosis, the patient evolved with worsening of the clinical manifestations. He was then empirically medicated with the tuberculostatic scheme containing Rifampicin (150mg/day), Isoniazid (75mg/day), Pyrazinamide (400mg/day), Ethambutol (275mg/day) and Liposomal Amphotericin B (250mg/day), which were then suspended on the fifth day of treatment due to the development of acute pancreatitis (amylase-856 U/L and lipase-2123 U/L).

Aiming to clarify the diagnosis, the laryngeal lesion was biopsied by indirect laryngoscopy and the tissue fragments were sent for histopathology and fungi and mycobacteria cultures. The hematoxylin-eosin staining showed squamous metaplasia with regular hyperplasia and a discreet mixed inflammatory infiltrate without visualization of areas organized into granuloma (Fig. 1b and 1c). Mycobacteria were not identified through Wade staining. However, by staining for fungi through either Grocott's methenamine stain (Fig. 1d), periodic acid Schiff (PAS) and Alcian-Blue (pH 2.5) (Fig. 1e) and mucin (Mayer's mucicarmine) (Fig. 1f), round, capsulated, fungi forms with a single budding, compatible with *Cryptococcus neoformans* were observed. Culture of the specimens showed no growth of mycobacteria, but *C. neoformans* was isolated in the mediums Sabouraud Agar, Niger-Agar and Vitek 2 identification system (bioMérieux, France).

How can people be infected by *Cryptococcus neoformans*?

C. neoformans is a worldwide fungi, constituted by encapsulated yeast with simple budding. It is frequently associated with human transmission through pigeon dry stools, manure, vegetal substrates and house dust [1-3]. The excrements, rich in urea and creatinine, allow the abundant growth of this yeast and favor the formation of microfoci, noticeably in urban centers, where the exposure to fungi becomes a daily event. *Cryptococcus's* infection occurs primarily through the inhalation of infectious propagules [1, 4]. Other rare forms of infection have been described, e.g. transplant of an infected tissue [4]. Extrapulmonary sites would be affected either by hematogenic/lymphatic spread, or the direct propagation of the fungi [5].

Cryptococcus may produce either a latent or acute infection. The initial manifestations of the disease are probably controlled by the fungi's virulence and the immune response of the host [4].

When must the hypothesis of laryngeal cryptococcosis be raised?

This disease, though rare, should be considered as a diagnosis hypothesis in the presence of laryngeal lesions in patients that are immunocompromised or holding facilitator factors (e.g. diabetes mellitus or inhaled corticosteroids), even in the absence of active pulmonary infections or laryngeal symptoms.

Which is the relationship between cryptococcosis and immunosuppression?

Cryptococcosis can affect immunocompetent individuals. However, as cellular immunity has been pointed out as the most important defense mechanism against *C.neoformans*, immunocompromised patients present a higher risk of contracting cryptococcosis [4, 6]. Since the epidemic of HIV infection, cryptococcosis has become an opportunistic infection of global importance. Despite the use of highly active antiretroviral therapy (HAART) being associated with a smaller incidence of this disease in developed countries, cryptococcosis' incidence and mortality are still high in countries with non-controlled HIV epidemics and limited access to treatment [4].

The increased number of organ transplantations associated with the use of immunosuppressive medicines increase the risk of cryptococcosis [4]. This yeast may harm any organ of the human body including skin, prostate, bones, and urinary and blood systems, but the lungs and central nervous system are the most frequently affected [2-4]. Despite laryngeal infection by *C.neoformans* being considered rare [7] it could be found in immunocompetent as well as immunosuppressed patients in different degrees [5, 7-17].

How can the diagnosis of laryngeal cryptococcosis be confirmed?

The identification of *C.neoformans* in sputum or broncho alveolar lavage is not a confirmatory diagnosis of laryngeal cryptococcosis, once it can imply only in the colonization

of the respiratory tract. Therefore, in order to confirm the diagnosis it becomes necessary to find the fungus in the lesion through culture and histopathological exam of the biopsied tissue fragment. However, these exams are not often done [1, 18].

Histopathology by hematoxylin-eosin must be performed regularly for the assessment of the lesion pattern, but the fungus is hardly identified. In these cases special staining for fungi must be performed [1, 13, 19].

Which are the main histological findings in laryngeal lesions of cryptococcosis?

In both immunocompetent and immunosuppressed patients, pseudoepitheliomatous hyperplasia and chronic inflammatory process without formation of granulomas could be observed [7-12, 14, 15, 17]. Squamous hyperplasia was observed in the report of two immunocompetent patients. Squamous metaplasia with regular hyperplasia and a discreet mixed inflammatory infiltrate, with no visualization of areas organized into granulomas, were observed in the present report (Fig.1b and 1c).

In laryngeal cryptococcosis associated with immunosuppression, how can the inflammatory process organize itself?

The integrity of the immune system is essential for the defense against pathogens, and a cellular immunity, through the organization of the granulomatous inflammatory process, seems to be crucial to control the *C.neoformans* infection [3, 4]. Several types of cells are involved, including TCD4+, TCD8+ and natural killer [3]. In immunocompetent patients, a typical granuloma is usually found on the spot of the cryptococcal infection, identified as a compact aggregate of macrophages, epithelial cells, and multinucleated giant cells, containing numerous intracytoplasmic yeasts, besides TCD4+ lymphocytes [20]. In AIDS patients, as well as in those under use of immunosuppressive drugs, the alteration of T

cells' functions is evidenced by alterations on the histopathologic pattern of the lesions caused by *C.neoformans*, especially the absence of granulomas and a presence of inflammatory infiltrate with no or rare lymphocytes [6, 20]. Our patient uses three types of immunosuppressive drugs: tacrolimus, which acts on the destruction or inhibition of T lymphocytes; mycophenolate mofetil, which blocks the proliferation of T lymphocytes and corticosteroid, which reduces the inflammation by inhibiting the release of cytokines by macrophages [6]. In AIDS patients without HAART scheme and with pulmonary cryptococcosis, absence of granuloma and minimum lymphocyte response were observed [20]. In this connection, the T cells alteration/immunosuppression caused by drugs may justify the absence of a granulomatous reaction in the patient's laryngeal lesion in the present study. Therefore, we highlight the need to perform special stainings for fungi and bacteria, even in the absence of granulomatous reaction in immunocompromised patients with suspicious of infection.

In none of the previously reported cases an identification of the inflammatory cells present on the laryngeal lesion was performed. From the immunohistochemical study (anti-neutrophil elastase, -macrophage, -NK, -CD4 and -CD8 -DakoCytomation, Denmark, -CD22-eBioscience, USA) we identified the presence of neutrophils (Fig 1g) and macrophages (Figure 1h) amongst rounded bodies similar to fungal structures, as well as NK cells, particularly around the blood vessels (Fig.1i). On the other hand, B (CD22), CD4 and CD8 lymphocytes could not be observed. These results points to a deficiency of the acquired immunity, and the possible role of the innate immunity on the inflammatory response of the patient studied.

Figure 1 – Endoscopic and microscopic images of laryngeal lesions caused by *Cryptococcus neoformans* in a renal transplanted patient:

- a) Arrow indicates laryngeal ulcerated lesion in the mucosa of the right arytenoid region and adjacent half of the aryepiglottic fold;

- b e c) Hematoxylin-eosin, x100 e x200. Laryngeal mucosa with scarce inflammatory infiltrate without granulomas and intact epithelium (without ulceration);
- d) Grocott's methenamine stain x1000. Numerous, round, fungi forms -one with a single budding (Arrow);
- e) PAS-Alcian Blue (pH 2,5) x1000. Staining of fungal wall in red (PAS) and of its capsule in blue (Alcian Blue);
- f) Mucicarmin x1000. Staining of fungal capsule in reddish pink, characteristic of *Cryptococcus sp.*;
- g,h,i) Immunohistochemical study using peroxidase-AEC system (positively stained cells, brown color) for identification of: neutrophils x100 (g), macrophages x1000 (h) e natural killer cells x400 (i). Arrows indicate positively stained cells; observe in "h" numerous fungi forms inside the broken macrophage and in "i" a heterogeneous distribution of natural killer cells, even around blood vessels.

Treatment and evolution

Within ten days after recovering from acute pancreatitis, the patient restarted the treatment with Liposomal Amphotericin B (250mg/day) only, evolving progressively with global clinical improvement. After the 14th day of treatment, this antifungal was replaced by Itraconazole (400mg/day) and the patient was discharged with Itraconazole maintenance for over four weeks, followed by Fluconazole (200mg/day) for another eight weeks. By the end of the treatment, the patient presented a full recovery of the infection, including the healing of the laryngeal lesion, remaining cured until the present moment, three years after the clinical healing, even under continued use of immunosuppressives. The patient gave his consent for publication of his case history by signing the PLoS form.

Discussion

The present report is the first described in Latin America. Just as in most of the reported cases, our patient was a male, within the age group range and did not report contacting possible sources of contamination by *Cryptococcus* sp [8, 12-14]. However, the patient lived in a city with presence of pigeons, a bird whose feces are related to environmental contamination by the fungus [1]. Regarding the possible factors that may facilitate the disease occurrence, our report is the first case of laryngeal cryptococcosis in a renal transplanted patient under use of immunosuppressive drugs. Literature indicates that cryptococcal infections occur predominantly in patients with T-cell-mediated immune defects, especially those with acquired immunodeficiency syndrome and those with transplant-related immunosuppression [21]. However other immunosuppressive conditions can also increase risk of infection [4]. In this context, amongst the reported cases of laryngeal infection by *Cryptococcus* sp, the chronic use of inhaled corticosteroids [8-10, 14, 16], AIDS [11, 14, 15], chronic use of oral corticosteroids [8, 10] and diabetes mellitus [10, 12] can be highlighted. In four cases there were no reports of the use of immunosuppressives or facilitator factors of immunosuppression [7, 13, 22, 23].

Regarding the endoscopic aspect, the laryngeal lesion seems to be polymorphic, having several appearances, such as polypoid, wart, leukoplakic and erythematous lesions [5, 11, 14, 15]. Our patient had an ulcerated lesion, which was observed in just one case previously described [15]. The lesion was located mainly in the arytenoid mucosa, an anatomic site which was reported in two previous studies [10,17]. Literature demonstrates that the most usually reported location is the true vocal fold (75%), justifying the dysphonia as the most common symptom [7, 14], but the present case indicates that other sites may be affected.

Our patient presented general and pulmonary symptoms of an infectious process, without specifically laryngeal symptoms. Infectious pneumonitis acting together with laryngeal cryptococcosis, just as presented by our patient, was described only in two cases

[15, 22]. The signs of laryngitis were accidentally identified during bronchofibroscopy, eventhough the patient didn't complain about local symptoms. All the other cases previously reported presented laryngeal symptoms [7, 8, 11-17]. It is possible that, amongst the pulmonary or disseminated cryptococcosis, the frequency of the laryngeal cryptococcosis is higher than reported due to the lack of symptoms that raise the suspicion of lesions in such region. As a conclusion, aiming to avoid the delay of diagnostic confirmation in patients with chronic pulmonary infectious diseases, videolaryngoscopy, an examination easy to perform, can raise an early suspicion on cryptococcosis and, depending on the site, can allow obtaining tissue samples for microbiological and histological analysis that may clarify the etiology of the clinical manifestations presented by the patient.

Key points:

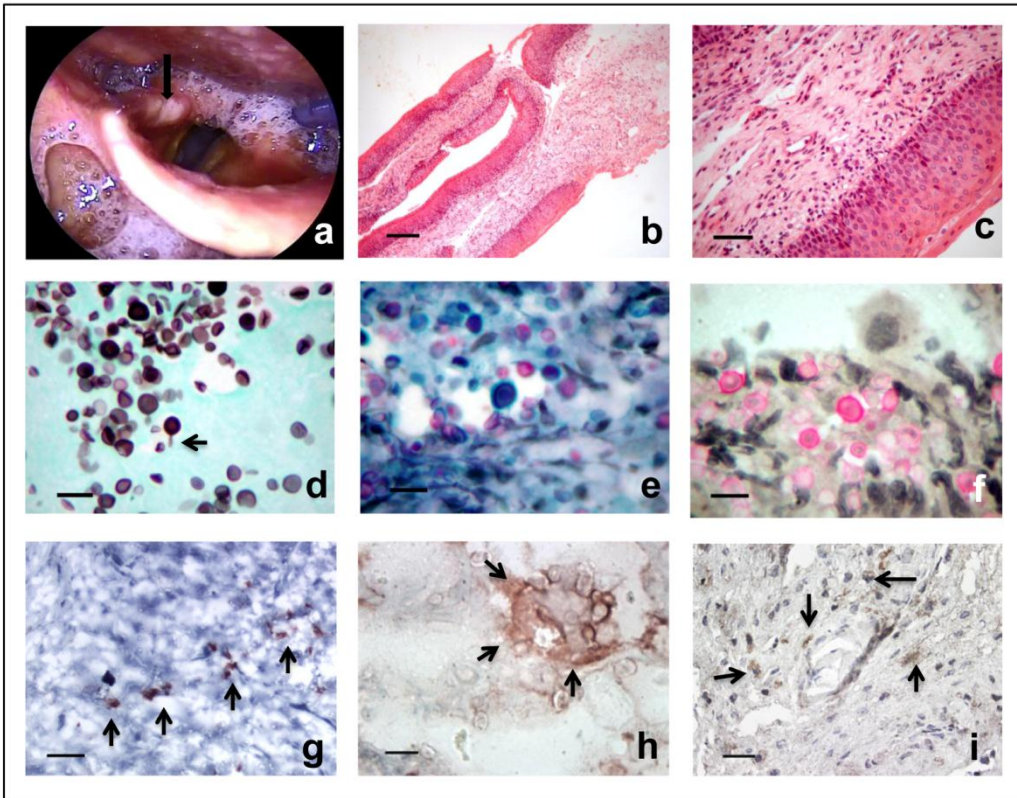
- 1- Even in the absence of laryngeal symptomatology, videolaryngoscopy may raise an early suspicion of cryptococcosis in patients without nosological confirmation of pulmonary infectious diseases.
- 2- Laryngeal cryptococcosis does not present a pathognomonic form of lesion: it may be leukoplakic, warty, ulcerated, edematous, etc.
- 3- The absence of granulomatous reactions in immunocompromised patients does not exclude the possibility of infection by microorganisms capable of inducing such kind of immune response (eg.tuberculosis, histoplasmosis and paracoccidioidomycosis) making the special staining for detection of fungi and bacteria essential for the histopathologic analysis.
- 4- The presence of *Cryptococcus neoformans* in sputum or bronchial lavages does not confirm the diagnosis of laryngeal cryptococcosis, since there may be a contamination from the lower airways. The diagnostic certainty is obtained through culture and histopathology of fragments of the laryngeal lesion.
- 5- Pulmonary or other kinds of cryptococcosis in other anatomic sites must be investigated in cases of patients with unspecified infectious symptomatology and

immunosuppression status, especially AIDS and transplanted patients, or in the presence of facilitator factors such as diabetes mellitus, chronic use of oral corticosteroids, amongst others.

References

1. Coura JR. Criptococose. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. 2ª edição ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013. p. 1224-35.
2. Fang W, Fa Z, Liao W. Epidemiology of *Cryptococcus* and cryptococcosis in China. *Fungal Genet Biol*. 2015 May;78:7-15.
3. Gibson JF, Johnston SA. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis. *Fungal Genet Biol*. 2015 May;78:76-86.
4. Chayakulkeeree M, Perfect JR. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am*. 2006 Sep;20(3):507-44, v-vi.
5. Frisch M, Gnepp DR. Primary cryptococcal infection of the larynx: report of a case. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1995 Oct;113(4):477-80.
6. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p. 362,87,88,463,75,76.
7. Chang YL, Hung SH, Liu CH, Hsu HT, Chao PZ, Lee FP, et al. Cryptococcal infection of the vocal folds. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2013 Nov;44(6):1043-6.
8. Nadrous HF, Ryu JH, Lewis JE, Sabri AN. Cryptococcal laryngitis: case report and review of the literature. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2004 Feb;113(2):121-3.
9. Isaacson JE, Frable MA. Cryptococcosis of the larynx. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1996 Jan;114(1):106-9.
10. Kerschner JE, Ridley MB, Greene JN. Laryngeal cryptococcus. Treatment with oral fluconazole. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1995 Oct;121(10):1193-5.
11. Chongkolwatana C, Suwanagool P, Suwanagool S, Thongyai K, Chongvisal S, Methetrirut C. Primary cryptococcal infection of the larynx in a patient with AIDS: a case report. *J Med Assoc Thai*. 1998 Jun;81(6):462-7.

12. McGregor DK, Citron D, Shahab I. Cryptococcal infection of the larynx simulating laryngeal carcinoma. *South Med J*. 2003 Jan;96(1):74-7.
13. Bamba H, Tatemoto K, Inoue M, Uno T, Hisa Y. A case of vocal cord cyst with cryptococcal infection. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005 Jul;133(1):150-2.
14. Gordon DH, Stow NW, Yapa HM, Bova R, Marriott D. Laryngeal cryptococcosis: Clinical presentation and treatment of a rare cause of hoarseness. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009 Mar;142(3 Suppl 1):S7-9.
15. Zeglaoui I, Belcadhi M, Mani R, Sriha B, Bouzouita K. [Laryngeal cryptococcosis revealing AIDS: a case report]. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)*. 2009;130(4-5):307-11.
16. Mittal N, Collignon P, Pham T, Robbie M. Cryptococcal infection of the larynx: case report. *J Laryngol Otol*. 2013 Jul;127 Suppl 2:S54-6.
17. Tamagawa S, Hotomi M, Yuasa J, Tuchihashi S, Yamauchi K, Togawa A, et al. Primary laryngeal cryptococcosis resembling laryngeal carcinoma. *Auris Nasus Larynx*. 2015 Aug;42(4):337-40.
18. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vacari EM, Melo NT. Criptococose. *Tratado de Micologia Médica Lacaz*. 9. ed. São Paulo: Sarvier; 2002. p. 416-40.
19. Perfect JR, Bicanic T. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. *Fungal Genet Biol*. 2015 May;78:49-54.
20. Shibuya K, Hirata A, Omuta J, Sugamata M, Katori S, Saito N, et al. Granuloma and cryptococcosis. *J Infect Chemother*. 2005 Jun;11(3):115-22.
21. Chuck SL, Sande MA. Infections with *Cryptococcus neoformans* in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med*. 1989 Sep 21;321(12):794-9.
22. Reese MC, Colclasure JB. Cryptococcosis of the larynx. *Arch Otolaryngol*. 1975 Nov;101(11):698-701.
23. Smallman LA, Stores OP, Watson MG, Proops DW. Cryptococcosis of the larynx. *J Laryngol Otol*. 1989 Feb;103(2):214-5.



5) CONCLUSÃO

O tabagismo é um fator de risco importante para o desenvolvimento de lesões mais extensas de tuberculose laríngea com maior comprometimento da respiração, da deglutição e do estado nutricional, o que pode favorecer a quadros mais graves de TBL. Sintomas como odinofagia e dispnéia aos esforços, estão associados a uma maior extensão da doença. A presença de lesões em epiglote, em especial as ulceradas, e em pregas ariepiglóticas e região aritenóidea, são responsáveis pela odinofagia, que leva à redução da ingestão alimentar e, conseqüentemente, a perda de peso igual ou superior a 10% nestes pacientes. Estas conclusões estão ilustradas esquematicamente na figura 14.

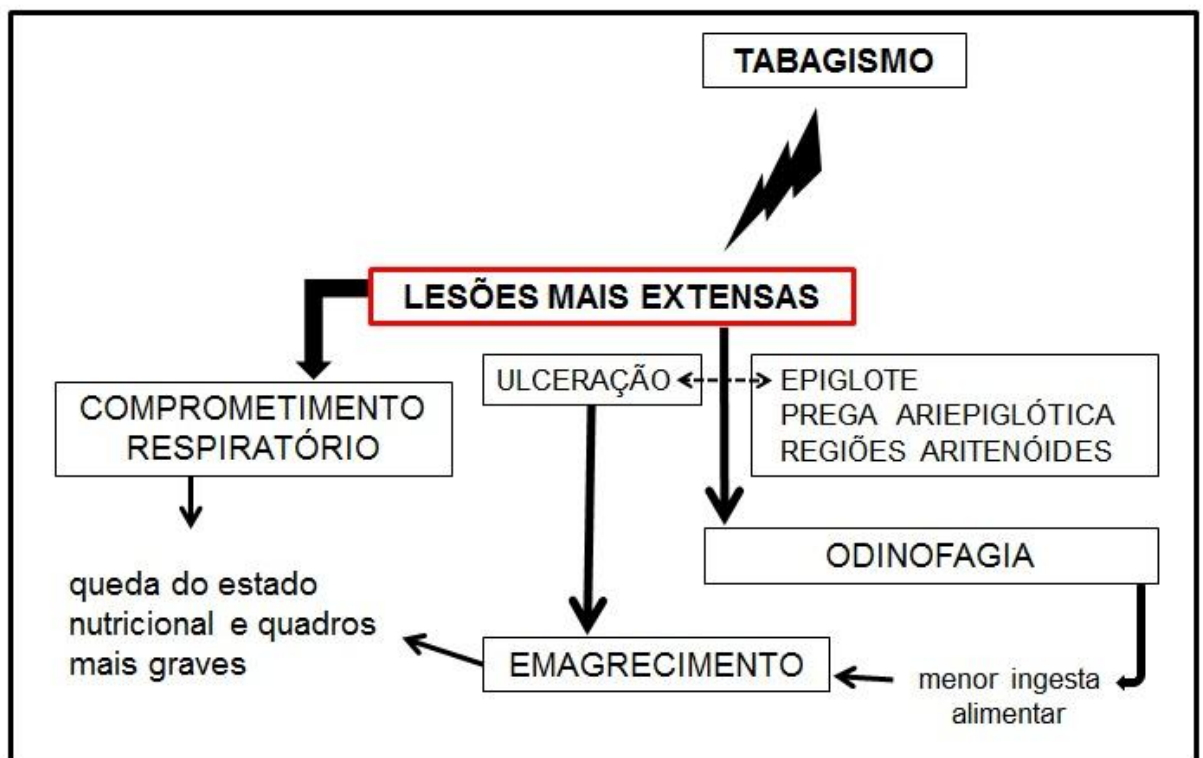


Figura 14- Resumo esquemático das conclusões obtidas a partir das associações presentes entre os fatores clínicos e topográficos na tuberculose laríngea

A disфонia, principal sintoma da tuberculose laríngea, está associada a lesões em pregas vocais, e a um maior tempo de evolução até o diagnóstico, provavelmente por ser subvalorizada pelos pacientes. Após o final do tratamento clínico, este sintoma permanece presente na maioria dos pacientes, sugerindo que sequelas e ajustes vocais decorrentes da doença podem perpetuar o processo, e indicando a necessidade de uma reabilitação destes pacientes.

Mesmo na ausência de sintomas laríngeos, a videolaringoscopia em pacientes com infecções pulmonares pode mostrar lesões que levantem suspeita e auxiliem o diagnóstico de doenças infecciosas, como tuberculose, ou em caso de pacientes imunocomprometidos, como a criptococose.

Apesar das verdadeiras pregas vocais serem o sítio laríngeo mais frequentemente acometido e de lesão granulosa ser o aspecto endoscópico mais frequente, estes sinais não são específicos da TBL. Da mesma forma, a presença de lesão pulmonar em pacientes com lesão laríngea também levanta a suspeita de TBL, mas não a confirma. Sendo assim, para o diagnóstico desta doença, é indispensável a realização de exames complementares.

A positividade da baciloscopia e da cultura do escarro em pacientes com lesão pulmonar não pode ser considerada suficiente para o diagnóstico etiológico da lesão laríngea, pois esta pode ser decorrente da presença de doença pulmonar infecciosa que não necessariamente tem a mesma etiologia da lesão laríngea. Portanto, para confirmar o diagnóstico etiológico de uma lesão infecciosa de laringe e excluir a presença de lesões neoplásicas neste órgão, é necessária a realização de baciloscopia, cultura e exame histopatológico de fragmentos teciduais da referida lesão.

A melhoria da informação para a caracterização de quadros histológicos assim como de identificação dos agentes causais, se existentes, é uma necessidade para o correto e rápido atendimento aos casos de lesões laríngeas a esclarecer.

Os dados apresentados neste trabalho demonstram a necessidade de estudos sistematizados para o esclarecimento de diagnósticos diferenciais em sítios anatômicos de difícil acesso e manipulação, como a laringe. Com o advento de equipamentos e técnicas que facilitam o acesso à laringe, novas informações podem ser obtidas para a melhoria, não só do diagnóstico, mas principalmente do manejo e acompanhamento dos pacientes com TBL.

6) REFERÊNCIAS

1. Brasil. Boletim Epidemiológico- Detectar, tratar e curar: desafios e estratégias brasileiras frente à tuberculose. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde; 2015 [updated 2015; cited 2015]; Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/>.
2. Shin JE, Nam SY, Yoo SJ, Kim SY. Changing trends in clinical manifestations of laryngeal tuberculosis. *Laryngoscope*. 2000 Nov;110(11) :1950-3.
3. WHO. Global Tuberculosis Report. Geneva: World Health Organization; 2014. Report No.: 978 92 4 156480 9 Contract No.: Document Number].
4. Wang CC, Lin CC, Wang CP, Liu SA, Jiang RS. Laryngeal tuberculosis: a review of 26 cases. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007 Oct;137(4) :582-8.
5. Morales Puebla JM, Padilla Parrado M, Diaz Sastre MA, Chacon Martinez J, Galan Morales JT, Lasso Luis MO, et al. [Laryngeal tuberculosis. Incidence between 1994 and 2004]. *An Otorrinolaringol Ibero Am*. 2006;33(6) :591-8.
6. Lim JY, Kim KM, Choi EC, Kim YH, Kim HS, Choi HS. Current clinical propensity of laryngeal tuberculosis: review of 60 cases. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2006 Sep;263(9) :838-42.
7. Gardner EG, D.J; O’Rahilly, R. Anatomia- Estudo regional do Corpo Humano. 4ª edição ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.; 1988. p. 738-40.
8. Carvalho MBd. Tratado de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia. São Paulo: Editora Atheneu; 2001. p. 845-51.
9. Netter FH. Atlas de Anatomia Humana. 5ª edição ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda; 2011. p. 15; 77-9.
10. Sataloff RT, Heman-Ackah YD, Hawkshaw MJ. Clinical anatomy and physiology of the voice. *Otolaryngol Clin North Am*. 2007 Oct;40(5) :909-29, v.
11. Hungria H. Otorrinolaringologia. 8ª edição ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2000. p. 204.
12. Sobotta. Atlas de Anatomia Humana. 19ª edição ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 1993. p. 179.

13. Kierszenbaum AL. Histologia e Biologia Celular- Uma introdução à patologia. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, Ltda; 2004. p. 366-8.
14. Hirano MB, Dm. . Exame videoestroboscópico da laringe. Porto Alegre: Artes Médicas; 1997. p. 37-2.
15. Behlau MF, D; Madazio, G; Brasil, O; Pontes, P; Azevedo, R. Voz: o livro do especialista. Rio de Janeiro: Revinter; 2008. p. 348.
16. John Jacob Ballenger; Snow Jr JB. Ballenger`s Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery. 16th Edition ed. Ontario: B C Decker Inc; 2003. p. 1090-109.
17. Cummings CW. Otolaryngology Head & Neck Surgery. 14th Edition ed: Mosby, Inc; 2005. p. 1963-74.
18. Carvalho MBd. Tratado de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia. São Paulo: Editora Atheneu; 2001. p. 345.
19. Sant'Ambrogio FB, Mathew OP, Clark WD, Sant'Ambrogio G. Laryngeal influences on breathing pattern and posterior cricoarytenoid muscle activity. J Appl Physiol (1985) . 1985 Apr;58(4) :1298-304.
20. Dejonckere PH, Remacle M, Fresnel-Elbaz E, Woisard V, Crevier-Buchman L, Millet B. Differentiated perceptual evaluation of pathological voice quality: reliability and correlations with acoustic measurements. Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord) . 1996;117(3) :219-24.
21. Rizzo PB, Da Mosto MC, Clari M, Scotton PG, Vaglia A, Marchiori C. Laryngeal tuberculosis: an often forgotten diagnosis. Int J Infect Dis. 2003 Jun;7(2) :129-31.
22. Harney M, Hone S, Timon C, Donnelly M. Laryngeal tuberculosis: an important diagnosis. J Laryngol Otol. 2000 Nov;114(11) :878-80.
23. WHO. Tuberculosis. [<http://www.who.int/gho/tb/en/>]: WORLD HEALTH ORGANIZATION; 2015 [updated 2015; cited 2015 15/03/2015]; Available from: <http://www.who.int/gho/tb/en/>
24. Brasil. Portal Brasil. [www.brasil.gov.br/saude]: Ministério da Saúde; 2014 [updated 2014; cited 23/03/2014]; Available from: www.brasil.gov.br/saude.

25. Brasil. Boletim epidemiológico- O controle da tuberculose no Brasil: avanços, inovações e desafios. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde; 2014 [updated 2014; cited 2014]; Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/>.
26. Brasil. Manual de Recomendações para Controle da Tuberculose no Brasil. Ministério da Saúde; 2011 [updated 2011; cited 11/15/2014]; Available from: bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_controlo_tuberculose.pdf.
27. WHO. Global Tuberculosis Report. Geneva: World Health Organization; 2012 Contract No.: Document Number].
28. Porrás Alonso E, Martín Mateos A, Pérez-Requena J, Avalos Serrano E. Laryngeal tuberculosis. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)* . 2002;123(1) :47-8.
29. Nalini B, Vinayak S. Tuberculosis in ear, nose, and throat practice: its presentation and diagnosis. *Am J Otolaryngol*. 2006 Jan-Feb;27(1) :39-45.
30. Topak M, Oysu C, Yelken K, Sahin-Yilmaz A, Kulekci M. Laryngeal involvement in patients with active pulmonary tuberculosis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2008 Mar;265(3) :327-30.
31. Ricciardiello F, Martufi S, Cardone M, Cavaliere M, D'Errico P, Iengo M. Otorhinolaryngology-related tuberculosis. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2006 Feb;26(1) :38-42.
32. Levenson MJ, Ingerman M, Grimes C, Robbett WF. Laryngeal tuberculosis: review of twenty cases. *Laryngoscope*. 1984 Aug;94(8) :1094-7.
33. Ramadan HH, Tarazi AE, Baroudy FM. Laryngeal tuberculosis: presentation of 16 cases and review of the literature. *J Otolaryngol*. 1993 Feb;22(1) :39-41.
34. WHO. Tuberculosis. [\[http://www.who.int/tb/publications/definitions_faq/en/#laryngeal.\]](http://www.who.int/tb/publications/definitions_faq/en/#laryngeal); World Health Organization; 2015 [updated 2015; cited 2015 11/08/2015]; Available from: http://www.who.int/tb/publications/definitions_faq/en/#laryngeal.
35. Bailey CM, Windle-Taylor PC. Tuberculous laryngitis: a series of 37 patients. *Laryngoscope*. 1981 Jan;91(1) :93-100.

36. Gandhi S, Kulkarni S, Mishra P, Thekedar P. Tuberculosis of larynx revisited: a report on clinical characteristics in 10 cases. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2012 Sep;64(3) :244-7.
37. Galietti F, Giorgis GE, Gandolfi G, Astesiano A, Miravalle C, Ardizzi A, et al. Examination of 41 cases of laryngeal tuberculosis observed between 1975-1985. *Eur Respir J.* 1989 Sep;2(8) :731-2.
38. Bhat VK, Latha P, Upadhya D, Hegde J. Clinicopathological review of tubercular laryngitis in 32 cases of pulmonary Kochs. *Am J Otolaryngol.* 2009 Sep-Oct;30(5) :327-30.
39. Soda A, Rubio H, Salazar M, Ganem J, Berlanga D, Sanchez A. Tuberculosis of the larynx: clinical aspects in 19 patients. *Laryngoscope.* 1989 Nov;99(11) :1147-50.
40. Ling L, Zhou SH, Wang SQ. Changing trends in the clinical features of laryngeal tuberculosis: a report of 19 cases. *Int J Infect Dis.* 2010 Mar;14(3) :e230-5.
41. Kandiloros DC, Nikolopoulos TP, Ferekidis EA, Tsangaroulakis A, Yiotakis JE, Davilis D, et al. Laryngeal tuberculosis at the end of the 20th century. *J Laryngol Otol.* 1997 Jul;111(7) :619-21.
42. Hunter AM, Millar JW, Wightman AJ, Horne NW. The changing pattern of laryngeal tuberculosis. *J Laryngol Otol.* 1981 Apr;95(4) :393-8.
43. Nishiike S, Irifune M, Doi K, Sawada T, Kubo T. Laryngeal tuberculosis: a report of 15 cases. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2002 Oct;111(10) :916-8.
44. Hasibi M, Yazdani N, Asadollahi M, Sharafi M, Dehghan Manshadi SA. Clinical features of laryngeal tuberculosis in Iran. *Acta Med Iran.* 2013 Sep;51(9) :638-41.
45. Prasad KC, Sreedharan S, Chakravarthy Y, Prasad SC. Tuberculosis in the head and neck: experience in India. *J Laryngol Otol.* 2007 Oct;121(10) :979-85.
46. Khan NU, Wallis S, Siddiqui N. Laryngeal tuberculosis: a diagnosis not to be missed. *BMJ Case Rep.* 2009;2009.
47. Vidal R, Mayordomo C, Miravittles M, Marti S, Torrella M, Lorente J. [Pulmonary and laryngeal tuberculosis. Study of 26 patients]. *Rev Clin Esp.* 1996 Jun;196(6) :378-80.

48. Ruas AC, Rolla VC, de Araujo-Melo MH, Moreira JS, Valete-Rosalino CM. Vocal quality of patients treated for laryngeal tuberculosis, before and after speech therapy. *J Laryngol Otol.* 2010 Nov;124(11) :1153-7.
49. Ministério da Saúde SdVeS. Boletim epidemiológico. Brasília: Núcleo de Comunicação/SVS; 2014.
50. Brasil. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. Ministério da Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica; 2008 [updated 2008; cited 2014]; Available from: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_laboratorial_tuberculose.pdf.
51. Ministério da Saúde SdVeS, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2011.
52. Brasil. Recomendações sobre o diagnóstico da tuberculose por meio do teste rápido molecular para tuberculose: nota informativa nº 9. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Tuberculose; 2014 [updated 2014; cited 2015]; Available from: <http://www.riocomsaude.rj.gov.br/Publico/MostrarArquivo.aspx?C=9kRN1f7RwZw%3D>.
53. Sa LC, Meirelles RC, Atherino CC, Fernandes JR, Ferraz FR. Laryngo-pharyngeal Tuberculosis. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2007 Nov-Dec;73(6) :862-6.
54. Rupa V, Bhanu TS. Laryngeal tuberculosis in the eighties--an Indian experience. *J Laryngol Otol.* 1989 Sep;103(9) :864-8.
55. Silva L, Damrose E, Bairo F, Nina ML, Junior JC, Costa HO. Infectious granulomatous laryngitis: a retrospective study of 24 cases. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2008 Jun;265(6) :675-80.
56. WHO. Automated realtime nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children: policy update. Geneva: World Health Organization; 2013. Report No.: 978 92 4 150633 5 Contract No.: Document Number].

57. Loehrl TA, Smith TL. Inflammatory and granulomatous lesions of the larynx and pharynx. *Am J Med.* 2001 Dec 3;111 Suppl 8A:113S-7S.
58. Couldery AD. Tuberculosis of the upper respiratory tract misdiagnosed as Wegener's granulomatosis--an important distinction. *J Laryngol Otol.* 1990 Mar;104(3) :255-8.
59. El-Kettani NECEH, M.R; Chakir, N; Jiddane, M. Primary laryngeal tuberculosis mimicking laryngeal carcinoma: CT scan features. *Indian J Radiol Imaging.* 2010;20(1) :11,2.
60. McGregor DK, Citron D, Shahab I. Cryptococcal infection of the larynx simulating laryngeal carcinoma. *South Med J.* 2003 Jan;96(1) :74-7.
61. Agarwal P, Bais AS. A clinical and videostroboscopic evaluation of laryngeal tuberculosis. *J Laryngol Otol.* 1998 Jan;112(1) :45-8.