

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:
Infectologia e Medicina Tropical

Theodora Maria de Paiva dos Santos

**AVALIAÇÃO DA DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO EM LESÕES DE
PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

Belo Horizonte

2023

Theodora Maria de Paiva dos Santos

**AVALIAÇÃO DA DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO EM LESÕES DE
PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Walderez Ornelas Dutra

Coorientadora: Dra. Carolina Cattoni Koh

Belo Horizonte

2023

Santos, Theodora Maria de Paiva dos.
SA237a Avaliação da deposição de colágeno em lesões de pacientes com
Leishmaniose Tegumentar Americana [recursos eletrônicos]. / Theodora
Maria de Paiva dos Santos. - - Belo Horizonte: 2023.

52f.: il.

Formato: PDF.

Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Walderez Ornelas Dutra.

Coorientador (a): Carolina Cattoni Koh.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Medicina.

1. Leishmaniose. 2. Colágeno. 3. Inflamação. 4. Dissertação Acadêmica.
I. Dutra, Walderez Ornelas. II. Koh, Carolina Cattoni. III. Universidade Federal
de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WR 350

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

FOLHA DE APROVAÇÃO
**"AVALIAÇÃO DA DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO EM LESÕES DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR AMERICANA"**

THEODORA MARIA DE PAIVA DOS SANTOS

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 28 de março de 2023, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL, da Universidade Federal de Minas Gerais, constituída pelos seguintes professores:

PROFA. DANIELA RODRIGUES DE FÁRIA BARBOSA

UNIFOR

PROFA. REYSLA MARIA DA SILVEIRA MARIANO

UFMG

PROFA. CAROLINA CATTONI KOH – Coorientadora

UFMG

PROFA. WALDEREZ ORNELAS DUTRA - Orientadora

UFMG

Belo Horizonte, 28 de março de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Reysla Maria da Silveira Mariano, Usuária Externa**, em 28/03/2023, às 11:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carolina Cattoni Koh, Professora Magistério Superior - Voluntária**, em 28/03/2023, às 11:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Walderez Ornelas Dutra, Professora do Magistério Superior**, em 28/03/2023, às 11:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniela Rodrigues de Faria Barbosa, Usuária Externa**, em 28/03/2023, às 11:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2158006** e o código CRC **AAA6E75C**.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo seu imenso amor e cuidado, por realizar os desejos do meu coração mediante a sua vontade e me fazer viver cercada pela sua graça.

Aos meus pais, **Carlos Alberto e Diana Cláudia**, pelo apoio incalculável, obrigada por acreditarem no meu sonho, sem vocês nada disso seria possível. Aqui também externo meus agradecimentos a minha amada avó **Edméa Menezes** e a minha melhor amiga, minha irmã **Edméa Maria**, amo vocês quatro imensamente e sinto saudades todos os dias.

A minha orientadora incrível, **Walderez Dutra**, que carinhosamente chamo de Wal, obrigada por essa oportunidade única de viver a pesquisa, ver as coisas darem errado e tentar de novo até acertar, jamais me esquecerei de todos os ensinamentos obtidos dentro e fora do laboratório, é uma honra ser sua aluna.

A minha coorientadora **Carolina Koh**, por ser o meu braço direito e ouvir minhas teorias que nem sempre fizeram muito sentido, obrigada Carol, por me desafiar constantemente e exigir mais de mim em cada apresentação, você é brilhante no que faz.

Aos meus amigos do laboratório, que choraram comigo e fizeram esse trabalho acontecer, sou muito grata por toda a ajuda recebida de **Thaiany Goulart, Eula Neves e Pedro Lucinda**.

Aos colaboradores desse projeto, pelo trabalho e concessão de insumos para realizar esta pesquisa, obrigada a toda a equipe.

Aos meus amigos que me fizeram ingressar na ciência e me deram suporte durante todos esses anos de convivência, vocês estão comigo desde a iniciação científica, e por isso hoje celebro mais essa conquista com **Ana Flávia, Anny Maíza, Pauline Soldera e Breno Mota**.

A minha família adotiva em Belo Horizonte, que me acolheu como filha, meus mais sinceros agradecimentos, que Deus abençoe vocês, **Euzenclévis Júnior, Jaqueline Ferreira, Rayanne Ferreira e Raphaela Ferreira**.

A minha amada igreja, **Assembleia de Deus – AD Central**, em especial a toda juventude, onde fiz tantos amigos e compartilhei momentos inesquecíveis.

*“Como não entoar teu louvor?
Como deixar de proclamar teu amor tão singular?
Como não te exaltar, meu Senhor?
Se existe no meu coração
A canção de eterna gratidão.”*

Como não entoar teu louvor- ICM

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença parasitária, não contagiosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania*. A transmissão ocorre quando as fêmeas de flebotomíneos, infectadas pelo parasita, realizam a hematofagia em um indivíduo susceptível, regurgitando parasitos na derme. Em seguida, as leishmanias infectam células do sistema fagocítico mononuclear, onde se multiplicam causando a ativação da resposta imune. Estes processos levam à morte do parasito, mas também, se não controlados, levam à destruição celular e da matriz extracelular (MEC). Desse modo surgem as lesões que caracterizam as manifestações clínicas da doença. A forma clínica mais frequente, no Brasil, é a cutânea localizada (LC), caracterizada por uma lesão única, ulcerada e resposta terapêutica relativamente boa. Outra forma de interesse epidemiológico é a manifestação mucosa (LM), responsável por lesões destrutivas, refratárias ao tratamento e que, comumente, associa-se a recidivas. Essas manifestações clínicas são claramente distintas, entretanto, a resposta imune desencadeada nos tecidos de pacientes com LC e LM possui muitas características em comum, bem como o critério de cura estar associado à cicatrização das lesões. Considerando-se as características clínicas, imunológicas e patológicas de LC e LM, propusemo-nos a avaliar se a deposição do colágeno e sua associação a parâmetros imunológicos é distinta na LC e na LM. Para isso, foram coletadas as biópsias de 16 pacientes com LTA, sendo 9 com LC e 7 com LM causadas por *Leishmania braziliensis*, provenientes da área endêmica de Corte de Pedra, BA. Para visualizar e quantificar a área total de colágeno foram utilizadas as colorações de Tricrômico de Masson e *Picrosirius Red*. Os parâmetros imunológicos foram obtidos de estudos anteriores de nosso grupo, nas mesmas lesões aqui analisadas. Nossos dados mostraram que existe aumento significativo na área ocupada por deposição de colágeno nas lesões de pacientes com LC comparando-se a LM. Avaliando-se a associação entre a deposição de colágeno e a frequência das subpopulações de células CD4+, CD8+, CD68+, ou das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10, não foram observadas correlações significativas. No entanto, observou-se uma correlação negativa entre a expressão de colágeno e a frequência de células CD8+ expressando a molécula citotóxica granzima A, indicando que quanto maior a área ocupada por colágeno, menor a frequência de células CD8+granzima A+. A análise de componentes principais e de mapa de calor, mostraram que as análises que levam em consideração a medida da área total de colágeno estratificam as formas LC e LM com maior precisão, demonstrando que a deposição de colágeno é um importante fator na diferenciação histopatológica entre LC e LM, e sugerindo que a maior deposição de colágeno se associa à forma mais branda da LTA. Compreender os mecanismos associados à deposição de colágeno poderá abrir novas estratégias para melhorar a cicatrização e cura das lesões da LTA.

Palavras-chave: leishmaniose; colágeno; inflamação.

ABSTRACT

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is a non-contagious parasitic disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*. Transmission occurs when female sandflies, infected by the parasite, perform hematophagy on a susceptible individual, regurgitating parasites into the dermis. *Leishmania* then infect cells of the mononuclear phagocytic system, where they multiply causing activation of the immune response. These processes lead to the death of the parasite but also, if not controlled, to cell and extracellular matrix (ECM) destruction, thus resulting in the lesions that characterize the clinical manifestations of the disease. The most frequent clinical form in Brazil is the localized cutaneous (LC), characterized by a single, ulcerated lesion with relatively good therapeutic response. Another form of epidemiological interest is the mucosal manifestation (ML), responsible for destructive lesions, refractory to treatment, commonly associated with relapses. These clinical manifestations are clearly distinct, however the immune response triggered in the tissues of patients with CL and ML share many common characteristics, as well as the criterion of healing being associated with lesion scarring. Considering the clinical, immunological and pathological characteristics of LC and LM, we set out to assess whether collagen deposition and its association with immunological parameters is distinct in the different clinical forms of ATL. For this, biopsies of 16 patients with ACL were collected, 9 with LC and 7 with LM. To quantify the total collagen area, Masson's Trichrome and Picrosirius Red stains were used. The immunological parameters were obtained from previous studies by our group, in the same lesions analyzed here. Our data showed that there is a significant increase in the area occupied by collagen deposition in the lesions of patients with CL compared to LM. Evaluating the association between collagen deposition and the frequency of subpopulations of CD4+, CD8+, CD68+ cells, or cytokines TNF- α , IFN- γ , IL-10, no significant correlations were observed. However, a negative correlation was observed between collagen expression and the frequency of CD8+ cells expressing the cytotoxic molecule granzyme A, indicating that the greater the area occupied by collagen, the lower the frequency of CD8+granzyme A+ cells. The analysis of principal components and the heat map showed that the analyzes that take into account the measurement of the total area of collagen stratify the LC and LM forms with greater precision, demonstrating that collagen deposition is an important factor in the histopathological differentiation between LC and LM and suggesting that greater collagen deposition is associated with the milder form of ATL. Understanding the mechanisms associated with collagen deposition could open up new strategies to improve healing of ATL lesions.

Keywords: leishmaniasis; collagen; inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagem ilustrativa do processo de cicatrização na LTA.....	21
Figura 2: Avaliação da deposição de colágeno por microscopia de luz e coloração Tricrômico de Masson e Picrosírius Red em cortes histológicos representativos das lesões de pacientes com leishmaniose tegumentar americana	31
Figura 3: Avaliação da área total de colágeno através da quantificação de colágeno por área de colágeno dos pacientes com as formas clínicas cutânea e mucosa	32
Figura 4: Avaliação das células presentes nas lesões de pacientes com leishmaniose	32
Figura 5: Correlações entre a área de colágeno e subpopulações celulares CD4+, CD8+ e CD68+ presente nas lesões de pacientes de diferentes formas clínicas.....	33
Figura 6: Correlações entre a área de colágeno, citocinas e granzima A presente nas lesões de pacientes de diferentes formas clínicas.	34
Figura 7: Correlações entre a área de colágeno e subpopulações celulares CD4+, CD8+ e CD68+ presente nas lesões de pacientes com a forma clínica cutânea	35
Figura 8: Correlações entre a área de colágeno e subpopulações celulares CD4+, CD8+ e CD68+ presente nas lesões de pacientes com a forma clínica mucosa	35
Figura 9: Correlações entre a área de colágeno, citocinas e granzima A presente nas lesões de pacientes com a forma clínica cutânea	36
Figura 10: Correlações entre a área de colágeno, citocinas e granzima A presente nas lesões de pacientes com a forma clínica mucosa	36

Figura 11: Gráficos representativos da análise multivariada de PCA e Heatmap hierarquizado entre a área de colágeno, subpopulações celulares, citocinas, granzima A e os grupos LC e LM38

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: Grau Celsius

±: Desvio padrão

CCL3: Quimiocina

CCL4: Quimiocina

CD4+: Células T CD4+

CD8+: Células T CD8+

CD68+: Células T CD68+

DAPI: *-4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride*

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína

GP63: Glicoproteína de 63 kDa

GrA: Granzima A

IFN- γ : Interferon gama

IL-8: Interleucina 8

IL-10: Interleucina 10

IL-5: Interleucina 5

IL-13: Interleucina 13

Km: quilômetro

mm²: milímetro quadrado

μ m: micrômetro

OCT: "optimum cutting temperature" Temperatura ótima de corte

PBS: Tampão salina-fosfato

PCA: Análise de componentes principais

PE: Ficoeritrina

TGF β : Fator de transformação do crescimento beta

Th1: Linfócito T "helper" (auxiliar) 1

Th2: Linfócito T "helper" (auxiliar) 2

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	13
1.1 Leishmanioses: aspectos gerais.....	13
1.2 Manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar americana (LTA)	15
1.3 Resposta imune na leishmaniose cutânea e mucosa: inflamação e cicatrização.....	17
2. OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo Geral	25
2.2 Objetivos Específicos:	25
3. METODOLOGIA	26
3.1 Obtenção das biópsias de lesões de pacientes com leishmaniose.....	26
3.2 Processamento e marcação nas lesões de leishmaniose.....	26
3.3 Coloração por Tricrômico de Masson e <i>Picrosirius red</i> e obtenção das imagens	27
3.4 Análise das Imagens	28
3.5 Análise Estatística.....	28
4. RESULTADOS.....	30
4.1 Análise da área de colágeno do infiltrado inflamatório das lesões.	30
4.2 Correlação de subpopulações celulares, citocinas e molécula citotóxica com a deposição de colágeno	33
5. DISCUSSÃO.....	39
6. CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 Leishmanioses: aspectos gerais

As leishmanioses representam um complexo de doenças parasitárias que acometem populações distintas há muitos séculos. O seu surgimento é incerto devido a diferentes nomenclaturas utilizadas antigamente para se referir às enfermidades dermatológicas amplamente distribuídas em diferentes continentes. A produção de conhecimento acerca dessas patologias, propiciou a descoberta dos protozoários envolvidos na patogênese e o agrupamento dessas manifestações clínicas, que a partir do século XX foram reconhecidas como leishmanioses (STEVERDING., 2017).

Com muitos estudos, percebeu-se que as manifestações dermatológicas eram muito mais frequentes nas Américas e havia diversos agentes etiológicos envolvidos na patogênese, sendo denominada leishmaniose tegumentar americana (LTA). Portanto, essa doença ficou caracterizada pela presença de uma ou múltiplas úlceras, com ou sem comprometimento das mucosas em pacientes que estavam infectados com protozoários do gênero *Leishmania*. Enquanto a Leishmaniose Visceral (LV), mais prevalente do velho mundo, foi definida pelos distúrbios viscerais decorrentes do parasitismo por *Leishmania sp.* (STEVERDING, 2017; SCOTT; NOVAIS, 2014).

A origem dos parasitos desse gênero é muito antiga, e existem três teorias sobre o surgimento das leishmanias no mundo. A primeira é a hipótese Paleártica, que se baseia na descoberta de fósseis conservados há mais de 100 mil anos que continham mosquitos infectados com o parasita e, devido à localização desses achados, sugerem que esses protozoários vêm de uma região composta pela Europa, Ásia e o norte da África, (POINAR 2004).

Prosseguindo os estudos, Lainson e Shaw em 1987 já acreditavam que a origem desses parasitos era neotropical. Esse argumento, a segunda hipótese, foi sustentado pela diversidade de espécies do novo mundo em comparação com o velho (LAINSON; SHAW, 1987). Então, no ano 2000, uma terceira hipótese foi formulada baseando-se nos conceitos anteriores. Mommen e Cupolillo decidiram classificar as leishmanias por subgênero, e analisando as similaridades das espécies com a relação de desenvolvimento nos vetores em continentes específicos, os autores concluíram que subgêneros *Leishmania* e

Sauroleishmania tem procedência africana e o subgênero *Viannia* desenvolveu-se nas regiões das Américas, especialmente na América do Sul (MOMMEN; CUPOLILLO. 2009). Dentre esses subgêneros já foram descritas 53 espécies, e acredita-se que cerca de 20 dessas são responsáveis por causar doenças em humanos (CABRAL et al., 2021; CANTANHÊDE et al., 2021; RIOS et al., 2022).

As leishmanias possuem dois principais estágios evolutivos: as formas flageladas, denominadas promastigotas, e as aflageladas, chamadas de amastigotas. As promastigotas, possuem aspecto fusiforme e são responsáveis por infectar tanto o hospedeiro invertebrado (vetor) como hospedeiro vertebrado. Podem ser encontradas em diferentes insetos vetores do gênero *Lutzomyia* ou *Phlebotomus* sendo conhecidos como flebotomíneos (VOLPEDO et al., 2021).

As amastigotas são as formas ovaladas, com motilidade reduzida, responsáveis por causar a sintomatologia das leishmanioses através da replicação parasitária no interior de células do sistema fagocítico mononuclear de hospedeiros vertebrados como cães, gatos, humanos, cavalos, roedores e mamíferos selvagens (SOUZA et al., 2019; VOLPEDO et al., 2021).

A variedade de vetores e reservatórios susceptíveis à infecção por *Leishmania* é um dos fatores de grande importância a nível de saúde pública mundial, pois colabora com a perpetuação dessas espécies causadoras de doenças. A infecção dos flebotomíneos ocorre quando as fêmeas necessitam realizar o repasto sanguíneo para maturar seus ovócitos e ingerem, de um hospedeiro vertebrado infectado, macrófagos parasitados com as formas amastigotas. Essas amastigotas ao adentrarem no organismo do inseto, se modificam e passam a ser chamadas de promastigotas procíclicas. Elas migram para a o intestino, aderem ao epitélio intestinal e começam a multiplicar-se por divisão binária. Para que essas promastigotas consigam parasitar novas células, elas retornam para o esôfago desses insetos na forma metacíclica sendo liberadas durante o próximo repasto sanguíneo juntamente com a saliva quando o flebotomíneo inocula a proboscídea em um vertebrado (KILLICK-KENDRICK, 1990).

Após a inoculação das formas promastigotas metacíclicas no hospedeiro vertebrado, os parasitos se dispersam no tecido do hospedeiro e serão fagocitadas por células polimorfonucleares, os neutrófilos, e pelos macrófagos. No interior dessas células, os parasitas se diferenciam na forma amastigota e se

multiplicarão por divisão binária até que haja a ruptura da membrana, prejudicando a integridade celular, liberando assim muitas amastigotas para o tecido, e serão novamente fagocitadas por novas células (RITTIG; BOGDAN, 2000). A internalização de amastigotas ocorre por mecanismos diversos que ainda não são completamente conhecidos, entretanto, estudos sugerem que a ligação de anticorpos naturais de *Leishmania* com o receptor CR3 dos macrófagos contribui com a fagocitose (MOSSER; ELDESON, 1985). Esses parasitos possuem um rico glicocálice formado principalmente por moléculas ancoradas por glicosilfosfatidinositol (GPI), como a protease GP63, responsável pela virulência do parasito, pelo auxílio no processo de parasitismo e pela contribuição com a degradação de imunoglobulinas e proteínas. Como consequência, esses protozoários danificam e destroem os tecidos infectados, causando lesões que caracterizam as primeiras manifestações clínicas da leishmaniose (ANVERSA et al., 2018).

1.2 Manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar americana (LTA)

Aproximadamente 95% dos novos casos de LTA ocorrem nas Américas e, dentre os países com maior número de casos, está o Brasil. De acordo com o Sistema de Notificação e Agravos (SINAN), em 2020, o país registrou 17.772 novos casos de LTA, sendo 95% (n=16.887) apenas da forma clínica cutânea e os 5% restantes (n=854) manifestação mucocutânea. Dos estados com maior frequência da doença, destaca-se o Pará, com 3.084 casos, seguido de Mato Grosso, com 2.117 e Minas Gerais, que notificou 2.091 casos (BRASIL 2020; MANN et al., 2021). A ausência do registro de outras formas (difusa, disseminada ou atípicas), pode refletir uma subnotificação dos casos.

As manifestações clínicas da LTA são caracterizadas por alterações dermatológicas que comprometem a integridade tecidual. No Brasil, sete espécies podem desencadear essas enfermidades, sendo que as três principais são: *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. As formas clínicas são distintas de acordo com a localização, número ou aparência das lesões (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

As lesões cutâneas clássicas são caracterizadas por úlceras com aspecto inflamatório, expostas em membros de fácil acesso aos flebotomíneos. Devido à diversidade de feridas dérmicas, as formas cutâneas são subclassificadas em: lesões cutâneas localizadas, disseminadas e difusas (SCORZA et al., 2017). Na forma localizada, os indivíduos possuem uma lesão única na maioria dos casos. Essas feridas costumam ser ulceradas, com bordas elevadas, fundo granuloso, hiperemiado e, caso haja associação de infecção secundária por bactérias, é possível observar exsudação. Essa manifestação é a mais frequente e corresponde a aproximadamente 90% dos casos confirmados e, embora cada vez isso seja mais infrequente, podem evoluir para cura espontânea (LESSA et al., 2007; GIMBLET et al., 2017).

Já na forma cutânea disseminada são observadas múltiplas lesões que podem comprometer membros superiores, inferiores, tronco e face (CARVALHO et al., 1994). A morfologia dérmica é acneiforme, inflamatória e a expansão deriva de lesões localizadas primárias. Para isso, o parasito migra através da via hemática ou linfática e o quadro clínico do paciente apresenta uma piora significativa além do surgimento de novas lesões, podendo chegar a centenas. As lesões disseminadas constituem uma forma rara da doença, atingindo cerca de 2% da população infectada (MACHADO et al., 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A forma mais rara é a difusa e, no Brasil, é causada apenas pela *L. amazonensis*. A gravidade desta forma está relacionada à baixa competência imunológica do hospedeiro, e, portanto, seu desenvolvimento é mais frequente em pacientes anérgicos (SAMPAIO et al., 2021). Inicialmente, os infectados apresentam uma lesão primária de difícil tratamento, seguido de múltiplas lesões polimórficas que não cicatrizam (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A forma mucosa possui manifestações destrutivas, deixando um aspecto de mutilação principalmente pelo comprometimento da mucosa nasal, faringe, laringe. A forma mucosa desenvolve-se, comumente, após anos da cura da forma cutânea. Além dessa, pode surgir em alguns pacientes, manifestações concomitantes das formas cutâneas e mucosas, sendo assim classificada como forma mucocutânea (LESSA et al., 2007).

O que define a evolução da doença nos indivíduos infectados é a espécie envolvida, as condições do hospedeiro e a resposta imune. Contudo, estas

variáveis ainda não foram completamente elucidadas, o que torna difícil compreender em sua totalidade as condições de reprodução parasitária, risco de infecção e disseminação além das manifestações clínicas das leishmanioses (SOUZA et al., 2019; GOLLOB et al., 2014).

O tratamento mais utilizado para tratar a LTA é o antimonial pentavalente (Glucantime®) que é administrado por via parenteral durante 20 a 30 dias. Por ser uma medicação utilizada há mais de 50 anos, já é observada resistência terapêutica (SALARI et al., 2022). Além disso, existem fortes contraindicações devido aos eventos adversos graves como nefrotoxicidade, pancreatite, arritmias entre outros. Portanto, em casos refratários e/ou não responsivos, o ministério da saúde indica a utilização de Anfotericina B, Anfotericina B Lipossomal ou Isetionato de Pentamidina. O tratamento longo é uma das principais causas da não adesão a terapia, que além dos eventos adversos, tem como malefício a não cura parasitológica e sim a reepitelização da lesão, fator este que contribui para os casos de recidiva (ALMEIDA et al., 2005; BRASIL, 2017).

Atualmente com o avanço da descoberta de novas terapias para o tratamento da doença, também é preconizado pelo ministério da saúde o uso de antimonial pentavalente associado a pentoxifilina em pacientes refratários à terapêutica convencional (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Estudos feitos por nosso grupo, avaliaram a eficácia dessa associação e demonstraram que há redução da frequência de células CD68+TNF-alfa+ no infiltrado inflamatório da lesão. Acredita-se que essa diminuição promove uma resposta imune modulada o que interfere positivamente na cura da doença (FARIA et al., 2019).

1.3 Resposta imune na leishmaniose cutânea e mucosa: inflamação e cicatrização

A resposta imune do hospedeiro é um dos fatores preponderantes no desenvolvimento das formas cutânea e mucosa da leishmaniose. Embora as duas formas estejam associadas com uma resposta imune inflamatória, há características que são peculiares de cada uma delas. Estudos comparando a resposta imune entre essas formas identificou que pacientes com LM respondem três vezes mais ao estímulo com antígeno de *Leishmania* do que os LC, além disso, os pacientes com LM apresentam uma resposta linfoproliferativa

aumentada, e essa resposta pode estar relacionada com a longa duração da doença nesses indivíduos infectados (CARVALHO et al., 1985)

Bacellar e colaboradores, em 2002, demonstraram que, avaliando células mononucleares de sangue periférico (CMSP), pacientes com a forma mucosa da doença apresentaram uma produção maior de IFN- γ e TNF- α quando comparado à pacientes cutâneos. De forma interessante, observaram que a produção de IL-10 estava diminuída nos LM quando comparado aos LC. Nesse contexto, os linfócitos Th1 CD4⁺ foram os principais produtores de IFN- γ e TNF- α em pacientes mucosos. Embora esses achados foram em amostras de CMSP, é possível que sejam observados e/ou refletidos na patogenia da doença, uma vez que as lesões desses pacientes são expansivas e ulceradas, mas possuembaixa parasitemia (BACELLAR et al., 2002; CARVALHO et al., 1985).

Linfócitos Th1 CD4⁺ e CD4-CD8⁻ são as principais células envolvidas na produção de citocinas inflamatórias no sangue periférico de pacientes com leishmaniose (BOTTREL et al., 2001; GOLLOB et al., 2008). Nos pacientes com a forma mucosa, além de muito mais expressas, há uma redução nos níveis de IL-10 e TGF β , citocinas que modulam a resposta imune (CAMPOS et al., 2018). Logo, é possível afirmar que um desbalanço do recrutamento e funcionalidade de células T, pode contribuir com a presença de lesões mais expansivas e altamente inflamadas (BACELLAR et al., 2002). Apesar de pacientes com LC apresentarem o mesmo perfil Th1, eles apresentam um aumento de IFN- γ e IL-10, isso sugere que o balanço da produção de citocinas inflamatórias e moduladoras é responsável por eliminar o parasito precocemente, e estabelecer um controle contra a resposta imune excessiva de forma mais eficaz, resultando em uma forma clínica mais branda (ANTONELLI et al., 2004).

Em contrapartida, a expressão de citocinas modulatórias como IL-4, estimuladas pela resposta Th2, apesar de importantes para a reconstrução e diminuição do dano tecidual, contribuem com o aumento da carga parasitária e reduzem a eficácia do antimonial, visto que foi observada uma maior frequência de IL-4 nos pacientes que responderam mal à terapia (MANAMPERI et al., 2017)

Considerando-se o aspecto morfológico das lesões, as cutâneas estão associadas a presença de CD4⁺ expressando IFN- γ , a necrose é relacionada a expressão de IL-1 β e células B, e o aumento de amastigotas tem correlação positiva com células CD8⁺ (SALDANHA et al., 2020).

Em pacientes com LM, a severidade das lesões está correlacionada com o aumento de IFN- γ e TNF- α produzidos por células T, além da diminuição da expressão do receptor para IL-10 (BACELLAR et al., 2002; DA-CRUZ et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2014). Estudos demonstram que a presença de granzimaA, produzida por células CD8+, que são citotóxicas, é abundante nessas lesões, indicando que as citocinas pró-inflamatórias e moléculas citotóxicas cooperam com a destruição do tegumento (FARIA et al., 2009; FARIA et al., 2019; KOH et al., 2020).

O sistema tegumentar é composto por três camadas: epiderme, derme e hipoderme. Dentro desse sistema, encontra-se a pele, que é formada pelo conjunto das duas camadas mais superficiais do tegumento (epiderme e derme). A principal função desse órgão é manter a homeostase e impedir disfunções teciduais relacionadas ao ambiente interno e externo. (MURPHREE, 2017).

O tecido da pele é formado por células residentes, células recrutadas em caso de inflamação e pela matriz extracelular (MEC). A MEC é uma estrutura complexa que preenche o espaço entre as células nos tecidos. É composta por proteínas, carboidratos complexos e outras moléculas, que formam uma rede tridimensional que fornece suporte estrutural e contribui para a organização e função dos tecidos. Além disso, é responsável por regular processos como diferenciação, migração, crescimento e sobrevivência dos diferentes tipos de células que compõem o tecido (HYNES; NABA, 2012). Um dos fatores que comprometem a sua homeostase é dano tecidual, que é caracterizado por um rompimento ou perda de integridade da MEC, podendo ser de causa multifatorial como traumas, isquemia, doenças autoimunes, contato com substância tóxica e infecções por diferentes patógenos, incluindo as *Leishmanias*, resultando em morte celular principalmente de células residentes. Nesse sentido, a necrose tecidual gera a inflamação, e fatores pró-inflamatórios são liberados por células com o objetivo de reconstruir a matriz, reparando o dano tecidual (THEOCHARIS et al., 2016; MACK 2018).

A cicatriz é o resultado de quatro fases diferentes com durabilidade variável, a ordem desses acontecimentos é: hemostasia, inflamação, reparo e remodelação. A hemostasia ocorre com a ligação plaquetária à matriz recém lesionada que estimula as plaquetas a liberarem seus grânulos contendo compostos plaquetários que são proteínas, fatores de crescimento e citocinas

formando uma matriz provisória juntamente com a fibrina e fibronectina. Para que haja a estabilização desse coágulo, leucócitos são recrutados para o local e inicia-se a fase inflamatória, estimulada pela presença de ATP, citocinas pró-inflamatórias e ácidos nucleicos liberados de células em processo de morte (MORETTI et al., 2022).

Em infecções parasitárias crônicas, como na LTA, já foi demonstrado que a presença da *Leishmania* interfere na produção de citocinas e de proteínas da matriz extracelular ocasionando uma resposta imune diferenciada a fim de favorecer sua migração e sua permanência no tecido, gerando uma inflamação crônica como ilustrado na figura 1 (MENEZES et al., 2016; CARDOSO, 2020).

Na fase inflamatória, há o recrutamento de células como os neutrófilos e, posteriormente, monócitos e macrófagos para o local da infecção (VIEIRA et al., 2013). Essas células fagocitam os microrganismos invasores promovendo a sua eliminação pelo menos parcial e produzem fatores solúveis que atuarão na ativação de células da resposta inata e adaptativa (CUNNINGHAM, 2002).

Os neutrófilos são as primeiras células a chegar no sítio infeccioso e, após internalizar as leishmanias, promovem a morte do parasito por uma série de enzimas citotóxicas (PASSELLI et al., 2022). Subsequentemente a esta resposta, outras células como macrófagos, monócitos e linfócitos produzirão citocinas pró-inflamatórias, como Fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e Interferon- γ (IFN- γ) com o objetivo de reduzir a carga parasitária (NOVAIS et al., 2014).

Devido à multiplicação das leishmanias, os neutrófilos secretam quimiocinas para recrutamento celular, como IL-8 que atrai mais neutrófilos para o tecido lesionado. Após dois ou três dias, essas células entram em apoptose, o que estimula a atividade fagocítica de macrófagos que liberam quimiocinas como CCL3 que atua no processo de recrutamento de novos leucócitos, e CCL4 que possui atividade pró-coagulante (VAN ZANDBERGEN et al., 2002; PALOMINO; MARTI, 2015).

Embora importantes no controle parasitário, a participação dos neutrófilos e monócitos na patogênese da LTA apresenta uma dualidade visto que também favorecem a progressão da doença através da hipótese de “cavalo de Tróia” (SHAPIRA; ZINOVIEV, 2011). Estudos mostraram que os neutrófilos infectados entram em apoptose e são fagocitados por macrófagos. Sendo assim, as

leishmanias são repassadas para novas células-alvo estabelecendo a infecção de forma silenciosa (LASKAY et al., 2008).

Ainda que a inflamação esteja fortemente associada com a morte e eliminação das leishmanias do tecido, a exacerbação de citocinas pró-inflamatórias destroem substratos e proteínas responsáveis por manter a MEC. Sendo assim, há a necessidade de proliferação das células do endotélio e epitélio para refazer a matriz. Esse fenômeno ocorre quando há diminuição na carga parasitária ou acúmulo de fatores fibroproliferativos produzidos por linfócitos Th2 que liberam citocinas como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Já os macrófagos ativados pelo fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) produzem TGF- β e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), que favorecem o retorno do tecido lesionado para o estado íntegro e funcional (WYNN; BARON, 2010; DUTRA et al., 2018; MACK, 2018).

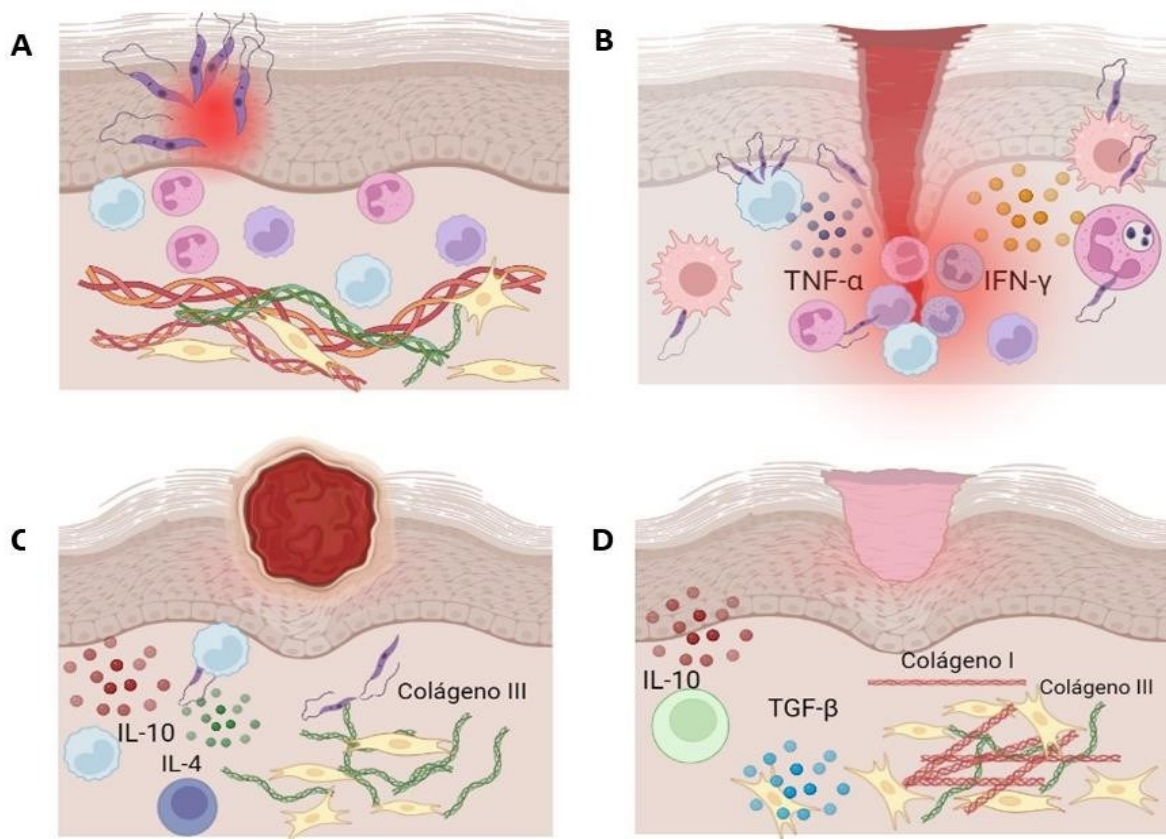


Figura 1: Imagem ilustrativa do processo de cicatrização na LTA. A- Penetração dos parasitos pelo epitélio, em direção à matriz extracelular; recrutamento celular. **B-** Fase inflamatória: destruição tecidual, aumento da produção de citocinas inflamatórias (TNF- α e IFN- γ). **C-** Reparo: Redução da carga parasitária, aumento da expressão de citocinas modulatórias (IL-10 e IL-4) e reparo da matriz extracelular através da produção de colágeno por fibroblastos. **D-** Remodelamento: Síntese de matriz extracelular, substituição de colágeno tipo III para tipo I e formação de cicatriz

A presença das citocinas é importante na resolução da lesão e na progressão da doença. Em casos de pacientes com lesões cutâneas localizadas e mucosas, ricas em células produzindo IFN- γ e TNF- α , foi demonstrado uma potencialização da ativação de macrófagos que desempenham papel fundamental no controle do parasito. Entretanto, a hiperprodução dessas citocinas ocasiona o desbalanço da resposta inflamatória, resultando em lesões expansivas, ulceradas e com cicatrização lenta devido o ambiente altamente inflamado (FARIA et al., 2005; CASTELLANO et al., 2009).

A fase inflamatória representa a etapa mais importante no processo da infecção crônica, pois a ação de citocinas pró-inflamatórias e o recrutamento de leucócitos contribuem com o dano tecidual (BITTAR et al., 2007). Esse recrutamento pode ser benéfico para a *Leishmania*, visto que terá à disposição novas células para infectar. Com o parasitismo estabelecido e novas células sendo infectadas, a fase inflamatória estende-se não permitindo que a lesão evolua para a fase de proliferação e maturação (SILVA; PENNA, 2012).

No processo de proliferação para síntese da MEC, os fibroblastos atuam produzindo colágeno que pode ser expresso na forma não fibrilar e fibrilar. A fibrose é um processo patológico que têm como objetivo promover a cicatrização, é ativado quando há necessidade de elaborar resposta a uma lesão refazendo a matriz, substituindo tecido epitelial por conjuntivo fibroso para restaurar a arquitetura tecidual (LEE; KALURRI, 2010; MORETTI et al., 2021).

Com relação a produção de colágenos, os fibroblastos secretam a forma solúvel dessa proteína que é o pró-colágeno. O pró-colágeno é formado pela união de 3 cadeias polipeptídicas e as combinações de diferentes cadeias caracterizam os diferentes tipos de colágeno. Existem onze tipos de colágeno catalogados, eles foram classificados de acordo com a composição, morfologia e propriedades físicas. Os colágenos fibrilares dos tipos I, II e III são os mais abundantes nos tecidos, sendo que o tipo I é o colágeno mais denso, que fornece maior rigidez ao tecido e é a principal fibra que compõe a cicatriz, e o tipo III é composto por fibras reticulares com menor resistência. Dos colágenos não fibrilares, destaca-se o tipo IV, de membrana basal, forma uma rede específica entre o tecido epitelial e conjuntivo (WOEL; WOEL, 2016).

A síntese do pró-colágeno e suas modificações pós-traducionais específicas ocorrem no retículo rugoso e no interior de vesículas do complexo

de Golgi, respectivamente. Em seguida essas macromoléculas são transferidas para a matriz, onde serão clivadas por C- e N- peptidases. A separação, ou clivagem do pró-peptídeo é a primeira etapa da fibrinogênese, que com a diminuição do tamanho da molécula, o pró-colágeno transforma-se em tropocolágeno, agregando-se à outras moléculas semelhantes, formando as fibrilas. Através das interações eletrostáticas e hidrofóbicas, essa estrutura vira um contorcido com estabilidade e força capaz de suportar tensões formando fibras de colágenos, presentes na matriz extracelular e em tecido cicatricial (SILVA; PENNA, 2012).

A distribuição normal dos componentes estruturais da MEC varia de acordo com os tecidos. Quando foi comparada a pele com a mucosa oral humana, foi observado que não existe diferença na deposição de colágeno tipo I e III em tecidos de pacientes saudáveis, mas quando avaliaram as proteínas de adesão, identificaram um aumento de fibronectina em mucosa oral, enquanto a elastina foi observada de forma proeminente na pele. As demais diferenças dos componentes da MEC entre ambos tecidos foram relacionadas à maior vascularização, quantidade de fibroblastos e queratinócitos nos tecidos de mucosa oral (GLIM et al., 2014). Essas singularidades podem nortear o processo de resolução de uma ferida, visto que o aspecto da lesão e a formação de cicatriz entre a pele e a mucosa oral também apresenta distinções macroscópicas, que são resultado da proliferação celular, angiogênese e deposição de colágeno (LEE; EUN, 1999).

Entretanto, nas feridas crônicas, como na leishmaniose, esse processo é desbalanceado devido ao acúmulo de enzimas proteolíticas que reduzem significativamente a presença de fatores fibroproliferativos e de inibidores de proteinase que são responsáveis pela degradação do colágeno e formação da cicatriz (LEE; KALLURI, 2010).

Em contrapartida, estudos já associaram a degradação de colágeno e destruição tecidual com o processo infeccioso que, devido a ulceração e inflamação, algumas lesões apresentam uma hiperprodução de matriz extracelular, desenvolvendo cicatrizes fibróticas. (RIDLEY; RIDLEY, 1983). Esse quadro de inflamação já foi demonstrado em lesões de pacientes mucosos, forma grave da doença, e que apresentam altos níveis de IFN- γ e TNF- α (FARIA et al., 2005). Amato e colaboradores em 2003, demonstraram que, mesmo após

o tratamento, esse perfil inflamatório local permanecia. Acredita-se que isso ocorra devido a uma resposta específica hospedeiro-parasita, indicando fortemente a necessidade de vigilância contínua de pacientes com leishmaniose mucosa em risco de reativação, apesar de ter ocorrido a cicatrização da ferida após a terapia (AMATO et al., 2003).

Estudos em leishmaniose visceral canina sugerem que o excesso de colágeno III, o primeiro a ser depositado, favoreça o ciclo natural da doença, pois sempre está associado a regiões de infiltrado inflamatório e com isso, o parasita segue infectando novas células. Jacintho e colaboradores demonstraram, em 2018, que, em um quadro de inflamação há uma redução proporcional de quantidade fibras colágenas do tipo I e um aumento do tipo III uma vez que a constante inflamação impede o colágeno III de ser degradado e substituído pelo tipo I. Além disso, uma matriz extracelular mais delicada, com fibras mais finas de colágeno favorecem a migração da *Leishmania* no tecido (JACINTHO et al., 2018; CARDOSO, 2020).

Esses mecanismos não são descritos completamente na leishmaniose tegumentar americana humana. A maioria dos estudos estão relacionados aos aspectos clínicos. Diante disso, a identificação e a associação da deposição de colágenos com as formas clínicas da LTA, assim como possíveis associações com o perfil das células imunes presentes da lesão contribuem com uma melhor compreensão da patogênese da LTA.

Nossa hipótese de trabalho é que a deposição de colágeno nas lesões de pacientes com leishmaniose cutânea e mucosa, apresenta diferenças, e que a resposta imune do indivíduo pode ser correlacionada com o potencial de cicatrização das lesões, sendo assim, é possível estratificar essas manifestações clínicas pela produção de citocinas, presença de subpopulações celulares e deposição de colágeno.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar a deposição de colágeno em lesões de pacientes com as formas clínicas cutânea e mucosa da leishmaniose tegumentar americana e sua associação com aspectos imunológicos.

2.2 Objetivos Específicos:

- a) Identificar e quantificar a área de colágeno nas lesões de pacientes com as formas clínicas cutânea localizada (LC) e mucosa (LM) da leishmaniose através da coloração de *Picrosirius Red* e Tricrômico de Masson
- b) Correlacionar a frequência de subpopulações celulares CD4+, CD8+ e CD68+ identificadas por microscopia confocal com a área ocupada por fibras colágenas presentes nas lesões de pacientes com LC e LM;
- c) Correlacionar a expressão das citocinas IL-10, TNF- α , IFN- γ e a molécula citotóxica Granzima A identificadas por microscopia confocal com a área de deposição de colágeno nas lesões de pacientes com LC e LM;
- d) Realizar análise multivariada para avaliar a distribuição comparativa dos fatores inflamatórios e da área de colágeno em pacientes com LC e LM.

3. METODOLOGIA

3.1 Obtenção das biópsias de lesões de pacientes com leishmaniose

As amostras utilizadas foram provenientes de pacientes com leishmaniose tegumentar americana residentes em Corte de Pedra, município de Tancredo Neves, localizada a 280 km de Salvador. O posto de saúde é coordenado pelo Dr. Edgar Carvalho e o grupo do Serviço de Imunologia da UFBA.

Inicialmente, os pacientes que apresentavam lesões sugestivas de leishmaniose foram submetidos a inspeção da lesão e biópsia para confirmação do diagnóstico. Em pacientes com a forma clínica cutânea, foi realizado um *punch* na região da lesão para retirada do fragmento. Já em pacientes mucosos foi realizado uma pequena incisão no local da ferida. Em ambos os casos, os pacientes estavam sob efeito de anestesia local.

As biópsias foram imersas em uma solução de Sacarose a 30% por 30 minutos a 4 °C. Em seguida, foram transferidas para um criotubo ou criomolde contendo meio de inclusão para tecidos congelados Tissue-Tek® O.C.T (*Sakura*) e foram colocadas no gelo seco. Para os estudos histológicos, o material foi encaminhado para a Universidade Federal de Minas Gerais onde as biópsias foram armazenadas a -80 °C até o processamento.

Foram utilizadas neste estudo apenas as amostras provenientes de pacientes com diagnóstico clínico e/ou laboratorial confirmado, com as manifestações clínicas cutânea localizada ou mucosa da leishmaniose, sem ter realizado tratamento prévio. Os pacientes que apresentavam outras doenças parasitárias, grávidas, crianças e pacientes previamente tratados foram excluídos desse estudo. Logo, considerando os critérios pré-estabelecidos, a amostra total corresponde a nove pacientes com a forma clínica cutânea localizada (LC) e sete mucosos (LM). A coleta foi feita de acordo com protocolo COEP-UFMG 027/98 aprovado em 17/06/98.

3.2 Processamento e marcação nas lesões de leishmaniose

Para realizar as marcações de imunofluorescência e colorações histológicas, as lesões foram seccionadas no Centro de Aquisição e

Processamento de Imagens (CAPI), no criostato LEICA CM3050 S em aproximadamente 5µm. Os cortes foram posicionados em lâminas siliconadas da marca *Macro slides* (VWR Scientific), fixados com acetona a -20 °C durante 10 minutos e mantidos congelados a -80 °C até o processamento.

Para as análises utilizando imunofluorescência, essas lâminas foram submetidas as reações de imunofluorescência com anticorpos conjugados com isotiocianito de fluoresceína (FITC) ou ficoeritina (PE) para indicar as subpopulações de linfócitos CD4+, CD8+ e macrófagos CD68+ além de citocinas inflamatória como TNF- α , IFN- γ e da citocina imunomodulatória IL-10. Além dessas, foi realizada a marcação com anticorpos anti-granzima A que é uma molécula citotóxica. Estes procedimentos foram realizados como parte da tese de doutorado da Dra. Daniela Rodrigues de Faria Barbosa, orientada pela prof^a Dra. Walderez Dutra, defendida no ano de 2008 (BARBOSA, 2008).

3.3 Coloração por Tricrômico de Masson e *Picrosirius red* e obtenção das imagens

As lâminas com os cortes das lesões armazenadas a -80 °C foram coradas com o Tricrômico de Masson no Laboratório de Apoio Didático (LAD) no ICB/UFMG e com *Picrosirius red*, em parceria com Dr. Paulo Guilherme de Oliveira Sales, ONCOCLÍNICAS NÚCLEO em Belo Horizonte/MG.

Resumidamente, para o Tricrômico de Masson, as lâminas foram mergulhadas em água corrente por 20 minutos, posteriormente foram imersas na hematoxilina por dois minutos e lavadas em água corrente durante 10 minutos. Por fim, foram coradas com corante Tricrômico de Masson por 8 minutos, e submetidas à desidratação em uma série crescente de álcool etílico e diafanizadas com xilol. As lâminas foram montadas com *Entellan* (Merck) e scaneadas pelo *Scanner 3D Histec* no CAPI ICB/UFMG.

Para o *Picrosirius red*, os cortes foram incubados por 60 minutos na solução do corante e posteriormente foram lavados duas vezes em solução de ácido acético (0,5%), desidratadas em álcool absoluto, e por fim, foram montadas com *Entellan* (Merck). Para foto documentação dos cortes corados com *picrosirius red*, foi utilizado o *software* QCapture Pro 6.0. As imagens foram adquiridas em microscópio óptico da marca Olympus sob luz polarizada e com a

resolução de 1280x960 pixels no Laboratório De Apoptose no ICB/UFMG. Essa coloração, sob luz polarizada, permite que se observe diferença na interferência de cores, na intensidade e na birrefringência dos tecidos corados, principalmente das fibras de colágeno do tipo I (aparece em vermelho) e tipo III (aparece em amarelo esverdeado).

3.4 Análise das Imagens

Para calcular a área de colágeno presente nas lesões dos pacientes, foi selecionada a área de tecido conjuntivo presente nas lesões, excluindo-se o epitélio das lesões em que ele estava aparente. A quantificação da área total de colágeno em relação a área total da lesão foi obtida no usando o *plugin* IHC Toolbox no *software ImageJ*. Com o uso deste *plugin*, é possível selecionar uma pequena área como amostra de região positiva para colágeno. Dessa forma, o programa disponibiliza o percentil de área de colágeno em relação à área total da lesão. (RENU et al., 2022). A quantificação de células da região do infiltrado inflamatório foi feita deixando a imagem preta e branco através da ferramenta *make binary* seguindo do uso da ferramenta *analyze particle* do *ImageJ*. Essa última é responsável por identificar as bordas dos núcleos, quantificando-os de uma forma automática. O tamanho escolhido para quantificação desses contornos foi de 0 a infinito, esse resultado foi sumarizado pelo *software* e obtido na aba *mensures*. (GRISHAGIN, 2015).

Com relação à análise das imagens obtidas por microscopia confocal, os valores das frequências das populações celulares foram avaliados pela Dra. Daniela Faria, em sua tese de doutorado (BARBOSA, 2008) e reportado no artigo científico publicado em 2005 (Faria et al., 2005).

3.5 Análise Estatística

As análises estatísticas foram feitas no *Software GraphPad Prism 8.0* onde primeiramente foram realizados os testes de normalidade (Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov) e remoção de outliers em todos os dados.

Em relação a quantificação da área de colágeno e densidade celular expressa pela quantidade de células por mm^2 , os dados dos pacientes foram

agrupados por forma clínica (cutânea e mucosa) e os resultados foram obtidos através da análise não-paramétrica e não pareada usando os testes de Mann-Whitney ou T test.

As análises de correlação de Pearson foram feitas para os dados paramétricos e de Spearman para os não paramétricos. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05.

Para análise multivariada de PCA e *Heatmap* hierarquizado foi utilizada a ferramenta *ClustVis* (disponível em <https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>) como descrito por METSALU e VILO em 2015, e previamente empregada em nosso laboratório (METSALU; VILO, 2015, NEVES et al., 2022).

4. RESULTADOS

4.1 Análise da área de colágeno do infiltrado inflamatório das lesões.

Para demonstrar a presença de fibras colágenas nas lesões de pacientes com leishmaniose, os cortes histológicos foram corados com o Tricrômico de Masson e *Picrosirius red* e avaliados no *software ImageJ*. Na figura 2 é possível observar a coloração representativa de lesão de pacientes com a forma cutânea (P1 e P2) e com a forma mucosa (P3, P4 e P5). Nessa figura, a primeira coluna corresponde às lesões coradas com Tricrômico de Masson, onde, em azul está demarcado o colágeno (seta amarela) e em roxo, os núcleos das células (seta verde). Na figura 2, a segunda coluna representa a coloração das lesões com o *Picrosirius red*. Nessa coloração, é possível fazer a diferenciação do colágeno onde em vermelho se observa o colágeno do tipo I (seta branca) e em amarelo esverdeado, observa-se o colágeno tipo III (seta azul).

Após a obtenção e análise das imagens, as áreas de colágeno foram quantificadas como descrito na metodologia e foi possível observar, na figura 3A, que lesões de pacientes LC possuem uma área de colágeno (mm²) maior do que lesões de pacientes LM. Além disso, também foi observado que as lesões de pacientes com LC apresentavam, em percentagem, uma área maior ocupada pelo colágeno do que lesões de pacientes com LM (fig. 3B).

Em seguida, avaliamos se existia diferença no número de células no infiltrado inflamatório entre as formas clínicas e não foi observada diferença estatisticamente significativa entre LC e LM (fig. 4A). Posteriormente, avaliamos a densidade celular (células/área) do infiltrado inflamatório e observamos que os pacientes com a forma mucosa, possuem mais células por área total (fig. 4B) e por área de colágeno (fig. 4C) do que as lesões de pacientes com a forma cutânea. Observamos, ainda, que quanto maior a área de colágeno, menor a quantidade de células, mostrada pela correlação negativa entre estes dois parâmetros (fig. 4D)

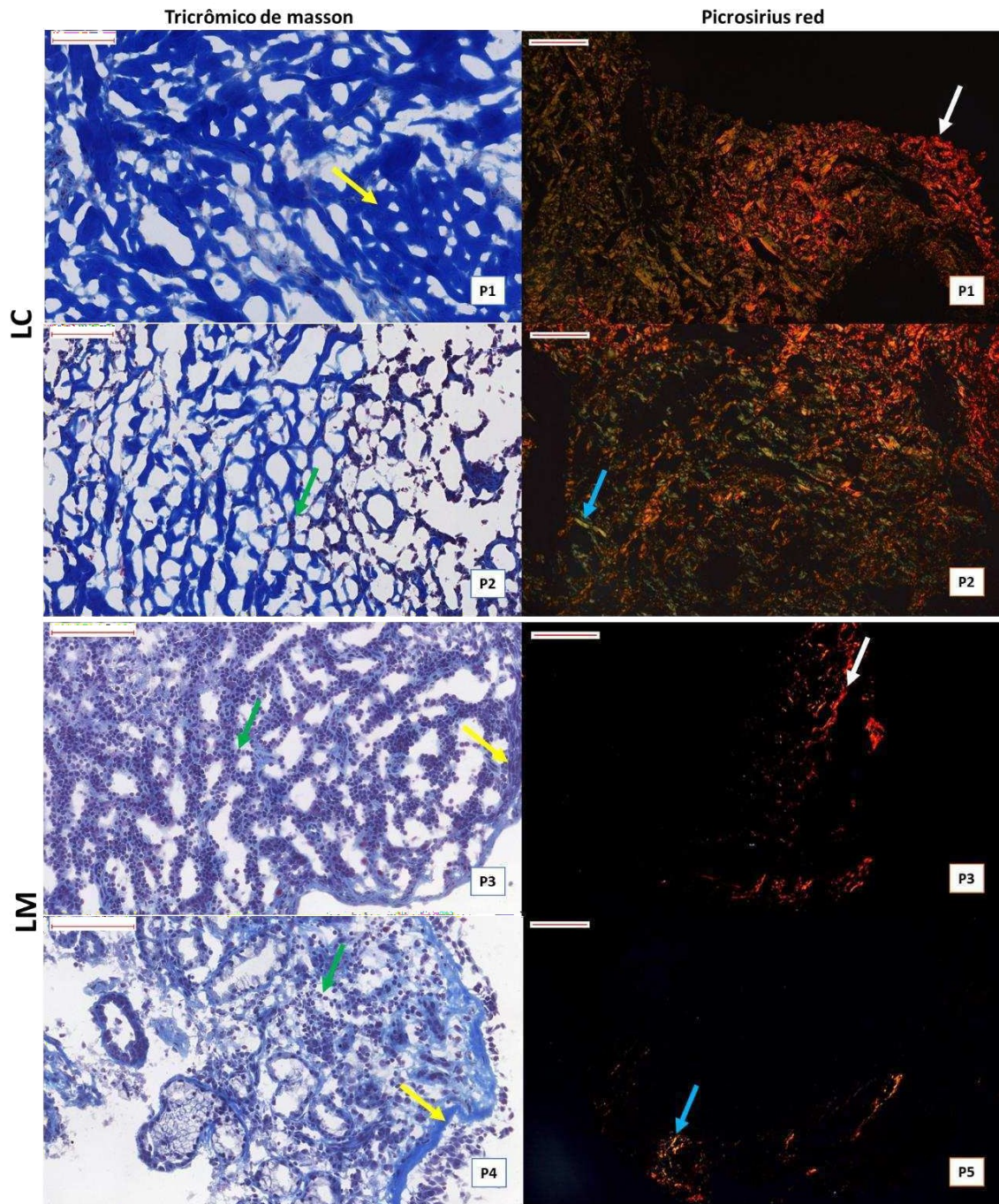


Figura 2: Avaliação da deposição de colágeno por microscopia de luz e coloração Tricrômico de Masson e *Picosírius Red* em cortes histológicos representativos das lesões de pacientes com leishmaniose tegumentar americana. P1 e P2 representam pacientes com a forma cutânea e P3, P4 e P5 pacientes com a forma mucosa. As setas indicam área de colágeno total (seta amarela), núcleos celulares (setas em verde), área de colágeno do tipo I (seta branca), área de colágeno tipo 3 (seta em azul). Barra = 100µm

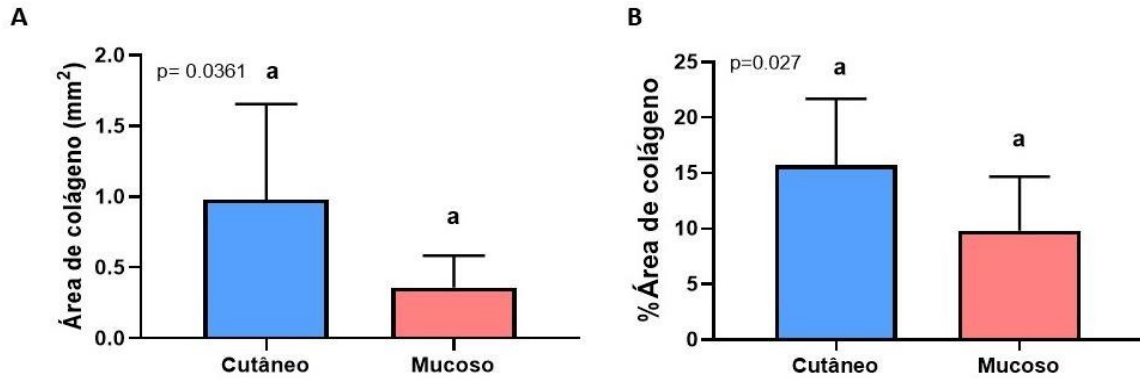


Figura 3: Avaliação da área total de colágeno através da quantificação de colágeno por área de colágeno dos pacientes com as formas clínicas cutânea e mucosa. Letras iguais e valor de $p < 0.005$ representam diferença estatística significativa.

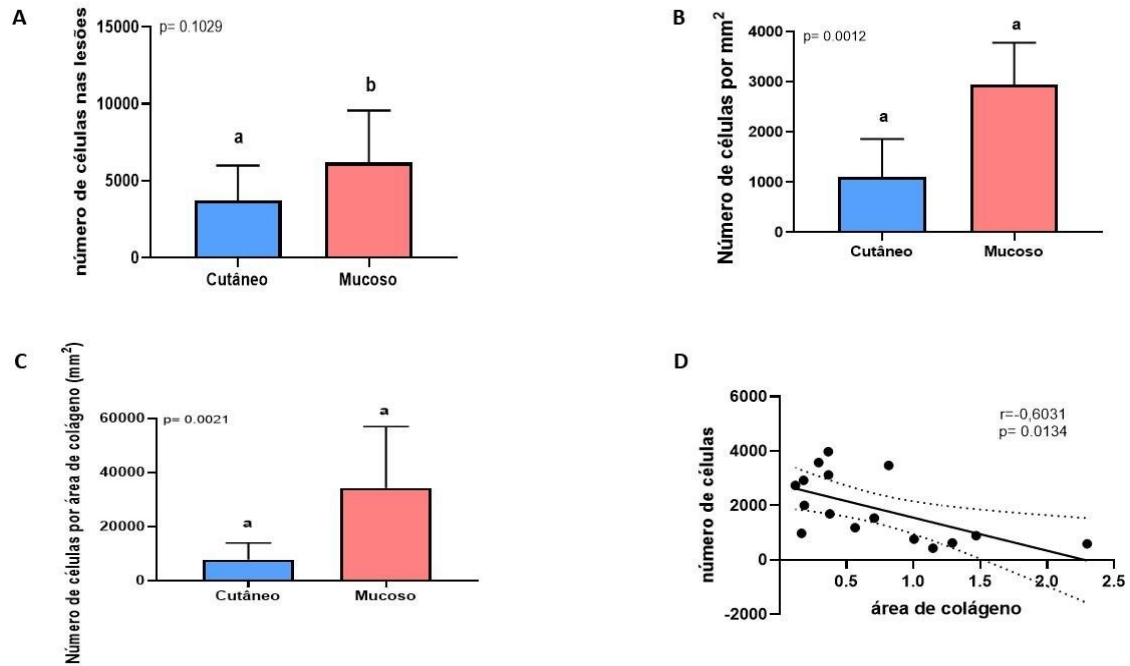


Figura 4: Avaliação das células presentes nas lesões de pacientes com leishmaniose. (A) Quantificação de células do infiltrado inflamatório das lesões de pacientes com leishmaniose cutânea e mucosa. (B) Quantificação do número total de células presentes no infiltrado inflamatório pela área total das lesões. (C) Quantificação do número total de células presentes no infiltrado inflamatório pela área de colágeno das lesões. (D) Correlação entre a quantidade de células presentes no infiltrado inflamatório das lesões e a área total de colágeno. Letras iguais e valor de $p < 0.005$ representam diferença estatística significativa.

4.2 Correlação de subpopulações celulares, citocinas e molécula citotóxica com a deposição de colágeno

Estudos anteriores de nosso grupo avaliaram as lesões de pacientes com LC e LM, determinando o número e a frequência de células CD4+, CD8+ e CD68+ e da expressão de IFN- γ , IL-10, TNF e granzima (Faria et al., 2005). Neste estudo, propusemo-nos a avaliar se há uma correlação entre a deposição de colágeno e essas subpopulações celulares CD4+, CD8+ e CD68+, assim como com as citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-10 e a molécula granzima A. Esta análise foi possível porque analisamos a deposição de colágeno nas mesmas lesões analisadas no estudo anterior.

Inicialmente avaliamos se existe uma correlação da deposição de colágeno nas lesões de pacientes com LTA, sem estratificar as formas clínicas, entre o número de células CD4+, CD8+ e CD68+ (fig. 5 A, B e C) e o percentil dessas subpopulações celulares (fig. 5D, E e F) não observamos correlações estatisticamente significativas.

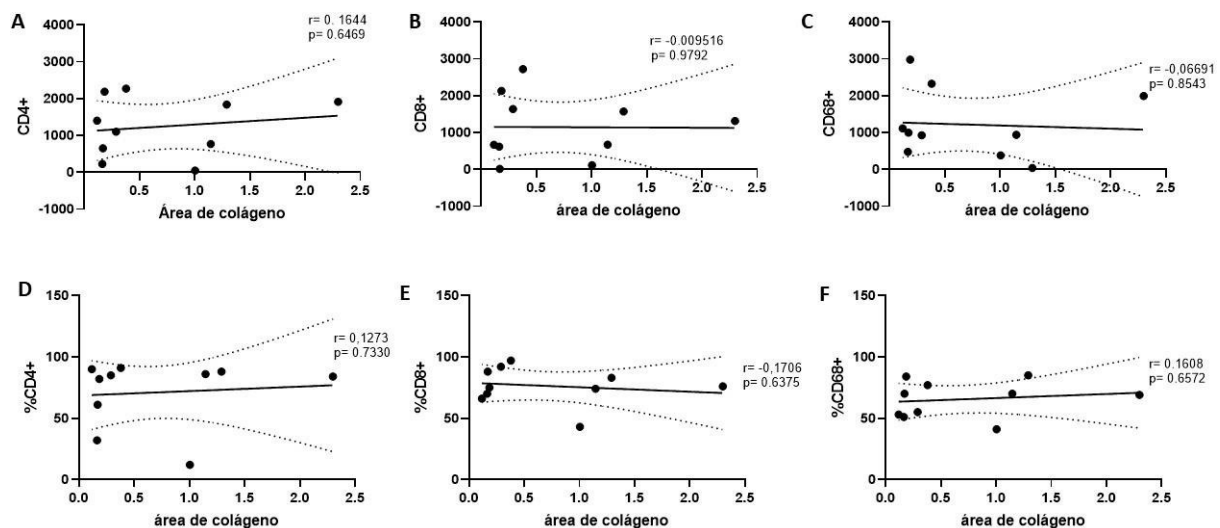


Figura 5: Correlações entre a área de colágeno e subpopulações celulares CD4+, CD8+ e CD68+ presente nas lesões de pacientes de diferentes formas clínicas. Letras A, B e C referentes a pacientes LC e D, E e F referentes a pacientes LM. Valor de $p < 0,05$ é considerado estatisticamente significativo.

Posteriormente avaliamos se existia correlações entre o número total e percentil de células TNF- α +, IFN- γ + e IL10+ com a deposição de colágenos e não foi observada nenhuma correlação estatisticamente significativa (fig. 6). Por fim, avaliamos a existência de correlação entre a deposição de colágeno e o

número absoluto de células GrA+ em células CD8+ (fig. 6D) e não houve correlação estatisticamente significativa. Entretanto, quando avaliamos o percentil de GrA+ em células CD8+, encontramos uma correlação negativa com a área de colágeno (fig. 6H) e o número absoluto ou a frequência das subpopulações celulares.

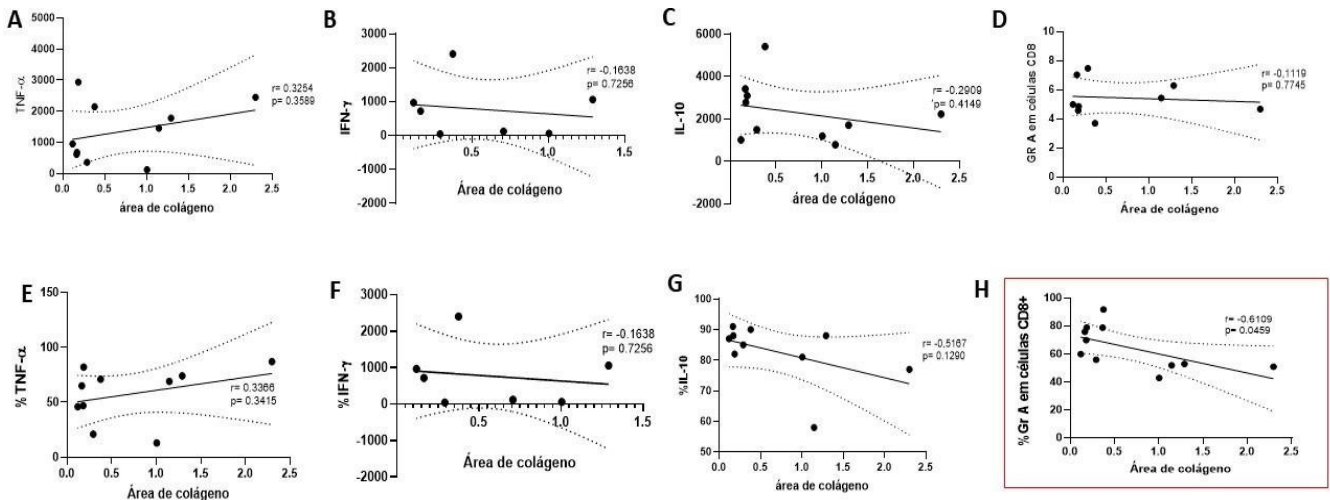


Figura 6: Correlações entre a área de colágeno, citocinas e granzima A presente nas lesões de pacientes de diferentes formas clínicas. As letras A, B, C e D correspondem a avaliação da correlação entre os números absolutos de cada parâmetro avaliado com a área de depósito de colágenos. Letras E, F, G e H correspondem a avaliação da correlação entre as porcentagens de cada parâmetro avaliado com a área de depósito de colágenos. Valor de $p < 0,05$ é considerado estatisticamente significativo.

Após essas análises, decidimos verificar se, ao estratificar os pacientes com LTA em formas clínicas LC e LM, haveria correlação entre a área de colágeno. Na figura 7 estão demonstrados os resultados obtidos com LC em relação à correlação entre deposição de colágeno com número ou a frequência das diferentes populações celulares e não observamos nenhuma correlação estatisticamente significativa. Nos pacientes com LM, quando avaliamos a frequência e o percentil de subpopulações celulares, foi observado que a frequência de células CD8+ apresenta uma correlação positiva com a área de colágeno, como demonstrado na figura 8.

Por fim, realizamos as análises de frequência e percentil das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e da molécula granzima A nos pacientes com LTA estratificando as formas clínicas. Na figura 9 estão dispostos os resultados dos pacientes LC e na figura 10 dos pacientes LM, em ambos os painéis de

correlação não foi possível observar diferença estatística significativa com a área de colágeno total.

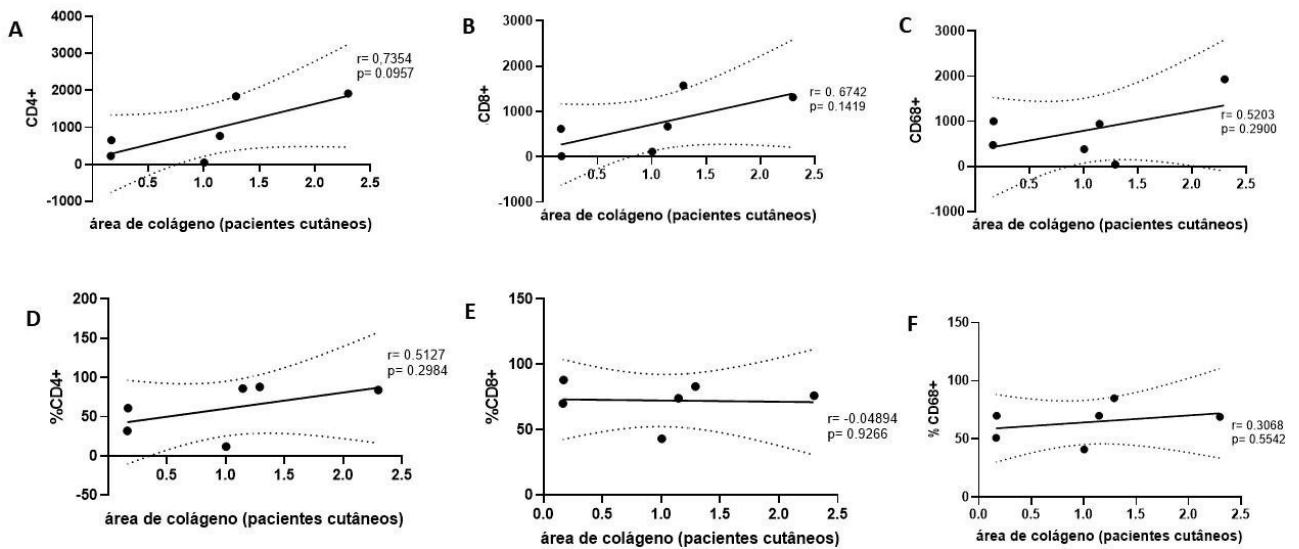


Figura 7: Correlações entre a área de colágeno e subpopulações celulares CD4+, CD8+ e CD68+ presente nas lesões de pacientes com a forma clínica cutânea. As letras A, B e C correspondem a avaliação da correlação entre os números absolutos de cada parâmetro avaliado com a área de depósito de colágenos. Letras D, E e F correspondem a avaliação da correlação entre as porcentagens de cada parâmetro avaliado com a área de depósito de colágenos. Valor de $p < 0,05$ é considerado estatisticamente significativo.

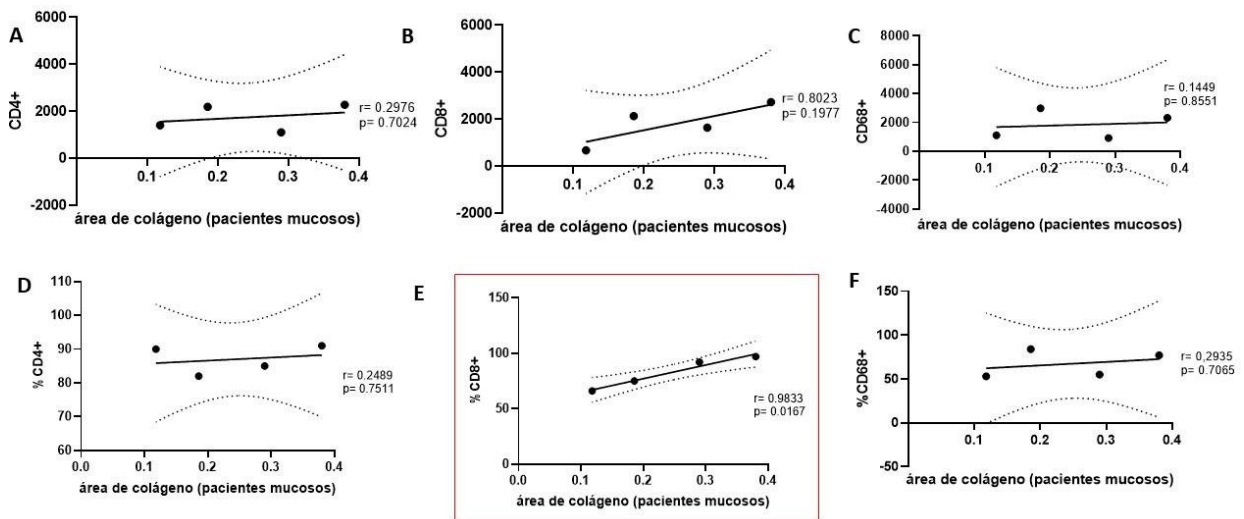


Figura 8: Correlações entre a área de colágeno e subpopulações celulares CD4+, CD8+ e CD68+ presente nas lesões de pacientes com a forma clínica mucosa. As letras A, B e C correspondem a avaliação da correlação entre os números absolutos de cada parâmetro avaliado com a área de depósito de colágenos. Letras D, E e F correspondem a avaliação da correlação entre as porcentagens de cada parâmetro avaliado com a área de depósito de colágenos. Valor de $p < 0,05$ é considerado estatisticamente significativo.

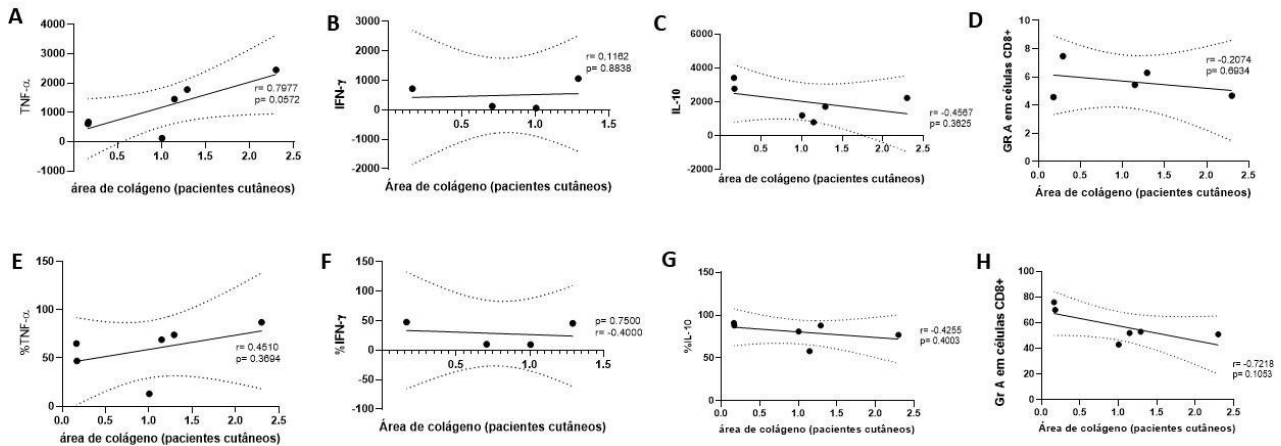


Figura 9: Correlações entre a área de colágeno, citocinas e granzima A presente nas lesões de pacientes com a forma clínica cutânea. As letras A, B, C e D correspondem a avaliação da correlação entre os números absolutos de cada parâmetro avaliado com a área de depósito de colágenos. Letras E, F, G e H correspondem a avaliação da correlação entre as porcentagens de cada parâmetro avaliado com a área de depósito de colágenos. Valor de $p < 0,05$ é considerado estatisticamente significativo.

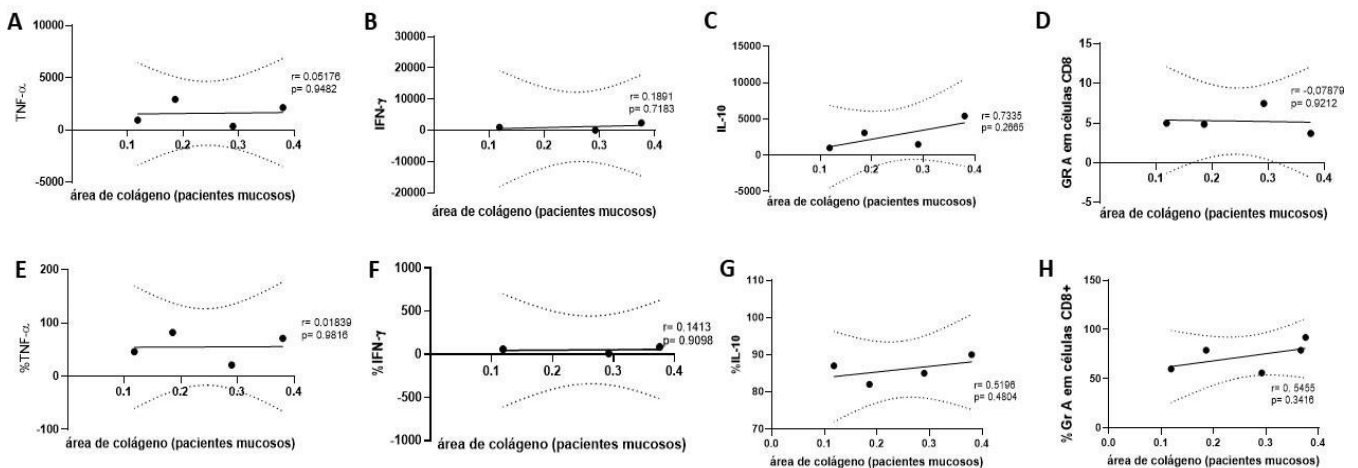


Figura 10: Correlações entre a área de colágeno, citocinas e granzima A presente nas lesões de pacientes com a forma clínica mucosa. As letras A, B, C e D correspondem a avaliação da correlação entre os números absolutos de cada parâmetro avaliado com a área de depósito de colágenos. Letras E, F, G e H correspondem a avaliação da correlação entre as porcentagens de cada parâmetro avaliado com a área de depósito de colágenos. Valor de $p < 0,05$ é considerado estatisticamente significativo.

A Análise de Componentes Principais (Principal Component Analysis, PCA) é uma técnica de análise multivariada que é capaz de fazer a redução de dimensionalidade de um conjunto de dados (JOLLIFFE, 1986). A representação gráfica consiste em sintetizar a dispersão (variância) desses dados em um

gráfico bidimensional. De forma similar, a análise multivariada representada em um mapa de calor hierarquizado é capaz de representar um conjunto de dados através de cores. Além disso, a utilização de dendrogramas, combinado ao mapa de calor permite a visualização da similaridade entre as amostras (SHIRKHORSHIDI et al, 2015).

Nas figuras 11 A e C, é possível observar que o gráfico de PCA da análise multivariada não foi capaz de separar e distinguir as formas clínicas. Entretanto, ao observar a figura 11 C onde a área de colágeno foi considerada como um parâmetro para estratificar as formas clínicas, podemos observar que na figura 11 C existe uma sobreposição menor dos círculos vermelho e azul, referentes respectivamente às formas clínicas LC e LM, quando comparado a figura 11 A.

Na análise multivariada demonstrada no gráfico de mapa de calor hierarquizado (fig. 11 B e D), a presença da área de colágeno na seleção dos parâmetros, também sugeriu ser importante na segregação das formas clínicas. Na figura 11 D, nas setas, é possível observar que, apesar de três pacientes LC estarem misturados com LM, conseguimos distinguir dois grupos. O da esquerda em azul (LM), e o da direita em vermelho (LC).

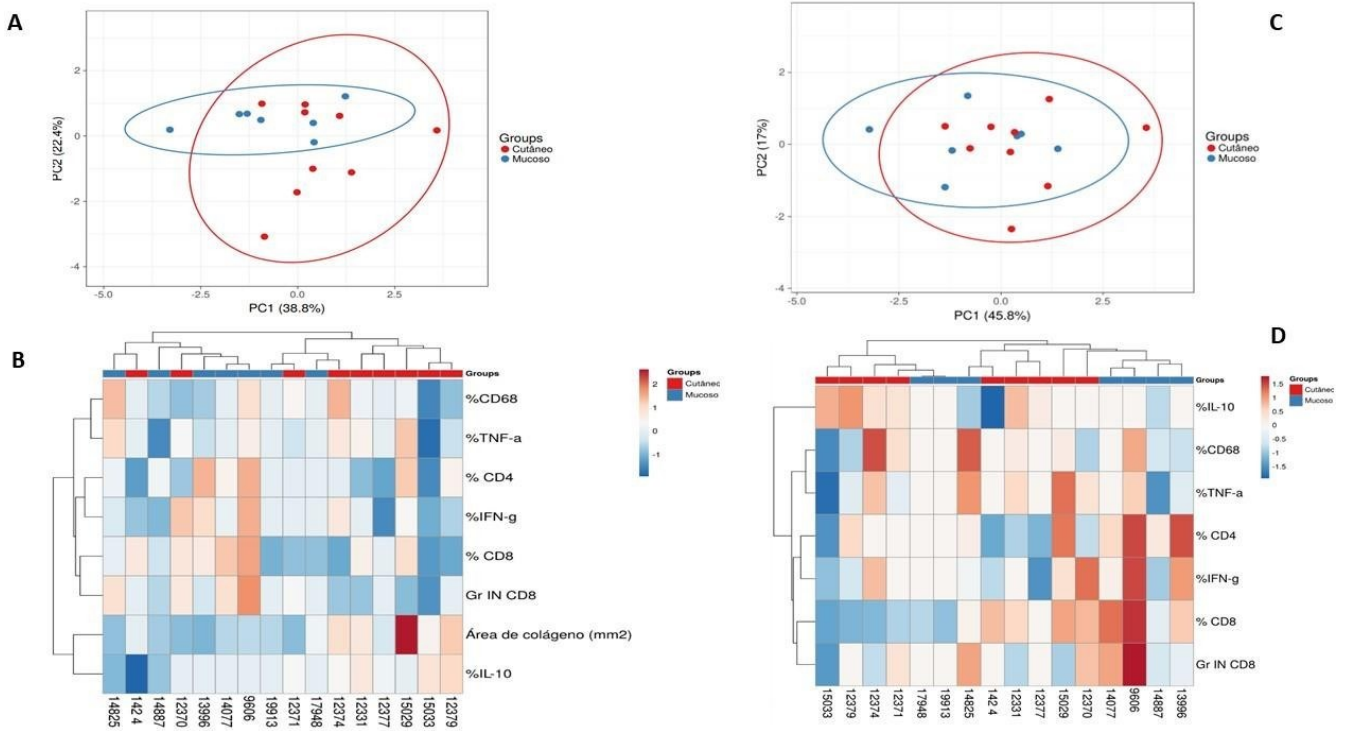


Figura 11: Gráficos representativos da análise multivariada de PCA e Heatmap hierarquizado entre a área de colágeno, subpopulações celulares, citocinas, granzima A e os grupos LC e LM. Em A e C os eixos X e Y mostram % da variância total entre as amostras. As elipses indicam uma previsão com uma probabilidade de 95% que uma nova observação cairá dentro da elipse. A análise representativa do mapa de calor (heatmap) (B e D) onde as linhas e as colunas são agrupadas usando a distância de correlação. Na barra do gradiente de cores, o azul indica níveis mais baixos, enquanto o vermelho indica níveis mais altos. As linhas verticais representam cada paciente avaliado e as linhas horizontais representam cada parâmetro em estudo.

5. DISCUSSÃO

A cicatrização é o processo de reposição da matriz extracelular de um tecido lesionado, sendo dividido em quatro etapas: hemostasia, inflamação, remodelamento e maturação. Para que haja a formação da cicatriz, mecanismos celulares e moleculares precisam atuar no sítio da lesão para reestruturar o tecido e devolver sua integridade. Nas feridas cujo potencial de cicatrização é nulo ou escasso, há uma desregulação no reparo tissular, o que ocasiona o prolongamento da fase inflamatória, atraso na migração celular e degradação de matriz, e dessa forma, essas lesões são classificadas como feridas crônicas (WOO et al., 2007).

A cronicidade e severidade dessas feridas são diversas devido a sua etiologia. No caso da leishmaniose tegumentar americana, existe um parasito que interage com a matriz extracelular (MEC), e, em consequência da infecção, têm-se um tecido lesionado que não consegue chegar a fase de maturação na ausência de tratamento (JACINTHO et al., 2018).

Com o objetivo de identificar nas lesões de pacientes com leishmaniose tegumentar americana as diferenças entre as formas clínicas LC e LM, nesse estudo nos propusemos a avaliar a deposição de colágeno e a sua associação com a frequência de células CD4+ e CD8+ (subpopulações de linfócitos), com CD68+ (macrófagos), além da expressão de citocinas inflamatória como TNF- α , IFN- γ e da citocina imunomodulatória IL-10 e da molécula citotóxica, granzima A.

Inicialmente, decidimos avaliar a área de depósito de colágeno, utilizando microscopia de luz e a coloração com Tricrômico de Masson e *Picrosirius red*. Nossos dados demonstram que a forma clínica cutânea apresenta maior área ocupada por colágeno quando comparado aos pacientes com a forma mucosa como pode ser observado na figura 3. Considerando que as fibras de colágeno são abundantes na derme, que possuem a função de suportar tensão, regular adesão celular e migração para desenvolvimento tecidual (ROZARIO; DESIMONE, 2010; FRANTZ et al., 2010), sugere-se que uma maior área de colágeno esteja relacionada com a menor severidade das lesões. Sendo assim, justifica-se o fato de pacientes com forma mucosa, considerada uma das mais danosas manifestações da doença apresentarem menor deposição dessas fibras. Uma das possibilidades para explicar este fato é que o conjunto do

tecido mucoso tenha menos colágeno que o do cutâneo. No entanto, como citado anteriormente, não há diferença significativa na deposição fisiológica de colágeno no conjuntivo da pele versus da mucosa (GLIM et al., 2014).

Assim, é possível que essa diferença se deva ao processo inflamatório que é diferente nessas lesões: Faria et al. (2005) demonstraram que a resposta inflamatória, rica em IFN- γ , é mais exacerbada em LM comparando-se a LC. É possível que o este ambiente mais rico em IFN- γ contribua para uma menor deposição de colágeno. De fato, Amento e colaboradores (1991) mostraram que IFN- γ altera a produção de colágeno por células da musculatura vascular em aterosclerose. Além disso, foi demonstrado também que, enquanto citocinas Th2 (IL-4 e IL-13) induzem a produção de procolágeno por fibroblastos da membrana conjuntiva ocular, IFN- γ reduz a produção desta molécula (TAVOLATO et al., 2002; AMENTO et al., 1991).

Os colágenos I e III desempenham papéis distintos no processo de cicatrização. A quantificação desses tipos de colágeno nas lesões de pacientes com LC e LM poderá apontar distinções interessantes, relacionadas à deposição dessas moléculas. Embora tenhamos realizado e adquirido as imagens dos tecidos corados com *Picrosirius red* que permite essa diferenciação, por motivos técnicos e restrições de tempo, ainda não finalizamos as análises.

Nosso estudo confirmou, ainda que em dados anteriores do grupo (Faria et al., 2005), que as lesões de pacientes com LM possuem um maior número de células inflamatórias do que lesões com LC. Interessante notar que quanto maior a quantidade de células, menor a área ocupada pelo colágeno (figura 4D). Novamente aqui, justifica-se a associação negativa entre a inflamação e a deposição de colágeno.

Considerando que as lesões cutâneas causadas por *Leishmania* desencadeiam uma reação inflamatória (GONZÁLEZ et al., 2018), células como macrófagos e linfócitos são comumente encontradas no tecido contribuindo com o controle do parasito, mas também com o aumento da degradação da matriz. Diante disso, tivemos interesse em investigar se a quantidade de macrófagos e linfócitos presentes possuíam correlação positiva ou negativa com a deposição de colágeno. Para responder esse questionamento, tomamos os dados obtidos anteriormente em nosso grupo (FARIA et al., 2005), e realizamos correlações

entre a área ocupada pelo colágeno e o número e a frequência das populações celulares.

Nossos dados apontam que não existe correlação entre a área de deposição de colágeno e essas subpopulações celulares em pacientes com LTA (fig. 5). Com essa mesma abordagem, porém analisando as correlações nas formas clínicas LC e LM separadamente, observamos que existe uma correlação positiva entre a frequência (%) de células CD8⁺ e deposição de colágeno em pacientes com LM. Estes dados sugerem que o recrutamento de células CD8⁺ está associado à maior deposição de colágeno. As razões para esta associação não foram determinadas neste trabalho e, de fato, trazem um novo questionamento do papel de células CD8⁺ na leishmaniose: haveria, dentro da população total de células CD8⁺, alguma subpopulação produtora de fatores que induzem a produção de colágeno? Huang e colaboradores demonstraram que células CD8⁺ produtoras de TGF-beta induzem produção de colágeno e fibrose em linfonodos após infecção por HIV (HUANG et al., 2018). Pouco se sabe sobre a produção de TGF-beta em LTA, especialmente em associação à cicatrização de lesões. Portanto, este assunto merece mais investigações para se comprovar (ou negar) esta hipótese. A análise segregando as formas clínicas foi limitada uma vez que, o número de pacientes em que foi feita a avaliação do depósito de colágenos e a imunofluorescência, em cada forma clínica, foi baixo.

Em seguida, decidimos averiguar se havia uma associação entre a frequência de células produtoras de citocinas e área de colágeno. Não observamos nenhuma correlação estatisticamente significativa como observado na figura 6. De forma interessante, Faria et al., em 2005 também não observaram diferença estatística entre a frequência de células TNF- α ⁺ e IL-10⁺ e as formas clínicas LC e LM (FARIA et al., 2005).

A deposição de colágenos está relacionada com a cicatrização de lesões (LEE; KALLURI, 2010) e ainda nesse contexto, é descrito que a granzima A está associada a destruição tecidual (WENSINK et al., 2015). Em 2009, nosso grupo demonstrou que células CD8⁺ citotóxicas produzindo granzima A estão associadas com o agravamento das lesões dos pacientes com leishmaniose tegumentar americana (FARIA et al., 2009). Mais recentemente, Koh et al., mostraram que a frequência de células CD8⁺ expressando granzima e fazendo redes de DNA está associada à forma mucosa (KOH et al., 2020). Ao avaliar se

existe uma correlação da frequência de células CD8+GrA+ das lesões com a deposição de colágeno, observamos que houve correlação negativa (fig. 6H).

A granzima B é uma enzima proteolítica responsável por degradar substratos importantes da MEC, como a fibronectina e laminina (BUZZA et al., 2005). A produção de fibronectina comumente está associada a formação de colágeno tipo III presente na fase inflamatória da lesão, logo, a destruição intensa dessa proteína de adesão poderia associar-se à menor produção de colágeno (TURNER et al., 2019). Dessa forma, justifica-se a correlação ser negativa, ou seja, quanto menor a produção de granzima A, maior a área de colágeno.

A análise multivariada por PCA permite a identificação de componentes principais (eixos do gráfico) e a variância entre os grupos estudados, e, com isso, é possível observar o quanto os grupos LC e LM se diferem um do outro. Dessa forma, decidimos fazer as análises levando ou não em consideração a área de deposição de colágeno (fig. 11 A e C respectivamente). Nossos resultados apontam que, quando consideramos a área de colágeno total das lesões dos pacientes (fig. 11C), existe uma sobreposição menor dos círculos representativos de cada forma clínica. Ou seja, a área de colágeno presente nas lesões dos pacientes pode ser um importante parâmetro para a segregação das formas clínicas, uma vez que, apenas as características imunológicas das lesões, não são capazes de separar os pacientes entre os grupos estudados (fig. 11A). De maneira similar, o mapa de calor em que incluímos a área de colágeno na avaliação (fig. 11D- setas), apenas três pacientes LC não foram agrupados com os demais.

Apesar de clinicamente as formas LC e LM serem facilmente distinguidas, o mesmo não ocorre quando avaliamos o infiltrado inflamatório das lesões. Em ambas as manifestações, parâmetros como a frequência de macrófagos, associados à lesão não foram distintos (FARIA et al., 2005). Além disso, a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 e da inflamatória TNF não foi diferente em lesões de LC e LM. Com isso, acredita-se que embora as manifestações clínicas entre as formas LC e LM sejam diferentes e muitas diferenças imunológicas existam, elas compartilham muitos mecanismos celulares (MAGALHÃES et al., 1982). Esse fato justifica o que foi encontrado na análise de mapa de calor e PCA desse estudo, onde os parâmetros avaliados não foram capazes de diferenciar completamente as formas clínicas estudadas.

Entretanto, a presença da área de colágeno juntamente com os outros parâmetros estudados pode indicar um fator de distinção na histopatologia da LC e LM.

Apesar das distintas respostas frente a infecção por *Leishmania*, sabe-se que os pacientes são de Corte de Pedra e foram infectados pela espécie que transita na região, *L. (V.) braziliensis*, sendo esta responsável por casos de LC e LM (SCHRIEFER et al., 2004; GUIMARÃES et al., 2009; SILVA et al., 2022). Portanto, o local onde foi contraída a infecção e a espécie causadora já contribuem com o aumento de similaridades dos casos clínicos, o que nos leva a questionar não somente o que podemos avaliar para diferir essas manifestações como também o que leva um paciente a desenvolver uma forma branda ou mais grave da leishmaniose.

Nesse sentido, acreditamos que estudar a deposição de colágeno e a sua associação com a resposta imune tecidual e progressão da doença seja importante pois a cicatrização da ferida é um critério de cura. Além disso, mecanismos indutores de produção de colágeno podem auxiliar na resolução das lesões, sendo um método promissor para aprimorar a assistência em saúde para esses pacientes e aumentar a qualidade de vida.

6. CONCLUSÃO

- A deposição de colágeno nas lesões dos pacientes com LC foi maior quando comparada às lesões dos pacientes com LM;
- A quantidade de células presentes no infiltrado inflamatório das lesões de pacientes com leishmaniose apresenta correlação negativa com a área de colágeno depositado na lesão;
- A frequência de células Granzima A positivas na população de células CD8+ apresentou correlação negativa com a deposição de colágeno nas lesões de pacientes com LTA;
- A frequência de células CD8+ em pacientes com LM apresenta correlação positiva com a área total ocupada pelo colágeno;
- A análise PCA apontou que a avaliação da área de colágeno em associação a parâmetros imunológicos pode ser um parâmetro promissor para realizar a estratificação das formas clínicas, apontando mecanismos imunológicos distintos.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R. P.; BRITO, J; MACHADO, P. L.; JESUS, A. R; SCHRIEFER, A; GUIMARÃES, L. H; CARVALHO, E. M. Successful treatment of refractory cutaneous leishmaniasis with gm-csf and antimonials. **The American Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, Bahia, v. 1, n. 73, p. 79-81, 2005.
- AMATO, V. S; ANDRADE, H. F; DUARTE, M. I. S. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. **Acta Tropica**, v. 85, n. 1, p. 39-49, 2003.
- AMENTO, E P; EHSANI, N; PALMER, H; LIBBY, P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. **Arteriosclerosis And Thrombosis: A Journal of Vascular Biology**, v. 11, n. 5, p. 1223-1230, 1991.
- ANTONELLI, L. R., W. O. DUTRA, R. P. ALMEIDA, O. BACELLAR, AND K. J. GOLLOB. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. **Clin. Exp. Immunol**, p. 341-348, 2004.
- ANVERSA, Laís; TIBURCIO, Monique Gomes Salles; RICHINI-PEREIRA, Virgínia Bodelão; RAMIREZ, Luis Eduardo. Human leishmaniasis in Brazil: a general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, n. 3, p. 281-289, 2018.
- BACELLAR, O; LESSA, H; SCHRIEFER, A; MACHADO, P; JESUS, A. R; DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J.; CARVALHO, E. M. Up-Regulation of Th1-Type Responses in Mucosal Leishmaniasis Patients. **Infection And Immunity**, v. 70, n. 12, p. 6734-6740, 2002.
- BARBOSA, Daniela Rodrigues de Faria. **Caracterização fenotípica e funcional de células presentes em lesões de pacientes com Leishmaniose Cutânea e Mucosa**. 2008. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.
- BITTAR, R. C; NOGUEIRA, R. S; VIEIRA-GONÇALVES, R; PINHO-RIBEIRO, V; MATTOS, M; OLIVEIRA-NETO, M. P; COUTINHO, S. G; DA-CRUZ, A. M. T-cell responses associated with resistance to Leishmania infection in individuals from endemic areas for Leishmania (Viannia) braziliensis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 102, n. 5, p. 625-630, 12 jul. 2007.
- BOTTREL, R. L. A.; DUTRA, W. O.; MARTINS, F. A.; GONTIJO, B.; CARVALHO, E.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; ALMEIDA, R. P.; MAYRINK, W.; LOCKSLEY, R.. Flow Cytometric Determination of Cellular Sources and Frequencies of Key Cytokine-Producing Lymphocytes Directed against Recombinant LACK and Soluble Leishmania Antigen in Human Cutaneous Leishmaniasis. **Infection And Immunity**, v. 69, n. 5, p. 3232-3239, 2001.

BOTS, Michael; MEDEMA, Jan Paul. Granzymes at a glance. **Journal Of Cell Science**, v. 119, n. 24, p. 5011-5014, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica . Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2020

BUZZA, M. S.; ZAMURS, L; SUN, J; BIRD, C. H.; SMITH, A. I; TRAPANI, J. A.; FROELICH, C. J.; NICE, E. C.; BIRD, P. I. Extracellular Matrix Remodeling by Human Granzyme B via Cleavage of Vitronectin, Fibronectin, and Laminin. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 280, n. 25, p. 23549-23558, 2005.

CABRAL, A. D; JORDÃO, F. T; PEREIRA, G. L; ANDRADE, L. A; SANTOS, E. S; SUZUKI, R. B; FUHLENDORF, M. M; AZEVEDO, L. G; RAMOS, P. I. P; QUEIROZ, A. T. L. Evolutive History of Leishmania Genus and Differential Diagnosis of Clinical Important Species Based on A Unique Kinetoplastida Chitinase. **Research Square**, [S.L.], p. 1-19, 9 jul. 2021.

CAMPOS, M. B; LIMA, L. V. R; LIMA, A. C. S; SANTOS, T. V; RAMOS, P. K. S; GOMES, C. M. C; SILVEIRA, F. T. Toll-like receptors 2, 4, and 9 expressions over the entire clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (V.) braziliensis* and *Leishmania (L.) amazonensis*. **Plos One**, 13, n. 3, p. 1-22, 15 mar. 2018.

CANTANHÊDE, L.M.; MATA-SOMARRIBAS, C.; CHOURABI, K.; PEREIRA DA SILVA, G.; DIAS DAS CHAGAS, B.; DE OLIVEIRA R. PEREIRA, L.; CÔRTEZ BOITÉ, M.; CUPOLILLO, E. The Maze Pathway of Coevolution: A Critical Review over the *Leishmania* and Its Endosymbiotic History. **Genes**. 2021, 12, 657

CARDOSO, T; BEZERRA, C; MEDINA, L. S; RAMASAWMY, R; CHERIEFER, A; BACELLAR, O; CARVALHO, E. M. *Leishmania braziliensis* isolated from disseminated leishmaniasis patients downmodulate neutrophil function. **Parasite Immunology**, [S.L.], v. 41, n. 5, p. 1-8, 14 abr. 2019.

CARDOSO, F. O; ZAVERUCHA-DO-VALLE, T; ALMEIDA-SOUZA, F; ABREU-SILVA, A. L; CALABRESE, K. S. Modulation of Cytokines and Extracellular Matrix Proteins Expression by *Leishmania amazonensis* in Susceptible and Resistant Mice. **Frontiers In Microbiology**, [s. l], v. 11, p. 1-16, 31 ago. 2020.

CASTELLANO, L. R; CORREIA FILHO, D; ARGIRO, L; DESSEIN, H; PRATA, A; DESSEIN, A; RODRIGUES, V. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- γ production. **Human Immunology**, [S.L.], v. 70, n. 6, p. 383-390, jun. 2009.

CARVALHO, E.M; BARRAL, A; COSTA, J.M.L; BITTENCOURT, A; MARSDEN, P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 56, p. 315-325, 1994

CARVALHO, E M; JOHNSON, W D; BARRETO, E; MARSDEN, P D; COSTA, J L; REED, S; ROCHA, H. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. **The Journal Of Immunology**, v. 135, n. 6, p. 4144-4148, 1 dez. 1985.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by Leishmania. **Experimental And Molecular Pathology**, [S.L.], v. 72, n. 2, p. 132-141, abr. 2002.

DA-CRUZ, A. M; BITTAR, R; MATTOS, M; OLIVEIRA-NETO, M. P; NOGUEIRA, R; PINHO-RIBEIRO, V; AZEREDO-COUTINHO, R. B; COUTINHO, S. G. T-Cell-Mediated Immune Responses in Patients with Cutaneous or Mucosal Leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. **Clinical And Vaccine Immunology**, [s. l], v. 9, n. 2, p. 251-256, mar. 2002.

DUTRA, W. O; BARBOSA, D. F; SOUZA, P. E. Alencar; MORGAN, D; POETKER, S; GUIMARÃES, L. H; BACELAR, O; GOLLOB, K. J; CARVALHO, E. M. A Th2-Type Response Is Associated With Exuberant Lesions in Pregnant Women Infected With Leishmania braziliensis. **The Journal Of Infectious Diseases**, v. 219, n. 3, p. 480-488, 2018

NEVES, E. G. A; KOH, C. C.; SOUZA-SILVA, T. G.; PASSOS, L. S. A; SILVA, A. C. C.; VELIKKAKAM, T; VILLANI, F.; COELHO, J. S; BRODSKYN, C. I; TEIXEIRA, A. GOLLOB, K.J; NUNES, M.C.P; DUTRA, W.O. T-Cell Subpopulations Exhibit Distinct Recruitment Potential, Immunoregulatory Profile and Functional Characteristics in Chagas versus Idiopathic Dilated Cardiomyopathies. **Front Cardiovascular Med**, p. 1-17, 2022.

FARIA, Daniela R. et al. Decreased In Situ Expression of Interleukin-10 Receptor Is Correlated with the Exacerbated Inflammatory and Cytotoxic Responses Observed in Mucosal Leishmaniasis. **Infection And Immunity**, Bahia, v. 73, n. 12, p. 7853-7859, 30 ago. 2005.

FARIA, D. R.; SOUZA, P. E. A.; DURÃES, F. V.; CARVALHO, E. M.; GOLLOB, K. J.; MACHADO, P. R.; DUTRA, W. O.. Recruitment of CD8+T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, [S.L.], v. 31, n. 8, p. 432-439, ago. 2009

FARIA, D. R; BARBIERI, L. C; KOH, C. C; MACHADO, P. R. L; BARRETO, C. C; LIMA, C. M. F; LESSA, M. M; CARVALHO, E; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. In Situ Cellular Response Underlying Successful Treatment of Mucosal Leishmaniasis with a Combination of Pentavalent Antimonial and Pentoxifylline. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.L.], p. 392-401, 17 jun. 2019.

FRANTZ, C. et al., The extracellular matrix at a glance, **J. C. Sci.**,v. 123, p. 4195-4200, 2010.

GIMBLET, C.; MEISEL, J. S.; LOESCHE, M. A.; COLE, S. D.; HORWINSKI, J.; NOVAIS, F. O.; MISIC, A. M.; BRADLEY, C. W.; BEITING, D. P.; RANKIN, S. C.; CARVALHO, L. P.; CARVALHO, E. M.; SCOTT, P.; GRICE, E. A. Cutaneous Leishmaniasis Induces a Transmissible Dysbiotic Skin Microbiota that Promotes Skin Inflammation. **Cell Host & Microbe**, v.12, p. 1-12, 2017.

GLIM, J. E.; EVERTS, V.; NIESSEN, F. B.; ULRICH, M. M.; BEELEN, R H.J.. Extracellular matrix components of oral mucosa differ from skin and resemble that of foetal skin. **Archives Of Oral Biology**, [S.L.], v. 59, n. 10, p. 1048-1055, 2014.

GOLLOB, K. J.; ANTONELLI, L. R.V.; FARIA, D. R.; KEESEN, T. S.L.; DUTRA, W. O. Immunoregulatory mechanisms and CD4-CD8- (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology. **International Immunopharmacology**, [S.L.], v. 8, n. 10, p. 1338-1343, out. 2008.

GOLLOB, K. J.; VIANA, A. G.; DUTRA, W. O.. Immunoregulation in human American leishmaniasis: balancing pathology and protection. **Parasite Immunology**, [S.L.], v. 36, n. 8, p. 367-376, ago. 2014.

GONZÁLEZ, K.; DIAZ, R.; FERREIRA, A. F.; GARCÍA, V.; PAZ, H.; CALZADA, J. E.; RUÍZ, M.; LAURENTI, M.; SALDAÑA, A. Histopathological characteristics of cutaneous lesions caused by *Leishmania Viannia panamensis* in Panama. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [S.L.], v. 60, p. 1-9, 15 fev. 2018.

GRISHAGIN, I. V. Automatic cell counting with ImageJ. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 473, p. 63-65, mar. 2015.

GUIMARÃES, L.H.; MACHADO, P.R.L.; LAGO, E.L.; MORGAN, D.J.; SCHRIEFER, A.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E.M. Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of *Leishmania braziliensis* in the state of Bahia, Brazil. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 103, n. 7, p. 712-715, 2009.

HUANG, L.; DENG, J.; XU, W.; WANG, H.; SHI, L.; WU, F.; WU, D.; NEI, W.; ZHAO, M.; MAO, P. CD8+ T cells with high TGF- β 1 expression cause lymph node fibrosis following HIV infection. **Molecular Medicine Reports**, p. 77-86, 3, 2018.

HYNES, R. O.; NABA, A.. Overview of the Matrisome--An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions. **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**, v. 4, n. 1, p. 4903-4903, 2011.

JACINTHO, A. P. P.; MELO, G. D.; MACHADO, G. F.; BERTOLO, P. H. L.; MOREIRA, P. R. R.; MOMO, C.; SOUZA, T. A.; VASCONCELOS, R. O. Expression of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 in the skin of

dogs with visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, [S.L.], v. 117, n. 6, p. 1819-1827, 18 abr. 2018.

JOLLIFFE, I.T. Principal Component Analysis and Factor Analysis. In: Principal Component Analysis, **Springer**, New York, 115-128. 1986

KILLICK-KENDRICK R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special references to the form infective to the vertebrate host. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 65 (suppl. 1): 37-42, 1990.

KOH, C. C; WARDINI, A. B.; VIEIRA, M; PASSOS, L. S. A.; MARTINELLI, P. M; NEVES, E. G. A.; ANTONELLI, L. R.V; BARBOSA, D. F; VELIKKAKAM, T; GUTSEIT, E. Human CD8+ T Cells Release Extracellular Traps Co-Localized With Cytotoxic Vesicles That Are Associated With Lesion Progression and Severity in Human Leishmaniasis. **Frontiers In Immunology**, v. 11, p. 1-19, 8 out. 2020.

LAINSON R, SHAW JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Vol. 1. **Biology and Epidemiology**. London: Academic; 1987. p. 1-120

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACK, W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: Apoptosis as infection-promoting factor. **Immunobiology**, New York, v. 213, n. 3/4, p. 183-191, 2008.

LEE, S. B; KALLURI, R. Mechanistic connection between inflammation and fibrosis. **Kidney International**, [S.L.], v. 78, p. 22-26, 2010

LESSA, M. M; LESSA, H. A; CASTRO, T. W.N.; OLIVEIRA, A; SCHERIFER, A; MACHADO, P; CARVALHO, E. M. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. **Brazilian Journal Of Otorhinolaryngology**, [S.L.], v. 73, n. 6, p. 843-847, 2007

LEE, H.G; EUN, H. C. Differences between fibroblasts cultured from oral mucosa and normal skin: implication to wound healing. **Journal Of Dermatological Science**, v. 21, n. 3, p. 176-182, 1999

MACHADO, P. R. L.; ROSA, M. E. A.; GUIMARÃES, L. H; PRATES, F.; V. O.; QUEIROZ, A; SCHRIEFER, A; CARVALHO, E. M. Treatment of Disseminated Leishmaniasis With Liposomal Amphotericin B. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 61, n. 6, p. 945-949, 5 jun. 2015.

MACK, M. Inflammation and fibrosis. **Matrix Biology**, [S.L.], v. 68-69, p. 106-121, ago. 2018.

MAGALHÃES, A. V; CHARINI, L. H; AICK, A. N. HISTOPATOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 24, n. 5, p. 1-10, 1982.

MANAMPERI, N. H.; OGHUMU, S.; PATHIRANA, N.; SILVA, M. V. C. de; ABEYEWICKREME, W.; SATOSKAR, A. R.; KARUNAWEEERA, N. D. In situ immunopathological changes in cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania donovani*. **Parasite Immunology**, v. 39, n. 3, p. e12413, 2017

MANN, S; FRASCA, K; SCHERRER, S; HENAO-MARTÍNEZ, A. F.; NEWMAN, S; RAMANAN, P; A SUAREZ, J. A Review of Leishmaniasis: current knowledge and future directions. **Current Tropical Medicine Reports**, [s. l], v. 8, n. 2, p. 121-132, 17 mar. 2021.

Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de **Vigilância em Saúde**, Departamento de **Vigilância** das Doenças Transmissíveis. - Brasília: Ministério da Saúde, **2017**.

MENEZES, J. P; SARAIVA, E. M.; ROCHA-AZEVEDO, B. The site of the bite: leishmania interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. **Parasites & Vectors**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-8, 4 Maio 2016.

METSALU, T; VILO, J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using principal component analysis and heatmap. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 1, p. 566-570, 2015.

Ministério da Saúde. **Pentoxifilina no tratamento da Leishmaniose Tegumentar Mucosa**. 199. ed. Brasília: Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, 2015. 21 p.

MOMEN H, CUPOLILLO E. Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2000; 95:583-8.

MORETTI, L; STALFORT, J; BARKER, T. H; ABEBAYEHU, D. The interplay of fibroblasts, the extracellular matrix, and inflammation in scar formation. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 298, n. 2, p. 101530, fev. 2022.

MOSSER, D M; EDELSON, P J. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. **The Journal Of Immunology**, [S.L.], v. 135, n. 4, p. 2785-2789, 1985.

MURPHREE, R. W.. Impairments in Skin Integrity. **Nursing Clinics Of North America**, [S.L.], v. 52, n. 3, p. 405-417, set. 2017.

NOVAIS, F. O; NGUYEN, B .; BEITING, D; CARVALHO, L; GLENNIE, N. D; PASSOS, S; CARVALHO, E. M; SCOTT, P. Human classical monocytes control the intracellular stage of *Leishmania braziliensis* by reactive oxygen species. **Journal Of Infectious Diseases**. [S.l.], p. 1-26. 7 Jan. 2014.

OLIVEIRA, W. N; RIBEIRO, L. E; SCHRIEFFER, A; MACHADO, P; CARVALHO, E. M.; BACELLAR, O. The role of inflammatory and anti-

inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. **Cytokine**, [S.L.], v. 66, n. 2, p. 127-132, abr. 2014.

PALOMINO, D. C. T; MARTI, L. C. Chemokines and immunity. **Einstein (São Paulo)**, v. 13, n. 3, p. 469-473, set. 2015.

PASSELLI, K; PRAT-LURI, B; MERLOT, M; GORIS, M; MAZZONE, M; TACCHINI-COTTIER, F. The c-MET receptor tyrosine kinase contributes to neutrophil-driven pathology in cutaneous leishmaniasis. **Plos Pathogens**, v. 18, n. 1, p. 1-24, 18, 2022.

POINAR JR G, POINAR R. Paleoleishmania proterus n. gen., n. sp., (Trypanosomatidae: Kinetoplastida) from Cretaceous Burmese amber. **Protist**. v. 10, p. 155-305, 2004.

RENU, K; VINAYAGAM, S; MADHYASTHA, H; MADHYASTHA, R; MARUYAMA, M; SUMAN, S; ARUNACHALAM, S; VELLINGIRI, B; GOPALAKRISHNAN, A. V. Exploring the Pattern of Metabolic Alterations Causing Energy Imbalance via PPAR α Dysregulation in Cardiac Muscle During Doxorubicin Treatment. **Cardiovascular Toxicology**, [S.L.], v. 22, n. 5, p. 436-461, 14 fev. 2022.

RIDLEY, D. S.; RIDLEY, M. J. The evolution of the lesion in cutaneous leishmaniasis. **The Journal Of Pathology**, v. 141, n. 1, p. 83-96, 1983.

RIOS, L. C; AMARAL, C. A; PINTO, D. C. S; SIMPLICIO SOBRINHO, V. R; MAGALHÃES, O. O; ARAÚJO, J. G. N; HIGINO, T. M. M; ALIANÇA, A. S. S. Leishmaniose Visceral: histórico, agente etiológico, ciclo biológico, vetor, diagnóstico e tratamento. **Tópicos nas Ciências da Saúde: Volume X**, [s. /], p. 98-107, 16 set. 2022.

RITTIG, M.G; BOGDAN, C. Leishmania-Host-cell Interaction: complexities and alternative views. **Parasitology Today**, [S.L.], v. 16, n. 7, p. 292-297, jul. 2000.

ROZARIO, T.; DESIMONE, D. W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view. **Dev. Biol.** v. 341, p. 126-140 2010.

SALDANHA, M. G; PAGLIARI, C; QUEIROZ, A; MACHADO, P. R. L; CARVALHO, L; SCOTT, P; CARVALHO, E. M; ARRUDA, S. Tissue Damage in Human Cutaneous Leishmaniasis: correlations between inflammatory cells and molecule expression. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, v. 11, p. 1-7, 2020.

SALARI, S; BAMOROVAT, Mi; SHARIFI, I; ALMANI, P. G. N. Global distribution of treatment resistance gene markers for leishmaniasis. **Journal Of Clinical Laboratory Analysis**, v. 36, n. 8, p. 1-16, 2022.

SAMPAIO, R. N. R; FERREIRA, M. F; MARTINS, S. S; MOTTA, J. O. C. Successful treatment of diffuse cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania

amazonensis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [S.L.], v. 96, n. 5, p. 602-604, set. 2021.

SCORZA, B; CARVALHO, E; WILSON, M. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 18, n. 6, p. 1-26, 18 jun. 2017.

SCOTT, P; NOVAIS, F. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, Philadelphia, Pennsylvania, v. 16, n. 9, p. 581-592, 2016.

SCHRIEFER, A.; SCHRIEFER, A. L. F.; GÓES-NETO, A.; GUIMARÃES, L. H.; CARVALHO, L. P.; ALMEIDA, R. P.; MACHADO, P. R.; LESSA, H. A.; JESUS, A. Ribeiro de; RILEY, L. W. Multiclonal *Leishmania braziliensis* Population Structure and Its Clinical Implication in a Region of Endemicity for American Tegumentary Leishmaniasis. **Infection And Immunity**, v. 72, n. 1, p. 508-514, 2004.

SHAPIRA, M; ZINOVIEV, A. *Leishmania* Parasites Act as a Trojan Horse that Paralyzes the Translation System of Host Macrophages. **Cell Host & Microbe**, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 257-259, abr. 2011.

SHIRKHORSHIDI, A. S; AGHABOZORGI, S; WAH, T. Y. A Comparison Study on Similarity and Dissimilarity Measures in Clustering Continuous Data. **Plos One**, v. 10, n. 12, p. e0144059, 2015.

SILVA, T.F, PENNA, A. L. B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Rev Inst Adolfo Lutz**. São Paulo, 71(3):530-9, 2012.

SILVA, J. A.; PINHEIRO, A. I; DOURADO, M. L; MEDINA, L; QUEIROZ, A; GUIMARÃES, L. H; LESSA, M. M; LAGO, E. L.; MACHADO, P. R. L.; WILSON, M. E. CARVALHO, E..M; SCHIRIEFER, A. *Leishmania braziliensis* causing human disease in Northeast Brazil presents loci with genotypes in long-term equilibrium. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 16, n. 6, p. 1-19, 15 jun. 2022.

SOUZA, J. A; HALVERSON, M. M; ANTUNES JUNIOR, H. J. V. Presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp em lesões de mamas inguiniais em cadela. **Pubvet**, [S.L.], v. 13, n. 7, p. 1-6, jul. 2019.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, [s. /], v. 10, n. 1, p. 1-10, 15 fev. 2017.

TAVOLATO, M; CORTIVO, R; SECCHI, A. G; ABATANGELO, G; LEONARDI, A. Th2 Cytokines Stimulate Collagen Production and Modify MMP-1 and TIMP-1 Balance in Conjunctival Fibroblasts . **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci**, v. 43, n. 13, p. 2256, 2002.

THEOCHARIS, A. D.; SKANDALIS, S. S.; GIALELI, C; KARAMANOS, N. K.. Extracellular matrix structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 97, p. 4-27, 2016

TURNER, C. T.; LIM, D; GRANVILLE, D. J. Granzyme B in skin inflammation and disease. **Matrix Biology**, [S.L.], v. 75-76, p. 126-140, Jan. 2019.

TAUNO METSALU, JAAK VILO, ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap, **Nucleic Acids Research**, v. 43, p. 566-570, 1 July 2015.

VAN ZANDBERGEN, G.; HERMANN, N.; LAUFS, H.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Leishmania Promastigotes Release a Granulocyte Chemotactic Factor and Induce Interleukin-8 Release but Inhibit Gamma Interferon-Inducible Protein 10 Production by Neutrophil Granulocytes. **Infection And Immunity**, [S.L.], v. 70, n. 8, p. 4177-4184, ago. 2002.

VIEIRA, E. L. M.; KEESEN, T. S. L.; MACHADO, P. R.; GUIMARÃES, L. H.; CARVALHO, E. M.; DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J. Immunoregulatory profile of monocytes from cutaneous leishmaniasis patients and association with lesion size. **Parasite Immunology**, [S.L.], v. 35, n. 2, p. 65-72, 9 jan. 2013.

VOLPEDO, G; HUSTON, R. H; A HOLCOMB, E; PACHECO-FERNANDEZ, T; GANNAVARAM, S; BHATTACHARYA, P; NAKHASI, H. L; SATOSKAR, A. R. From infection to vaccination: reviewing the global burden, history of vaccine development, and recurring challenges in global leishmaniasis protection. **Expert Review Of Vaccines**, [S.L.], v. 20, n. 11, p. 1431-1446, 15 set. 2021.

WENSINK, A. C.; HACK, C. E; BOVENSCHEN, N. Granzymes Regulate Proinflammatory Cytokine Responses. **The Journal Of Immunology**, [S.L.], v. 194, n. 2, p. 491-497, 15 Jan. 2015.

WOO, K; AYELLO, E. A.; SIBBALD, R. G. The Edge Effect. **Advances In Skin & Wound Care**, [S.L.], v. 20, n. 2, p. 99-117, few. 2007.

WOEHL, Viviane Mara; WOEHL, Oraide Maria. **Histologia 2**. 3. ed. Florianópolis: Lantec, 2016. 276 p.

WYNN, T; BARRON, L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. **Seminars In Liver Disease**, [S.L.], v. 30, n. 03, p. 245-257, 2010.

XAVIER, K. D; MENDES, F. C. F; ROSSI-BARBOSA, L. A. R. LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA: estudo clínico epidemiológico. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, [s. /], v. 14, n. 2, p. 1210-12