

Avaliação da expressão da interleucina 32 em lesões de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana.

Anetícia Eduarda Maldaner, Hélio Galdino Júnior, Sebastião Alves Pinto*, Fernanda Bugalho Duarte#, Aline Carvalho Batista§, Fátima Ribeiro-Dias.

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás

*Instituto Goiano de Hematologia e Oncologia

#Hospital Unique

§Faculdade de odontologia da UFG

E-mail: duda_maldaner@hotmail.com

Palavras- chave: Leishmaniose, interleucina 32, imunoistoquímica.

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecto-parasitária, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, acometendo pele e/ou mucosa nasofaríngea. O parasito é transmitido pela picada de um inseto vetor dos gêneros *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*. A maioria das infecções ocorre como zoonoses entre animais silvestres, geralmente roedores, sendo o homem um hospedeiro acidental no ciclo de transmissão (GONTIJO & CARVALHO, 2003; DESJEUX 2004). No Brasil, as três principais espécies de *Leishmania* causadoras de LTA são *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* (causadoras de lesões cutâneas localizadas e ulceradas, disseminadas ou mucocutâneas) e *L. (Leishmania) amazonensis* (causadora de lesões cutâneas localizadas ou difusas). Dentre estas espécies, *L. (V.) braziliensis* é a mais prevalente, sendo que cerca de 5% dos pacientes infectados por esta espécie desenvolvem a forma clínica mucosa que acomete as mucosas oral, nasal e a faringe, causando destruição tecidual e lesões desfigurantes (ASHFORD, 2000; GONTIJO & CARVALHO, 2003; Ministério da Saúde, 2007). Este amplo espectro clínico da LTA é devido a características do próprio parasito e da resposta imune do hospedeiro.

Revisado pela Orientadora Prof. Dra. Fátima Ribeiro Dias (IPTSP/UFG). Orientanda Anetícia Eduarda Maldaner (IPTSP/UFG). Doutorando Hélio Galdino Júnior (IPTSP/UFG). Colaborador Sebastião Alves Pinto (INGOH). Colaboradora Fernanda Bugalho Duarte (Hospital Unique). Colaboradora Prof. Dra. Aline Carvalho Batista (FO/UFG).

Na lesão da leishmaniose cutânea localizada (LCL), decorrente de infecção por *L. (V.) braziliensis*, o infiltrado celular inflamatório é moderado, os parasitos são escassos nos macrófagos, sendo mais frequente a presença de linfócitos e plasmócitos, compondo um granuloma epitelióide (SILVEIRA et al., 2004). PRIMEZ et al., 1993; SILVEIRA et al., 2004, descreveram que na LCL o perfil mais comumente encontrado é a predominância de citocinas de linfócitos Th1 (interferon gama, IFN γ ; fator de necrose tumoral, TNF) sobre Th2 (interleucina 4, IL-4). As citocinas Th1 são responsáveis pela resposta imune celular local que leva à cura da doença. Na leishmaniose mucosa (LM), forma mais grave e causada especialmente por *L. (V.) braziliensis*, as lesões apresentam um abundante infiltrado inflamatório histioplasmocitário e linfocitário, com macrófagos contendo escassos parasitos, sendo que em alguns pacientes há formação de granuloma tuberculóide. Os pacientes apresentam forte resposta imune celular (Th1), concomitante com uma progressiva destruição tecidual (PIRMEZ et al. 1993; SILVEIRA et al. 2004).

Apesar dos vários estudos sobre a imunologia da LTA, faz-se necessária uma melhor compreensão dos mecanismos que levam ao controle ou à persistência dos parasitos, especialmente com relação à infecção causada por *L. (V.) braziliensis*, que pode culminar na cura das lesões ou no desenvolvimento de lesões inflamatórias crônicas destrutivas. A interleucina 32 (IL-32) é uma citocina produzida pelos linfócitos T, células natural killer, monócitos e células epiteliais (KIM et al., 2005; NETEA et al., 2005), participando de diferentes processos inflamatórios (ALSALEH et al., 2010; HYUN-JA JEONG et. al., 2011). A expressão de IL-32 pode ser induzida por microrganismos, como por exemplo *Mycobacterium tuberculosis* (NETEA et al., 2006), mas ainda não é sabido se *Leishmania* sp induz IL-32.

Foram descritas quatro isoformas para a IL-32 humana (α , β , γ e δ). Citocinas como IL-18, IL-1 β e IFN γ induzem IL-32 em células epiteliais (IL-32 α e β). A IL-32 é também produzida por células NK, após estimulação com IL-12/IL-18, e por células mononucleares do sangue periférico ativadas por mitógeno (KIM et al., 2005). Por outro lado, a IL-32 recombinante (α e β) induz a produção de TNF e IL-8 em linhagem de monócitos humanos (THP-1) e de macrófagos murinos (Raw 264.7), apontando a IL-32 como uma potente citocina inflamatória. Ainda não está claro como a IL-32 é secretada, como outras famílias de citocinas, a IL-32 não apresenta um típico peptídeo sinal hidrofóbico na porção amino terminal, o qual faz a citocina ser secretada. A maior parte da IL-32 produzida permanece associada às células, intracelularmente ou na membrana. Assim, parece que a IL-32 pode

exercer seus efeitos quando liberada no meio, associada à membrana celular ou ainda pode agir intracelularmente como fazem a IL-1 β e o TNF (KIM et al., 2005; DINARELO & KIM, 2008). Portanto, parece haver uma alça de retroalimentação positiva na produção de IL-32 e citocinas pro-inflamatórias, especialmente a IL-1 β e o TNF α . Citocinas pro-inflamatórias atuam sobre o epitélio induzindo IL-32 e esta, por sua vez, induz mais produção destas citocinas, podendo gerar um processo inflamatório crônico que causa lesão tecidual.

Na LTA, tanto na forma cutânea quanto na mucosa, o sítio de infecção sofre influência do tecido epitelial, neste tipo de infecção a IL-32 pode ser importante tanto na imunidade inata quanto na adquirida. No início da infecção por *Leishmania*, após o reconhecimento de moléculas do parasito pelos receptores celulares, tais como receptores similares a *Toll* (TLR), citocinas pro-inflamatórias como a IL-1 β e o TNF, produzidos por macrófagos residentes, bem como o IFN γ , produzido por células NK que infiltram a lesão (SCHARTON & SCOTT, 1993), podem induzir as células epiteliais a produzirem IL-32. Esta citocina, por sua vez, pode contribuir para a diferenciação de monócitos em macrófagos (NETEA et al., 2008) e para a produção de mais moléculas pro-inflamatórias. A produção de IL-32 em níveis controlados pode contribuir com moléculas tais como o IFN γ e o TNF para a atividade microbicida dos macrófagos e eliminação dos parasitos ou pode amplificar respostas inflamatórias inadequadamente controladas que causem lesão tecidual. Assim, na infecção por *Leishmania*, a IL-32 pode contribuir para a exacerbação do processo inflamatório e da lesão tecidual, sendo que análises por imunistoquímica podem permitir a avaliação da expressão desta citocina em diferentes partes do tecido avaliado, auxiliando na compreensão da interação entre o microambiente e as células do infiltrado inflamatório, o que determina a modulação das respostas imunes locais.

2 OBJETIVO

Avaliar a expressão da IL-32 em lesões cutâneas e mucosas de pacientes com LTA, antes de iniciar o tratamento.

3 METODOLOGIA

Aspectos éticos, critérios de inclusão e diagnóstico de LTA: Os pacientes e indivíduos sadios leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes de doarem os fragmentos de tecidos cutâneo ou mucoso (Comitê de Ética em Pesquisa UFG, protocolo

165/08). Foram incluídos 18 controles e 20 pacientes diagnosticados com LTA (dados epidemiológicos e exame clínico associados com a positividade de um dos exames laboratoriais: intradermorreação de Montenegro, histopatológico/imunoistoquímica ou reação de imunofluorescência indireta), 10 pacientes com LC e 10 com LM. Foram excluídos pacientes com idade inferior a 18 anos ou pacientes que já estavam fazendo uso de medicação no momento da biópsia. Os pacientes foram atendidos no ambulatório de Endemias/HDT (Hospital de Doenças Tropicais Anuar Auad, Centro de referência de leishmanioses no Estado de Goiás) para diagnóstico clínico, tratamento e acompanhamento.

Obtenção das biópsias: Antes de iniciar o tratamento, após anestesia do local, usando punch, foram colhidos dois fragmentos de biópsias das bordas das lesões cutâneas e dois fragmentos de lesões mucosas (oral ou nasal) dos pacientes, bem como de mucosa oral ou cornetos nasais de doadores sadios (~3 mm) que se submeteram a cirurgias eletivas. Cada fragmento foi fixado em solução formalina, para posterior inclusão em parafina e obtenção de cortes para imunoistoquímica, como descrito em seguida.

Técnica de imunoistoquímica: Cortes de 3 µm foram realizados e dispostos em lâminas silanizadas. As lâminas foram passadas em xilol três vezes, 10 min. cada vez. O primeiro xilol foi aquecido em estufa a 55°C por 15 min., sendo as lâminas inseridas neste xilol por mais 10 min. A seguir as lâminas foram hidratadas em álcool passando por diferentes gradientes: três vezes em álcool absoluto por 2 min., uma vez em álcool 95% por 2 min. e uma vez em álcool 70% por 2 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas duas vezes em TBS (Tris-Buffered Saline) contendo Triton X-100 (Mallinckrodt Baker, inc., Paris, FR) e depois em água destilada morna (37°C). Logo após, as lâminas foram deixadas por 30 min. em tampão EDTA (pH 9,0), a 95°C. Em seguida, as lâminas foram mantidas no tampão EDTA em temperatura ambiente por 10 min., para resfriamento progressivo. Depois, as lâminas foram lavadas em PBS (salina tamponada com fosfato) com Triton X-100, e então incubadas com H₂O₂ 3% (Merck S.A) em PBS por 40 min., para bloqueio da peroxidase endógena. Após isto, as lâminas foram lavadas com TBS, secas cuidadosamente (ao redor do corte) e os cortes foram delimitados com caneta de silicone (Dako Cytomation) e foram adicionados cerca de 100 µL (dependendo do tamanho do corte) de Background Sniper (proteína bloqueadora, Starr Trek Universal HRP Detection System, Biocare Medical, Concord, CA, EUA) por 15 min, a temperatura ambiente. Após isso, a proteína bloqueadora foi removida e foi adicionado o anticorpo primário IgG policlonal de coelho anti-IL32 (Abcam Inc., Cambridge, MA, EUA), previamente diluído em diluente de anticorpo (1:100), com componente redutor de coloração de fundo (Dako cytomation). Foram utilizados 100 µL da solução do anticorpo para cada

lâmina. As lâminas ficaram incubadas no mínimo 8h em geladeira. (Depois disso, as lâminas foram lavadas em TBS e incubadas com o Link Universal Trekie (Starr Trek Universal HRP Detection System, Biocare Medical Inc., Concord, CA, EUA), por aproximadamente 20 min, utilizando-se 100 µL da solução para cada lâmina. Após isso, as lâminas foram novamente lavadas com PBS com Triton X-100 (100 µL) e incubadas com o TrekAvidin-HRP (Starr Trek Universal HRP Detection System, Biocare Medical, Concord, CA, EUA), por aproximadamente 20 min. As lâminas foram lavadas e tratadas com a solução DAB (100 µL por lâmina) por um tempo máximo de 30 seg. Então as lâminas foram imersas em água destilada. As lâminas foram contra coradas com hematoxilina por 30 seg. e lavadas em água corrente, por 5 min. Logo após, as lâminas foram passadas em uma seqüência de álcoois em diferentes concentrações, respectivamente, álcool 70%, álcool 95% e álcool absoluto por duas vezes, 1 min. cada. Depois, as lâminas foram passadas três vezes em Xilol, 2 min. cada, sendo em seguida montadas com lamínula, utilizando resina. A intensidade de expressão da IL-32 foi semiquantitativamente determinada, sendo os cortes avaliados sob microscopia de luz, em aumento de 400 vezes. A avaliação foi feita ao longo de 10 diferentes campos do infiltrado e do epitélio e os campos foram pontuados de acordo com a positividade das células para IL-32. Foram obtidos os escores de 0 para mínima ou ausente coloração; escore 1 para positividade de 1 a 25% das células de cada campo; escore 2 para 25 a 50% de positividade por campo; escore 3 para 50 a 75% de positividade por campo; escore 4 para 75% a 100% de positividade por campo. Os dados representam a média dos 10 campos quantificados. Foi quantificada a expressão de IL-32 no infiltrado inflamatório e no epitélio.

Análises estatísticas: Os dados representam os valores individuais e as medianas, tendo sido avaliados por teste Mann Whitney. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando o GraphPad Prism 5.0 Software Inc. (San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 A expressão de IL-32 está aumentada em lesões de pacientes com leishmaniose mucosa e cutânea.

A expressão de IL-32 foi determinada por meio da técnica de imunistoquímica em lesões de pacientes com LTA nas formas LC e LM, antes de iniciar o tratamento. Nas lesões de pacientes com LM foi observada uma maior expressão da IL-32 do que na mucosa sadia

(LM: 3 [2 a 4] x Controles: 1 [1 a 3], n = 10, p < 0,05, Figura 1A). A Figura 1B mostra que na LC também houve maior expressão de IL-32 nas lesões do que na pele sadia (LC: 3 [1 a 4] x Controles: 0,5 [0 a 2], n = 8-9, p < 0,05). Fotomicrografias representando as reações de imunoistoquímicas são apresentadas na Figura 2.

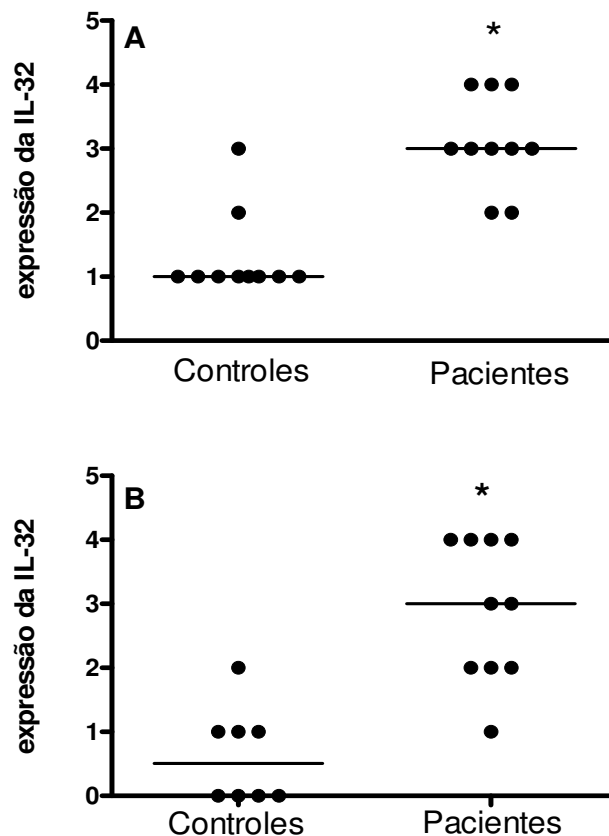


Figura 1. Expressão de IL-32 em lesões de pacientes com LTA. Fragmentos de lesões cutâneas e mucosas e de tecidos saudios foram incluídos em parafina e cortes de 3 µm foram submetidos a imunoistoquímica para IL-32. Após o desenvolvimento da reação, a expressão de IL-32 foi avaliada pela positividade das células, observadas ao microscópio de luz (400x), em 10 diferentes campos do corte histológico e pontuada segundo os escores: 0 (ausência de células positivas), 1 (1% - 25% das células positivas), 2 (25% a 50% das células positivas), 3 (50% a 75% das células positivas) e 4 (75% a 100% das células positivas). Os dados representam valores individuais e medianas. * p < 0,05 **A:** Expressão de IL-32 em lesões de pacientes com LM comparadas com mucosa sadia (Controles). **B:** Expressão de IL-32 em lesões de pacientes com LC comparadas com pele sadia (Controles).

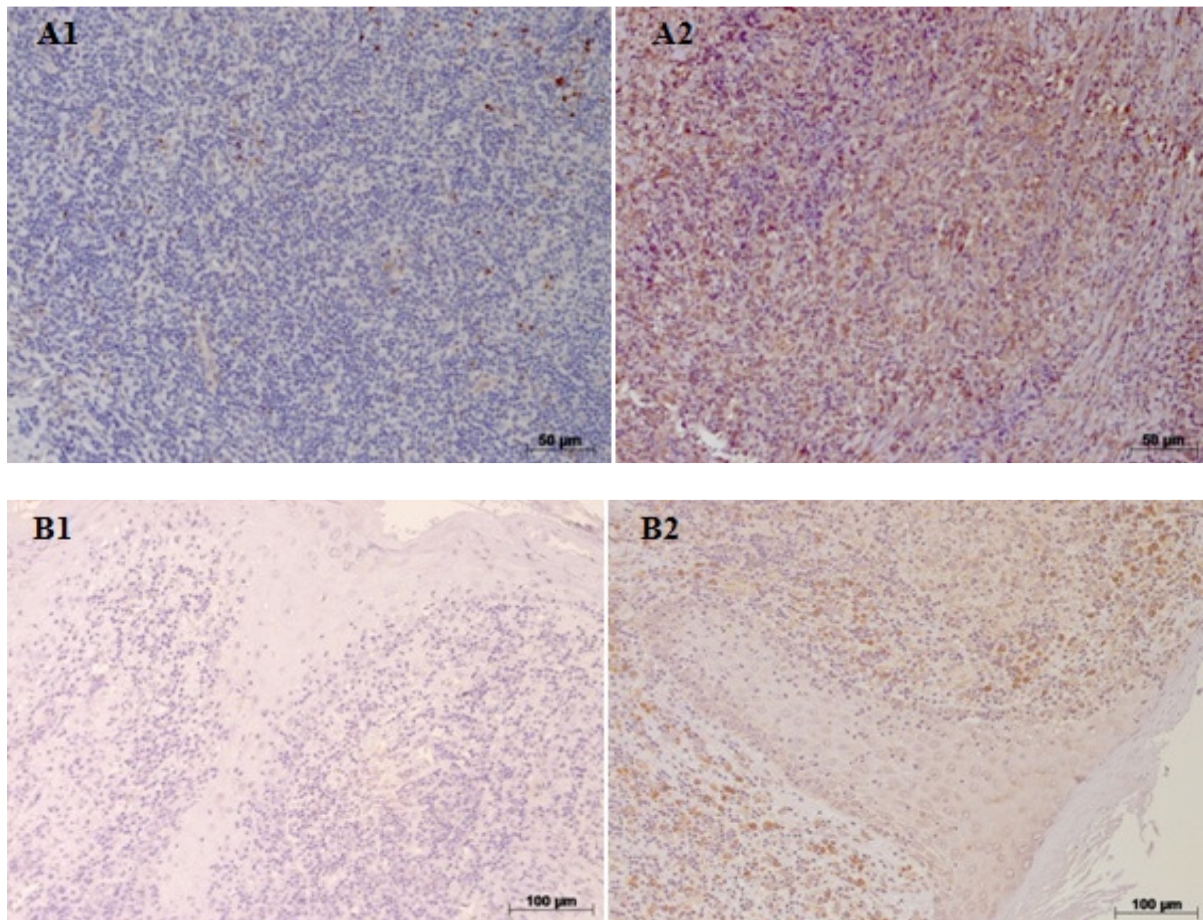


Figura 2. Fotomicrografias comparando o padrão de expressão de IL-32 em lesões de pacientes com LTA nas formas clínicas mucosa e cutânea com mucosa e pele saudáveis, respectivamente. Cortes histológicos de lesões de pacientes com LC e LM e de mucosa e pele saudáveis foram submetidos à imunohistoquímica para detecção de IL-32. A reação foi revelada com imunoperoxidase e diaminobenzidina, sendo contra-corada com hematoxilina. **A1:** mucosa saudável apresentando baixa positividade para expressão de IL-32. **A2:** lesão mucosa de paciente com LTA apresentando alta positividade para expressão de IL-32. **B1:** pele saudável negativa para expressão de IL-32. **B2:** lesão cutânea de paciente com LTA apresentando alta positividade para expressão de IL-32. Aumento 200x.

Uma vez que a expressão da IL-32 foi detectada nas duas formas clínicas da LTA, foi avaliado se havia diferença quanto à expressão desta citocina entre as diferentes formas clínicas, LM e LC. A Figura 3 mostra que o padrão de expressão da IL-32 é semelhante nas duas formas clínicas e que a positividade de expressão é similar (LM: 3 [2 a 4] x LC: 3 [1 a 4], n = 10). A Figura 4 ilustra estas semelhanças.

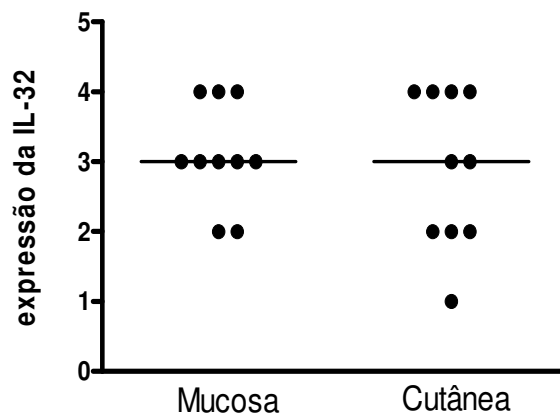


Figura 3. Comparação da expressão de IL-32 em lesões de pacientes com LC e LM. Fragmentos de lesões cutâneas e mucosas foram incluídos em parafina e cortes de 3 μm foram submetidos a imunohistoquímica para IL-32. A expressão de IL-32 nas lesões foi avaliada pela positividade das células, observadas ao microscópio de luz (400x), em 10 diferentes campos do corte histológico e pontuada segundo os escores: 0 (ausência de células positivas), 1 (1% - 25% das células positivas), 2 (25% a 50% das células positivas), 3 (50% a 75% das células positivas) e 4 (75% a 100% das células positivas). Os dados representam valores individuais e as medianas.

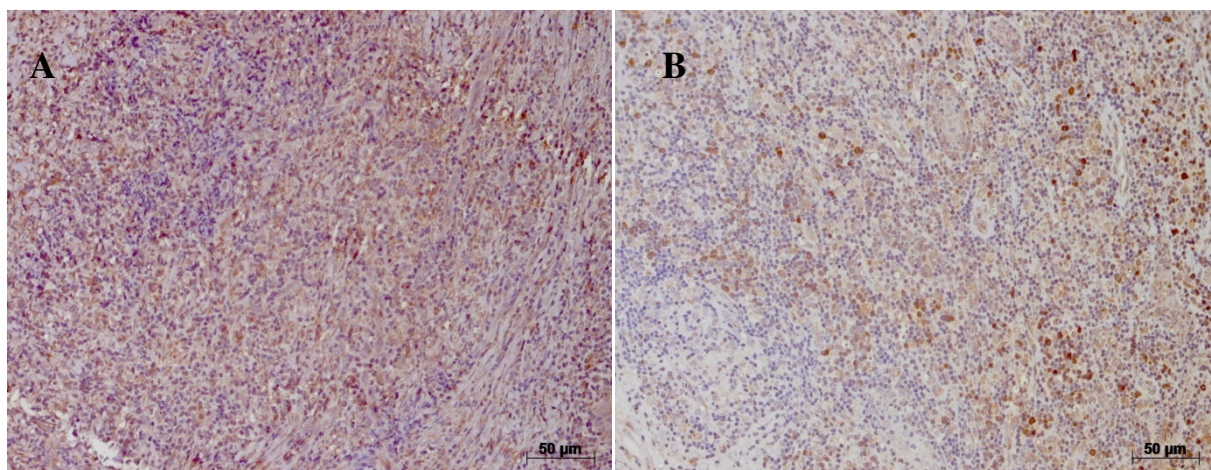


Figura 4. Fotomicrografias comparando a expressão de IL-32 entre as formas clínicas mucosa e cutânea de LTA. Cortes histológicos de lesões de pacientes com LM e LC foram submetidos à imunohistoquímica para detecção de IL-32. A reação foi revelada com imunoperoxidase e diaminobenzidina, sendo contra-corada com hematoxilina. **A:** lesão mucosa apresentando alta positividade para expressão de IL-32. **B:** lesão cutânea apresentando também alta positividade para expressão de IL-32. Aumento 200x.

4.2 A expressão da IL-32 foi distribuída de forma semelhante no epitélio e no infiltrado celular nas formas clínicas mucosa e cutânea.

Para avaliar se haviam diferenças quanto ao local de expressão da IL-32 nos tecidos, a expressão de IL-32 foi quantificada tanto no epitélio quanto no infiltrado celular inflamatório na derme e submucosa. A expressão da IL-32 foi detectada tanto no epitélio quanto no infiltrado inflamatório nas lesões de pele ou mucosa, não sendo atestada diferença significativa na intensidade da expressão da citocina nestes locais (Figura 5). A Figura 6 ilustra a expressão de IL-32 nos queratinócitos/células epiteliais e nas células mononucleares nos epitélios e nos infiltrados inflamatórios das lesões de pacientes com LM ou LC.

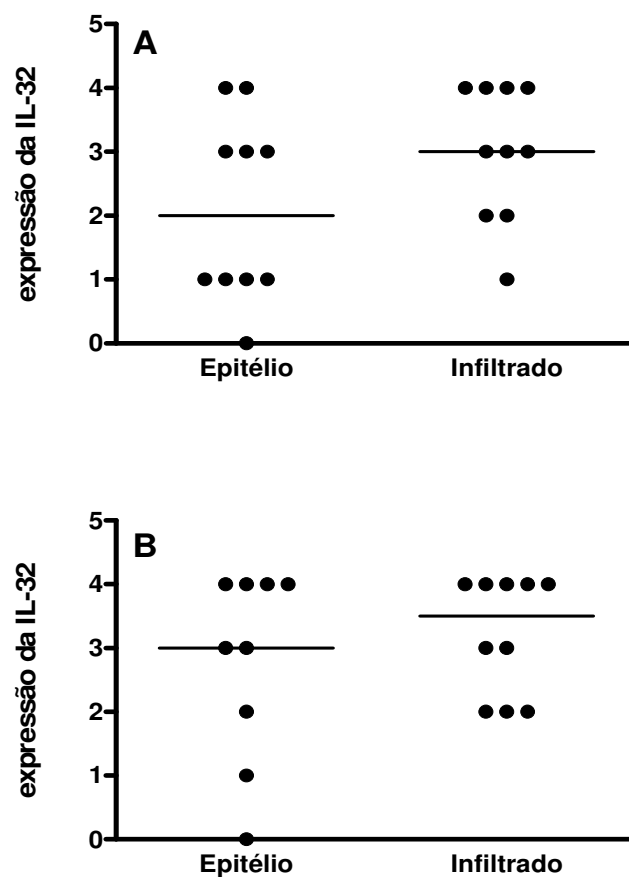


Figura 5. Comparação da expressão de IL-32 no epitélio e no infiltrado inflamatório de lesões de pacientes com LTA. Fragmentos de lesões cutâneas e mucosas foram incluídos em parafina e cortes de 3 μ m foram submetidos a imunoistoquímica para IL-32. A expressão de IL-32 nas lesões foi avaliada pela positividade das células, observadas ao microscópio de luz (400x), em 10 diferentes campos do corte histológico e pontuada segundo os escores: 0 (ausência de células positivas), 1 (1% - 25% das células positivas), 2 (25% a 50% das células positivas), 3 (50% a 75% das células positivas) e 4 (75% a 100% das células positivas). Os dados representam valores individuais e as medianas. **A:** Expressão de IL-32 no epitélio e no infiltrado de lesões de pacientes com LM. **B:** Expressão de IL-32 no epitélio e no infiltrado inflamatório de lesões de pacientes com LC.

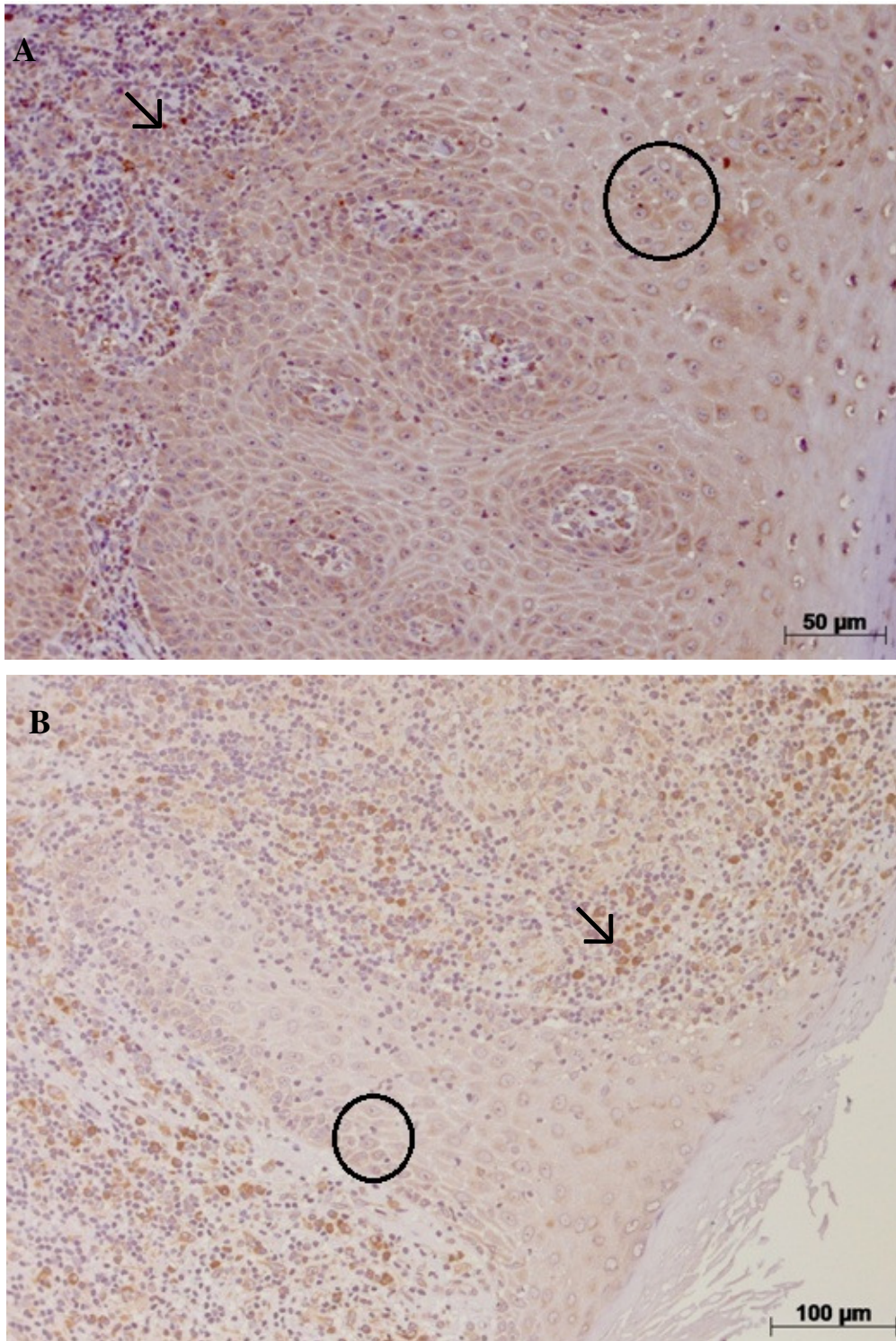


Figura 6. Fotomicrografias comparando a expressão de IL-32 nos epitélios e infiltrados celulares em lesões de LTA. Cortes histológicos de lesões de pacientes com LM e LC foram submetidos à imunohistoquímica para detecção de IL-32. A reação foi revelada com imunoperoxidase e diaminobenzidina, sendo contra-corada com hematoxilina. **A:** Representação de marcação de células do epitélio (área circulada) e células do infiltrado apresentando forte marcação (seta), Leishmaniose mucosa. **B:** Células do epitélio apresentando fraca marcação (área circulada) e células do infiltrado fortemente marcadas (seta), Leishmaniose cutânea. Aumento 200x.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi demonstrado, pela primeira vez, que há expressão aumentada de IL-32 nas lesões cutâneas e mucosas de pacientes com LTA quando comparada com tecidos saudáveis. A expressão de IL-32 tanto foi identificada no epitélio quanto nos infiltrados inflamatórios das lesões cutâneas e mucosas. A expressão de IL-32 no epitélio tem sido demonstrada em outras doenças inflamatórias (SHIOYA et al., 2007; NETEA et al., 2006; ALSALEH et al., 2010) portanto, nossos resultados reforçam que queratinócitos e células epiteliais de mucosas produzem IL-32. Tanto linfócitos quanto monócitos podem expressar IL-32 após diferentes estímulos (KIM et al., 2005). Aqui, nós identificamos a presença de IL-32 nas células mononucleares dos infiltrados inflamatórios, sugerindo que *Leishmania* sp ou citocinas induzidas por *Leishmania* sp são capazes de induzir a produção de IL-32 em macrófagos e/ou linfócitos. Estudos futuros devem esclarecer os mecanismos de indução de IL-32 na LTA, suas funções nas respostas imunes e se ela participa do controle da infecção.

6 CONCLUSÕES

- Células epiteliais e células mononucleares presentes nas lesões cutâneas ou mucosas de pacientes com LTA expressam IL-32.

Apoio financeiro: CNPq, CAPES e FAPEG

OBS: Houve alteração do título do plano de trabalho, para melhor adequação aos resultados obtidos.

Agradecimentos: Andréia de Souza Gonçalves (graduanda em Odontologia/FO/UFG), Ms. Ledice Inácia de Araújo Pereira, Dra. Miriam Leandro Dorta e Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira (IPTSP/UFG), Allyne Machado Pacheco (INGOH).

7 REFERÊNCIAS

ALSALEH, G.; SPARSA, L.; CHATELUS, E.; EHLINGER, M.; GOTTENBERG, J.; WACHSMANN, D.; SIBILIA, J. Innate immunity triggers IL-32 expression by fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. **Ar. Research & Therapy**. v.12, p.135, 2010.

ASHFORD, RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int J Parasitol**. v. 30, p. 1269-1281, 2000.

GONTIJO, B.; DE CARVALHO, ML. American cutaneous leishmaniasis. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 36, p. 71-80, 2003.

JEONG, HJ.; SHIN, SY.; OH, HA.; KIM, MH.; CHO, JS.; KIM, HM. IL-32 up-regulation is associated with inflammatory cytokine production in allergic rhinitis. **J of Pathol**. v.10, p.1002, 2011.

KIM, KH.; SHIM, JH.; SEO, EH, CHO, MC.; KANG, JW.; KIM, SH.; YU, DY.; SONG, EY.; LEE, HG.; SOHN, JH.; KIM, J.; DINARELLO, CA.; YOON, DY. Interleukin-32 monoclonal antibodies for immunohistochemistry, Western blotting, and ELISA. **J Immunol Methods**. v. 333, p. 38-50, 2008.

KIM, SH.; HAN, SY.; AZAM, T.; YOON, DY.; DINARELLO, CA. Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNFalpha. **Immunity**. v. 22, p. 131-142, 2005.

Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ª Edição. 182p. Ed. Ministério da Saúde, 2007. (http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lta_2ed.pdf).

NETEA, MG.; AZAM, T.; FERWERDA, G.; GIRARDIN, SE.; WALSH, M.; PARK, JS.; ABRAHAM, E.; KIM, JM.; YOON, DY.; DINARELLO, CA.; KIM, SH. IL-32 synergizes with nucleotide oligomerization domain (NOD) 1 and NOD2 ligands for IL-1beta and IL-6 production through a caspase 1-dependent mechanism. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 102, p. 16309-16314, 2005.

NETEA, MG.; AZAM, T.; LEWIS, EC.; JOOSTEN, LA.; WANG, M.; LANGENBERG, D.; MENG, X.; CHAN, ED.; YOON, DY.; OTTENHOFF, T.; KIM, SH.; DINARELLO, CA. *Mycobacterium tuberculosis* induces interleukin-32 production through a caspase-1/IL-18/interferon-gamma-dependent mechanism. **PLoS Med**. v. 3, p. 277, 2006.

NETEA, MG.; LEWIS, EC.; AZAM, T.; JOOSTEN, LA.; JAEKAL, J.; BAE, SY.; DINARELLO, CA.; KIM, SH. Interleukin-32 induces the differentiation of monocytes into macrophage-like cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 105, p. 3515-3520, 2008.

PIRMEZ, C.; YAMAMURA, M.; UYEMURA, K.; PAES-OLIVEIRA, M.; CONCEICAO-SILVA, F.; MODLIN, RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. **J Clin Invest**. v. 91, p. 1390-1395, 1993.

SCHARTON, TM.; SCOTT, P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. **J Exp Med**. v. 178, p. 567-577, 1993.

SHIOYA, M.; NISHIDA, A.; YAGI, Y.; OGAWA, A.; TSUJIKAWA, T.; KIM-MITSUYAMA, S.; TAKAYANAGI, A.; SHIMIZU, N.; FUJIYAMA, Y.; ANDOH, A. Epithelial overexpression of interleukin-32alpha in inflammatory bowel disease. **Clin Exp Immunol** 149: 480-486, 2007.

SILVEIRA, FT.; LAINSON, R.; CORBETT, CE. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 99, p. 239-251, 2004.