

Artigo Original

Polimorfismo *TGFB1* +29 não influencia apresentação clínica de pacientes com leishmaniose visceral***TGFB1* +29 polymorphism does not influence clinical presentation of patients with visceral leishmaniasis**<http://dx.doi.org/10.18316/sdh.v12i1.10742>

Claudio Ramos dos Santos¹ ORCID 0000-0001-8454-4192, Ana Caroline Lopes Leite¹ ORCID 0000-0002-6669-0695, Rafaela Tiemi Harakawa¹ ORCID 0000-0002-8002-4875, João Guilherme Araujo Matarazo¹ ORCID 0000-0002-9431-2747, Elaine Cristina Negri Santos¹ ORCID 0000-0001-8665-1936, Luiz Euribel Prestes Carneiro¹ ORCID 0000-0002-4577-1525, Thaís Batista de Carvalho¹ ORCID 0000-0003-0306-3077, Eliana Peresi-Lordelo ORCID 0000-0002-5320-6825

RESUMO

Introdução: A resposta imune a leishmaniose visceral (LV) depende de diversos fatores e, a presença de polimorfismos de base única (SNP) nos genes das citocinas, podem influenciar na progressão da doença. **Objetivo:** Avaliar a associação do SNP *TGFB1*+29 com a LV, além de verificar sua relevância funcional na resposta imune, através da associação com parâmetros clínicos e a gravidade da doença. **Materiais e métodos:** Foram genotipados 28 pacientes com diagnóstico comprovado para LV, por quadro clínico-epidemiológico e/ou diagnóstico imunológico, considerados curados e acompanhados pós-tratamento. Como controles, foram estudados 20 indivíduos saudáveis, não portadores de LV prévia ou outra doença infecciosa. A avaliação do SNP *TGFB1*+29 foi realizada através da técnica de discriminação alélica por PCR em tempo real. As análises foram realizadas pelo teste do χ^2 , considerando $p < 0,05$ como significativo. **Resultados:** Ambos os grupos de estudo apresentaram uma frequência de distribuição dos alelos T e C similar, portanto, não mostraram diferença significativa ($p=0,1146$). Com relação aos genótipos, os controles apresentaram uma maior frequência CT (55%), enquanto nos pacientes com LV essa distribuição foi equilibrada. Entretanto, não houve diferença significativa entre a distribuição de genótipos dos grupos estudados ($p=0,5172$). Não houve diferença entre os diferentes genótipos GG e AG/AA quando avaliados os sintomas de hepatomegalia ($p=0,9712$), perda ponderal ($p=0,3351$), esplenomegalia ($p=0,3351$), cefaleia ($p=0,7564$), febre ($p=0,4487$) e dor abdominal ($p=0,2310$). Verificamos que a maioria dos pacientes apresentavam um quadro grave ($n=21$), fato que não foi influenciado pelos diferentes genótipos do gene *TGFB*+29 ($p=0,6745$). **Conclusão:** O presente estudo não demonstrou associação de susceptibilidade ou resistência do *TGFB1* +29 com a LV, assim como, a associação dos diferentes genótipos com as manifestações clínicas e gravidade da doença.

Palavras-Chave: Leishmaniose visceral, citocina, Polimorfismo gênico

¹ Universidade do Oeste Paulista - Unoeste, Presidente Prudente, Brasil

* **Autor correspondente:** Rod. Raposo Tavares km 572. Presidente Prudente – SP. Brasil. CEP. 19067-175. E-mail: lordeloeliana@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: The immune response to visceral leishmaniasis (VL) depends on several factors, and the presence of single nucleotide polymorphisms (SNP) in cytokine genes can influence the progression of the disease. **Objective:** Evaluate the association of *TGFB1* +29 SNP with visceral leishmaniasis (VL), in addition to verifying its functional relevance in the immune response, through the association with clinical parameters and disease severity. **Material and methods:** Twenty-eight patients were genotyped with a proven diagnosis for VL, due to clinical-epidemiological and/or immunological diagnosis, considered cured and followed up after treatment. For controls, 20 healthy individuals, without previous VL or other infectious disease, were studied. The evaluation of the *TGFB1*+29 SNP was performed using the real-time PCR allelic discrimination technique. Analyzes were performed using the χ^2 test, considering $p < 0.05$ significant. **Results:** Both study groups had a similar frequency of distribution of the T and C alleles, with no significant difference ($p = 0.1146$). Regarding genotypes, controls showed a higher frequency for the CT genotype (55%), while in VL patients this distribution was balanced. However, there was no significant difference between the distribution of genotypes of the groups studied ($p = 0.5172$). There was no difference between the different genotypes GG and AG/AA when evaluating the symptoms of hepatomegaly ($p = 0.9712$), weight loss ($p = 0.3351$), splenomegaly ($p = 0.3351$), headache ($p = 0.7564$), fever ($p = 0.4487$) and abdominal pain ($p = 0.2310$). We found that most patients had a severe condition ($n = 21$), a fact that was not influenced by the different genotypes of the gene *TGFB*+29 ($p = 0,6745$). **Conclusion:** The present study did not demonstrate an association of susceptibility or resistance of *TGFB1*+29 with VL, as well as no association of different genotypes with the clinical manifestations and severity of the disease was found.

Keywords: Visceral leishmaniasis, Cytokine, Gene polymorphism

INTRODUÇÃO

Leishmaniose é o termo dado às doenças infecciosas causadas por parasitas intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania*. A doença possui três formas de apresentação clínica, a leishmaniose visceral (LV), a leishmaniose mucocutânea e a forma cutânea, auto resolutive na maioria dos casos ¹. A leishmaniose visceral é uma doença de curso crônico, de caráter antroponótico e de desenvolvimento sistêmico, que, quando não tratada precocemente, resulta em morte de 90% dos casos. Em 2019, o Brasil notificou 97% dos casos de LV que ocorrem nas Américas, com a média anual de 2.529 casos ao ano e coeficiente de incidência de 3,08 casos/100.000 habitantes para as populações consideradas de risco ².

A LV, também conhecida como *Kala-azar*, que significa febre negra em Hindi, é causada principalmente pelas espécies *Leishmania donovani* e *L. infantum*, sendo a última responsável pelos casos da doença na região do Mediterrâneo, Oriente Médio, Afeganistão, Iran, Paquistão e Brasil ^{3,4}. Sua transmissão ocorre através da picada de flebotomíneos fêmeas infectadas e, no Brasil, a espécie associada à transmissão é o *Lutzomyia longipalpis* ^{1,5}.

A epidemiologia da doença depende das características do parasita, da espécie de vetor, das características ecológicas dos sítios de transmissão, da exposição ao parasita e do comportamento humano, sendo o cão o principal reservatório do ciclo doméstico de transmissão da doença ^{1,4}.

A LV manifesta-se de dois a oito meses após a infecção e caracteriza-se por acessos irregulares de febre, perda de peso, fraqueza, hepatoesplenomegalia, linfadenomegalia e anemia. Alguns fatores, como a virulência da cepa e o estado imune do hospedeiro podem levar à diminuição do período de

incubação para 10 a 14 dias. Além disso, alguns pacientes podem apresentar hipergamaglobulinemia, com a presença de anticorpos anti-leishmania (não protetores) e de autoanticorpos, fato que pode confundir a apresentação clínica e promover o atraso no diagnóstico da doença⁶.

A resposta imune contra a LV inicia com a fagocitose do parasita, entretanto os macrófagos apresentam um papel complexo na patogênese da doença, podendo estar associados tanto à sobrevivência quanto à morte do parasita⁷. A produção de citocinas mostra-se essencial na função dos macrófagos, com linfócitos T auxiliares (Th) produtores de citocinas pró-inflamatórias, como o Fator de Necrose Tumoral (TNF), Interleucina-12 (IL-12) e Interferon-gama (IFN- γ) do perfil Th1, estimulando a imunidade protetora contra o parasita⁸. O IFN- γ é uma citocina importante para a indução da produção de óxido nítrico, agente microbicida com função crucial na mediação da morte da *Leishmania* intracelular⁹.

Por outro lado, a produção de outras citocinas, como o Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF- β), foi associada com a circulação de antígenos específicos e a carga parasitária em pacientes com LV, indicando o seu envolvimento na proliferação do parasita e progressão da doença¹⁰. Citocinas como o TGF- β e a IL-10 do perfil Th2, induzem a expressão de arginase, enzima que afeta diretamente a produção de óxido nítrico, comprometendo a estimulação da resposta imune protetora contra a *Leishmania*¹¹. Estudo realizado com pacientes com LV demonstrou que a falta da produção de óxido nítrico estava relacionada a um aumento significativo de arginase, induzida por elevados níveis de IL-10 e TGF- β . Esses dados sugerem que uma terapia de supressão para estes componentes poderia beneficiar o reestabelecimento da produção de óxido nítrico nos pacientes¹². Níveis elevados de TGF- β também foram associados à falha no tratamento de pacientes com LV e a leishmaniose dérmica pós-*Kala-azar*, que consiste em uma seqüela da doença^{13,14}.

Os genes das citocinas podem apresentar polimorfismos de base única (SNPs), que consistem em variações ou mutações na sequência do DNA envolvendo uma única base¹⁵. Desta forma, alguns alelos podem alterar a produção das citocinas podendo influenciar no desencadeamento ou controle do processo infeccioso, conferindo, portanto, uma maior susceptibilidade ou resistência ao seu portador¹⁶. Diversas interações parasita-hospedeiro têm sido estudadas na tentativa de compreender melhor o desenvolvimento da LV, entretanto poucos estudos têm avaliado a influência de polimorfismos presentes no gene *TGFB1* sobre a susceptibilidade e evolução da doença¹⁷⁻¹⁹.

Estudo que avaliou pacientes com LV assintomática, diagnosticada através da avaliação da resposta de hipersensibilidade tardia (DTH) à antígenos da *Leishmania*, demonstrou a associação de variantes no gene *TGFB1*, sugerindo que uma maior expressão de TGF- β nas células epiteliais da pele poderia promover um aumento da expressão da proteína queratoepitelina e modular a DTH²⁰. Weirather et al.²¹ avaliaram diversos SNPs associados à via do TGF- β , como o Receptor do Fator de Crescimento Transformador Beta Tipo 2 (*TGFBR2*), sugerindo que a regulação desta via poderia promover um balanço entre a estimulação da cicatrização das lesões, presentes em pacientes DTH, e a promoção da evolução dos sintomas da LV.

Diante deste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a associação do SNP *TGFB1*+29 com a LV, além de verificar sua relevância funcional na resposta imune, através da associação com parâmetros clínicos e a gravidade da doença.

MATERIAIS E MÉTODOS

População do estudo

Este é um estudo prospectivo e transversal, no qual foram avaliados 28 pacientes com LV, dentre os quais 18 homens, com média de idade de 51 anos (mínima 19 anos; máxima 76 anos) e 10 mulheres, com média de idade de 43 anos (mínima 20 anos; máxima 82 anos), atendidos no Ambulatório de Infectologia do Hospital Regional de Presidente Prudente, com diagnóstico de LV comprovado por quadro clínico-epidemiológico e/ou diagnóstico imunológico, pelos testes laboratoriais, Imunoenzimático (ELISA), ou Imunofluorescência indireta (IFI). No momento da coleta de sangue para a avaliação do SNP, todos os pacientes eram considerados curados para a parasitose e, haviam completado o tratamento com média de tempo pós-tratamento de 59,48 meses (mínimo 12 meses; máximo 108 meses). Os dados clínicos e laboratoriais empregados para as análises foram coletados por levantamento dos prontuários, no período de diagnóstico da doença de cada paciente. Para a avaliação da gravidade da doença foram utilizados três critérios: hepatomegalia, esplenomegalia e disfunção hepática (Transaminase Glutâmico Oxalacética (TGO) > 100 U/l e/ou Transaminase Glutâmico-Pirúvica (TGP) > 100 U/l). Os pacientes foram classificados com LV grave na presença de pelo menos dois dos três critérios utilizados.

Foram estudados como controles 20 indivíduos saudáveis, não portadores de LV prévia ou outra doença infecciosa, maiores de 18 anos, recrutados no Núcleo de Hemoterapia de Presidente Prudente/SP. Foram incluídos apenas os pacientes e controles que concordaram em participar do estudo, após o devido esclarecimento e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (50411715.0.0000.5515) e está de acordo com a Declaração de Helsinki de 1964.

Genotipagem do SNP *TGFB1 +29*

Para as genotipagens, foram colhidas amostras de 5 mL de sangue periférico em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), dos grupos controle e LV, em um único momento. O sangue foi centrifugado por 20 minutos a 1500 rotações por minuto (rpm) e o anel rico em leucócitos foi coletado em novo tubo de 1,5 mL e armazenado em freezer (-80°C) até o momento da extração. O DNA genômico foi extraído de leucócitos empregando um reagente comercial DNazol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e armazenado em freezer (-80°C) até o momento da genotipagem, de acordo com as instruções do fabricante.

A quantificação e pureza do DNA extraído foram determinadas em espectrofotômetro (NanoDrop 2000 Thermo Fisher Scientific) e a genotipagem foi realizada pela técnica de discriminação alélica utilizando sistema TaqMan (Applied Biosystems) em aparelho de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real modelo StepOne Plus (Applied Biosystems), utilizando-se 20 µg/µL de DNA por amostra, de acordo com as instruções do fabricante. Após a genotipagem do SNP *TGFB1+29*, os resultados foram analisados conforme a distribuição dos alelos (C/T) ou dos genótipos (CC/CT/TT).

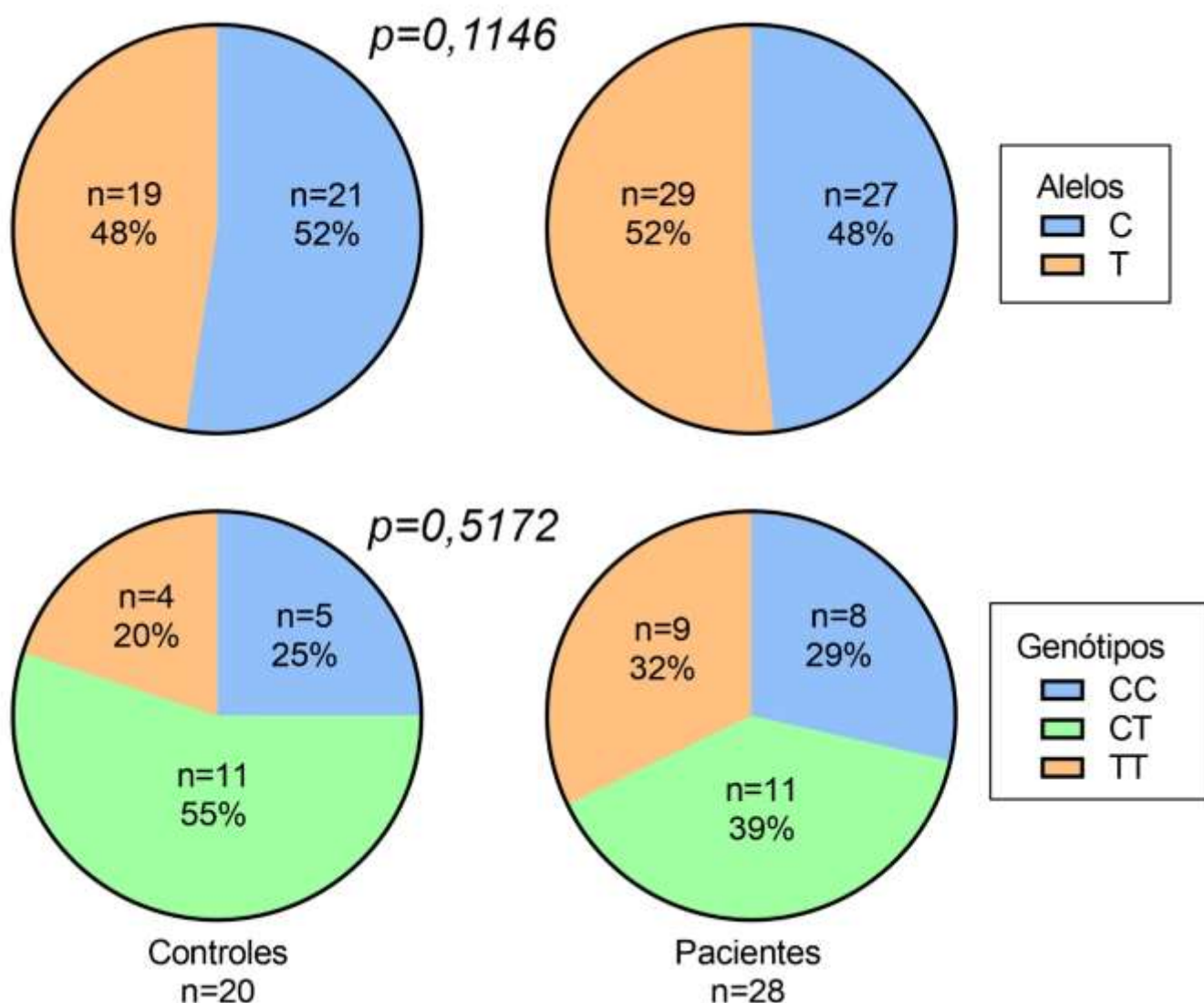
Análise dos dados

A associação dos diferentes alelos e genótipos entre o grupo LV e controle e a associação dos diferentes genótipos com as manifestações clínicas e a gravidade da LV foram realizados pelo teste do χ^2 . Foram considerados valores significativos aqueles em que $p < 0,05$.

RESULTADOS

Ambos os grupos do estudo apresentaram uma frequência de distribuição dos alelos T e C similar, não mostrando diferença significativa ($p=0,1146$). Com relação aos genótipos, os controles apresentaram uma maior frequência para o genótipo CT (55%), enquanto nos pacientes com LV essa distribuição foi equilibrada. Entretanto, não houve diferença significativa entre a distribuição de genótipos dos grupos estudados ($p=0,5172$) (Figura 1).

Figura 1. Perfil da distribuição dos alelos e genótipos do gene *TGFB* +29 no grupo de pacientes com leishmaniose visceral e no grupo controle. A análise dos dados foi realizada através do teste do χ^2 , considerando valores significativos $p<0,05$.

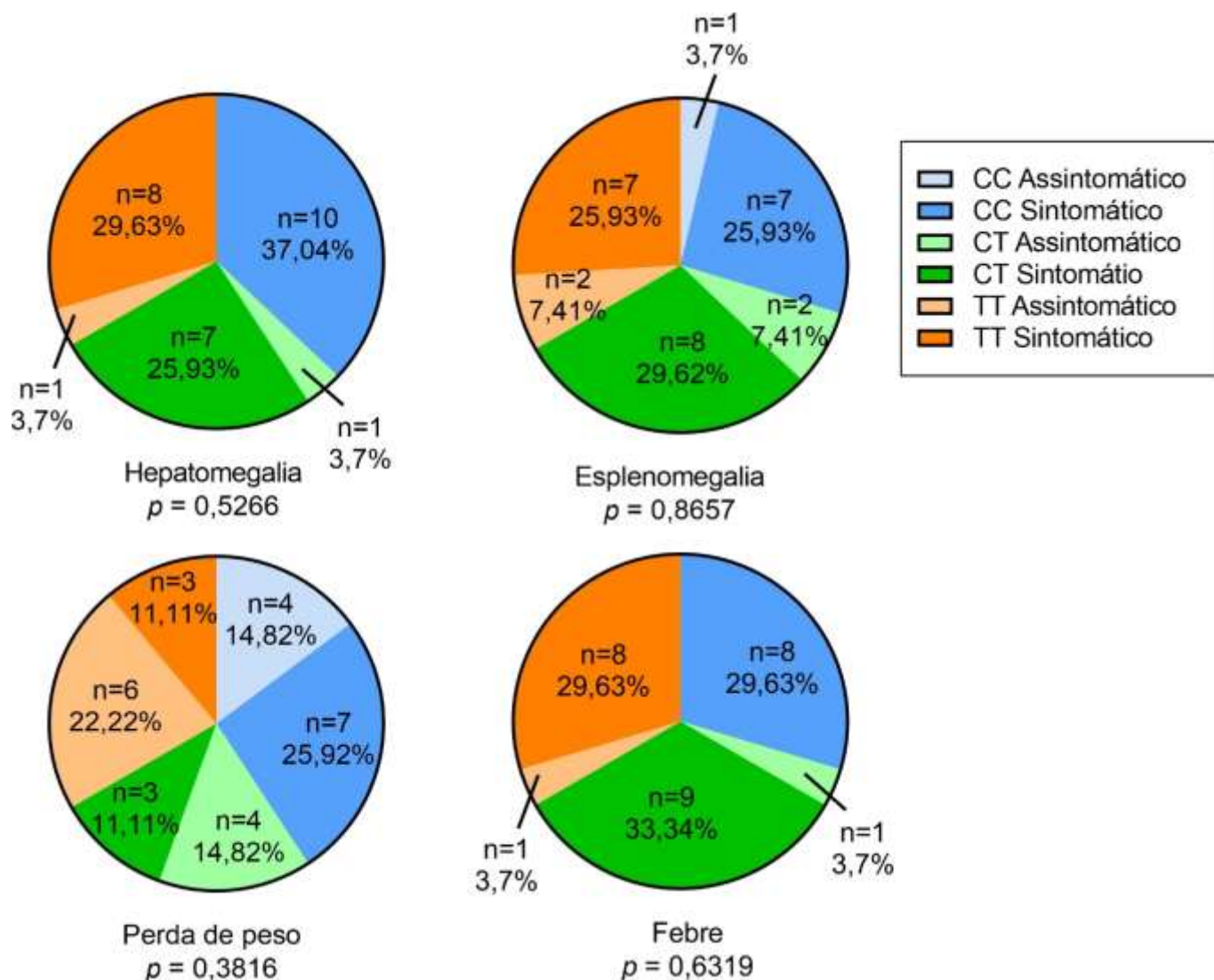


Fonte: Autores (2022)

A presença ou ausência das principais manifestações clínicas, no momento do diagnóstico, associadas aos genótipos correspondentes a cada paciente, estão apresentadas na Figura 2. Não houve diferença entre os genótipos estudados quando avaliados os sinais e sintomas de hepatomegalia ($p=0,5266$), esplenomegalia ($p=0,8657$), perda de peso ($p=0,3816$) e febre ($p=0,6319$). Esta avaliação foi

realizada em apenas 27 pacientes, devido à falta de informações presentes no prontuário.

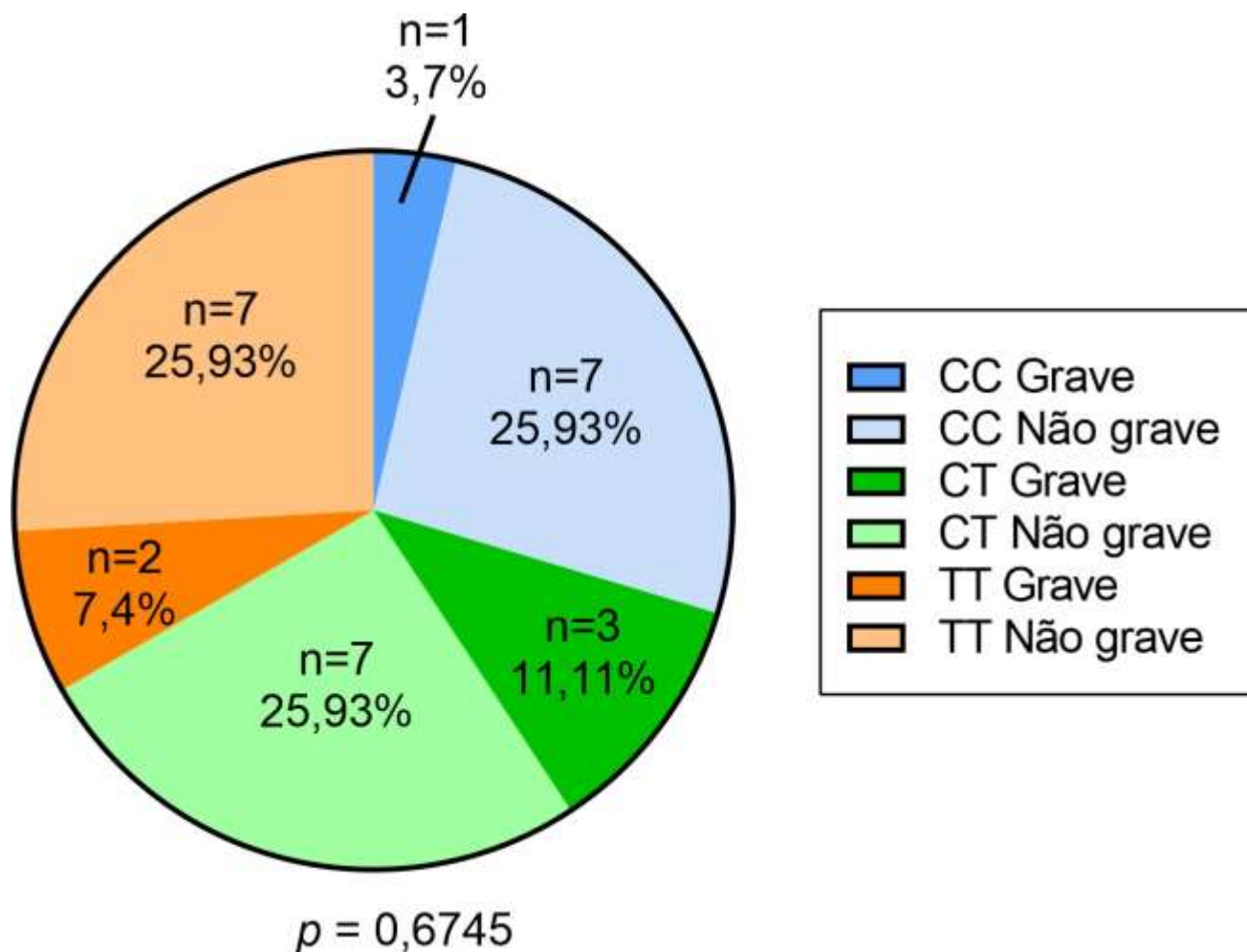
Figura 2. Perfil com as principais manifestações clínicas dos pacientes com leishmaniose visceral (n=27) segundo a distribuição dos genótipos do SNP *TGFB* +29. A análise dos dados foi realizada através do teste do χ^2 , considerando valores significativos $p < 0,05$.



Fonte: Autores (2022)

Quando avaliamos a gravidade da LV, verificamos que a maioria dos pacientes apresentavam um quadro grave (n=21), fato que não foi influenciado pelos diferentes genótipos do gene *TGFB* +29 ($p=0,6745$) (Figura 3). Esta avaliação foi realizada em apenas 27 pacientes, devido à falta de informações presentes no prontuário.

Figura 3. Associação da gravidade da leishmaniose visceral com os genótipos do SNP *TGFB* +29 de pacientes com leishmaniose visceral (n=27). A análise dos dados foi realizada através do teste do χ^2 , considerando valores significativos $p < 0,05$.



Fonte: Autores (2022)

DISCUSSÃO

A LV é uma doença de ampla distribuição mundial, sendo causada por um parasita intracelular obrigatório, conhecido como *Leishmania*. Esse parasita apresenta tropismo pelas células do sistema fagocítico mononuclear, aproveitando-se do mecanismo de fagocitose para se replicar no interior dos macrófagos⁹. O TGF- β é uma das citocinas que influenciam no balanço Th1/Th2 na resposta anti-leishmania, atuando com outras citocinas do perfil Th2, como a IL-10, para desestimular a resposta dos macrófagos e o perfil Th1²². Ao contrário da IL-10, o impacto do TGF- β é marginal, e, quando ativado localmente, favorece o crescimento do parasita ao modular a resposta imune inata e adaptativa²³. Desta forma, a evolução da LV depende de diversos fatores, como patogenicidade do parasita, hábitos do próprio indivíduo, imunogenicidade e fatores genéticos, conferindo assim, uma maior ou menor susceptibilidade para desenvolver um quadro sintomatológico²⁴.

No presente estudo não foram observadas diferenças entre os controles e pacientes com LV na distribuição dos alelos e genótipos do SNP *TGFB* + 29. Estudo realizado por Frade et al.¹⁷ avaliaram pacientes brasileiros com LV sugere que a presença do alelo T do gene *TGFB*1 -509C/T possa contribuir com a suscetibilidade à infecção pela *Leishmania* e evolução para um pior prognóstico da doença, entretanto, o mesmo estudo não demonstrou associação com o SNP *TGFB*1+869 T/C. Da mesma maneira, outro estudo que avaliou a população iraniana observou uma relação de

suscetibilidade do gene *TGFB1* -509 C/T (18). Outro estudo brasileiro, verificou que SNPs no gene *TGFB1* interferem na capacidade de organizar uma resposta imune adaptativa contra a infecção pela *L. infantum*, avaliada através do teste de Montenegro ou pela resposta de hipersensibilidade tardia (DTH), demonstrando que este gene está envolvido nos mecanismos de resistência ao protozoário¹⁹. Estudo nacional que avaliou SNPs relacionados com a via do TGF- β , através do gene do receptor tipo 2 do TGF- β (*TGFB2* rs6785358), demonstrou associação com pacientes com LV. Entretanto, a avaliação de um membro inibidor da via de sinalização do TGF- β , o *SMAD7* (rs7238442), demonstrou associação com pacientes assintomáticos com teste de DTH reagente. Desta forma, os autores sugerem que a via do TGF- β possui um papel importante no direcionamento do desfecho da infecção com *L. infantum* na população brasileira²¹.

Sabendo-se que o SNP *TGFB1* +29 pode ter um efeito funcional na produção do TGF- β , avaliou-se a sua associação com as manifestações clínicas e a gravidade dos pacientes com leishmaniose visceral. De forma geral, os pacientes apresentaram grande variabilidade nas manifestações clínicas, destacando-se hepatomegalia, febre e esplenomegalia, sintomas descritos também por outros autores³. O presente estudo não demonstrou associação dos diferentes genótipos do *TGFB1* +29 com as manifestações clínicas apresentadas e a gravidade da doença, entretanto, o número de pacientes avaliados foi baixo, fato considerado como uma limitação do estudo. Apesar disso, até o momento, para o nosso conhecimento, este é primeiro trabalho que avaliou este tipo de associação.

CONCLUSÃO

O presente estudo não demonstrou associação de suscetibilidade ou resistência do *TGFB1*+29 com a LV, assim como, a associação dos diferentes genótipos com as manifestações clínicas e gravidade da doença, entretanto, não foi realizada uma avaliação funcional do gene, com a dosagem de TGF- β na circulação. Como perspectivas futuras, seria de grande valia analisar pacientes durante o período de diagnóstico e acompanhamento do tratamento, possibilitando melhor compreensão dos mecanismos de suscetibilidade à doença.

AGRADECIMENTO

À Associação Prudentina de Educação e Cultura - Apec pelo apoio financeiro (protocolo 2888).

Contribuição dos autores:

CRS: análise e interpretação dos dados, redação e aprovação final da versão publicada.

ACLL: análise e interpretação dos dados, redação e aprovação final da versão publicada.

RTH: obtenção dos dados, redação e aprovação final da versão publicada.

JGAM: análise e interpretação dos dados, redação e aprovação final da versão publicada.

ECNS: obtenção dos dados e revisão crítica e aprovação final da versão publicada.

LEPC: obtenção, análise e interpretação dos dados e revisão crítica e aprovação final da versão publicada.

TBC: análise e interpretação dos dados e revisão crítica e aprovação final da versão publicada.

EPL: concepção e planejamento do estudo, obtenção, análise e interpretação dos dados, redação e revisão crítica e aprovação final da versão publicada.

Conflito de interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

1. WHO WHO. *Leishmaniasis* [Internet]. [citado 29 de agosto de 2023]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
2. PAHO PAHO. LEISHMANIASIS *Epidemiological Report of the Americas* [Internet]. 2020. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53090>
3. van Griensven J, Diro E. Visceral leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am*. junho de 2012;26(2):309–22.
4. Bern C, Maguire JH, Alvar J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2(10):e313.
5. Mota TF, Sousa OMF de, Silva Y de J, Borja LS, Leite BMM, Solcà M da S, et al. Natural infection by *Leishmania infantum* in the *Lutzomyia longipalpis* population of an endemic coastal area to visceral leishmaniasis in Brazil is not associated with bioclimatic factors. *PLoS Negl Trop Dis*. 26 de agosto de 2019;13(8):e0007626.
6. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *The Lancet*. 15 de setembro de 2018;392(10151):951–70.
7. Birnbaum R, Craft N. Innate immunity and *Leishmania* vaccination strategies. *Dermatol Clin*. janeiro de 2011;29(1):89–102.
8. Jawed JJ, Banerjee S, Bandyopadhyay S, Parveen S, Chowdhury BP, Saini P, et al. Immunomodulatory effect of Arabinosylated lipoarabinomannan restrict the progression of visceral leishmaniasis through NOD2 inflammatory pathway: Functional regulation of T cell subsets. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother*. outubro de 2018;106:724–32.
9. Dayakar A, Chandrasekaran S, Kuchipudi SV, Kalangi SK. *Cytokines: Key Determinants of Resistance or Disease Progression in Visceral Leishmaniasis: Opportunities for Novel Diagnostics and Immunotherapy*. *Front Immunol* [Internet]. 2019 [citado 29 de agosto de 2023];10. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00670>
10. Bhattacharya P, Ghosh S, Ejazi SA, Rahaman M, Pandey K, Das VNR, et al. Induction of IL-10 and TGFβ from CD4+CD25+FoxP3+ T Cells Correlates with Parasite Load in Indian Kala-azar Patients Infected with *Leishmania donovani*. *PLoS Negl Trop Dis*. 1o de fevereiro de 2016;10(2):e0004422.
11. Osorio EY, Zhao W, Espitia C, Saldarriaga O, Hawel L, Byus CV, et al. Progressive Visceral Leishmaniasis Is Driven by Dominant Parasite-induced STAT6 Activation and STAT6-dependent Host Arginase 1 Expression. *PLOS Pathog*. 19 de janeiro de 2012;8(1):e1002417.
12. Kupani M, Sharma S, Pandey RK, Kumar R, Sundar S, Mehrotra S. IL-10 and TGF-β Induced Arginase Expression Contributes to Deficient Nitric Oxide Response in Human Visceral Leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2021 [citado 4 de setembro de 2023];10. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.614165>
13. Saha S, Mondal S, Ravindran R, Bhowmick S, Modak D, Mallick S, et al. IL-10- and TGF-beta-mediated susceptibility in kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis: the significance of amphotericin B in the control of *Leishmania donovani* infection in India. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15 de outubro de 2007;179(8):5592–603.
14. Elmekki MA, Elhassan MM, Ozbak HA, Mukhtar MM. Elevated TGF-beta levels in drug-resistant visceral leishmaniasis. *Ann Saudi Med*. 2016;36(1):73–7.
15. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. 15 de fevereiro de 2001;409(6822):928–33.

16. Amim LHLV, Pacheco AG, Fonseca-Costa J, Loredo CS, Rabahi MF, Melo MH, et al. Role of IFN- γ +874 T/A single nucleotide polymorphism in the tuberculosis outcome among Brazilians subjects. *Mol Biol Rep*. 1o de dezembro de 2008;35(4):563–6.
17. Frade AF, Oliveira LC de, Costa DL, Costa CHN, Aquino D, Van Weyenbergh J, et al. TGFB1 and IL8 gene polymorphisms and susceptibility to visceral leishmaniasis. *Infect Genet Evol*. 1o de julho de 2011;11(5):912–6.
18. Hamidi M, Hajilooi M, Bazmani A. *Association of transforming growth factor- β 1 gene polymorphism with Visceral leishmaniasis in an Iranian population*. abril de 2013;
19. Jeronimo SMB, Holst AKB, Jamieson SE, Francis R, Martins DRA, Bezerra FL, et al. Genes at human chromosome 5q31.1 regulate delayed-type hypersensitivity responses associated with *Leishmania chagasi* infection. *Genes Immun*. outubro de 2007;8(7):539–51.
20. Jeronimo SMB, Duggal P, Ettinger NA, Nascimento ET, Monteiro GR, Cabral AP, et al. Genetic predisposition to self-curing infection with the protozoan *Leishmania chagasi*: a genomewide scan. *J Infect Dis*. 15 de outubro de 2007;196(8):1261–9.
21. Weirather JL, Duggal P, Nascimento EL, Monteiro GR, Martins DR, Lacerda HG, et al. Comprehensive candidate gene analysis for symptomatic or asymptomatic outcomes of *Leishmania infantum* infection in Brazil. *Ann Hum Genet*. janeiro de 2017;81(1):41–8.
22. Sher A, Coffman RL. Regulation of Immunity to Parasites by T Cells and T Cell-Derived Cytokines. *Annu Rev Immunol*. 1992;10(1):385–409.
23. Gantt KR, Schultz-Cherry S, Rodriguez N, Jeronimo SMB, Nascimento ET, Goldman TL, et al. Activation of TGF- β by *Leishmania chagasi*: Importance for Parasite Survival in Macrophages 1. *J Immunol*. 1o de março de 2003;170(5):2613–20.
24. Bharati K. Human genetic polymorphism and Leishmaniasis. *Infect Genet Evol*. 1o de março de 2022;98:105203.

