

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**A VARIABILIDADE EM GENES DE RESPOSTA IMUNE EM
POPULAÇÕES NATIVAS AMERICANAS**

JULIANA DAL-RI LINDENAU

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Mara Helena Hutz

Porto Alegre, março de 2012.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

As pesquisas realizadas no laboratório de DNA do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul foram subvencionadas pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

A aluna recebeu bolsa de estudos concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

À Mara H. Hutz, pela dedicação de sua orientação e pela confiança depositada em mim ao longo de todos esses anos de convivência.

Aos meus pais, simplesmente por serem os melhores pais do mundo. Obrigada por todo o apoio e incentivo à minha formação. E aos meus irmãos.

Ao Luciano, por estar do meu lado me apoiando nos momentos difíceis e comemorando nos momentos felizes.

Ao pessoal do laboratório pelos momentos de descontração na hora do almoço, ou fora dela, e pela amizade.

À Deise (de novo), por sempre estar disposta a me ensinar a utilizar os programas que eu precisava e ter paciência todas as vezes que eu pedia socorro quando não funcionava.

Aos meus amigos de faculdade (e de sempre): Gabi, Dennis, Mauro, Rodrigo, Jorge e Luana, por não desistirem da nossa amizade mesmo com toda a correria do dia a dia.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS.

Ao Elmo, por estar sempre disposto a ajudar.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	5
RESUMO	7
ABSTRACT.....	9
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	10
I.1. Os nativos sul-americanos.....	11
I. 2. Os índios Aché, Guarani e Kaingang	12
I. 3. Resposta Imune e Imunogenética.....	13
I. 4. Imunogenética em indígenas	15
I. 5. Gene <i>VDR</i>	20
I. 6. Gene <i>SP110</i>	20
I. 7. Gene <i>P2X₇</i>	21
I. 8. Gene <i>PTPN22</i>	22
I. 9. Gene <i>IL-1β</i>	22
I. 10. Genes <i>IL12α</i> , <i>IL12β</i> e <i>IL12RB1</i>	23
I. 11. Genes <i>INF-γ</i> e <i>IFNγR1</i>	24
I. 12. Gene <i>TNFR1</i> :	28
I. 13. Gene <i>IL2</i> :	28
I. 14. Gene <i>IL10</i> :	29
I. 15. Gene <i>IL6</i> :	31
I. 16. Genes <i>IL4</i> e <i>IL4R</i> :	32
I. 17. Gene <i>IL8</i> :	33
I. 18. Gene <i>TNFα</i> :.....	33
CAPÍTULO II - JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	35
CAPÍTULO III – Cytokine allele frequencies among Native American populations	37
CAPÍTULO IV - DISCUSSÃO	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXO – The epidemiology of tuberculosis in South Native Americans populations: implications for immune response patterns.	74

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

AIDS: síndrome da imunodeficiência adquirida
BCG: *Bacillus Calmette-Guérin*
CL: leishmaniose cutânea
DA: distância genética de Cavalli-Sforza modificada
DRD2: receptor de dopamina tipo 2
DRD4: receptor de dopamina tipo 4
DTH: hipersensibilidade do tipo tardia
EUA/USA: Estados Unidos da América
GM: imunoglobulina de cadeia pesada
HBV: vírus da hepatite B
HCV: vírus da hepatite C
HIV: vírus da imunodeficiência humana
HLA: Antígeno Leucocitário Humano
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgE: imunoglobulina E
IgG: imunoglobulina G
IgM: imunoglobulina M
IL1B: interleucina 1 beta
IL2: interleucina 2
IL4: interleucina 4
IL4R: receptor de interleucina 4
IL6: interleucina 6
IL8: interleucina 8
IL10: interleucina 10
IL12 α : interleucina 12 alfa
IL12 β : interleucina 12 beta
IL12R β : cadeia beta do receptor da IL12
IL13: interleucina 13
INF γ : interferon gama
INF γ R: receptor de interferon gama

KM: imunoglobulina de cadeia leve
LAM: latino americano mediterrâneo
LT α : linfotóxina alfa
Lyp: fosfatase intracelular linfóide específica
MAF: frequência do alelo menos frequente
MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade
ML: leishmaniose visceral
MSMD: suscetibilidade mendeliana a doença micobacteriana
MTB: *Mycobacterium tuberculosis*
NB: Corpo Nuclear
NK: células exterminadoras naturais
P2X7: receptor purinérgico P2X7
PAMP: Padrão Molecular Associado ao Patógeno
PKDL: leishmaniose dermal pós-calazar
PPD: derivado de proteína purificada
PRR: Receptor de Reconhecimento de Padrão
PTPN22: proteína tirosina fosfatase, não receptor tipo 22
RSV: vírus sincicial respiratório
SARS: síndrome respiratória aguda severa
SNP: polimorfismo de nucleotídeo único
SP110: proteína de corpo nuclear
STR: sequência curta repetida em tandem
TCR: Receptor de Célula T
TB: tuberculose
TGF- β : fator de crescimento transformador beta
Th: célula T auxiliar
TI: Terras Indígenas
TLR: Receptor do tipo Toll
TNF α : fator de necrose tumoral alfa
TNFR1: receptor 1 do fator de necrose tumoral
VDR: Receptor de Vitamina D

RESUMO

As populações nativas americanas apresentam uma maior prevalência de doenças infecciosas do que as populações não nativas que habitam o mesmo ambiente. Evidências sugerem que essa maior prevalência seja o resultado de uma maior suscetibilidade às doenças infecciosas. Há uma gama de fatores que são responsáveis por essa maior suscetibilidade, sendo a habilidade de desenvolver uma resposta imune adequada aos patógenos intracelulares o principal deles. Essa habilidade é influenciada, em parte, por fatores genéticos. Vários são os genes relacionados com a diferenciação das células Th0 em Th1 ou Th2. Esses subconjuntos celulares desencadeiam padrões de resposta imune bastante diferenciados que são responsáveis pelo combate aos diferentes antígenos. Estudos que analisaram a suscetibilidade das populações nativas às doenças infecciosas demonstraram uma predominância de um padrão Th2 de resposta imune nesses grupos. Com o objetivo de investigar a variabilidade em genes de resposta imune em ameríndios, neste estudo foram analisados 32 polimorfismos em 18 genes envolvidos com a resposta imune identificados com resistência/suscetibilidade às doenças infecciosas (VDR, SP110, P2X7, PTPN22, IL1 β , IL12 α , IL12 β , IL12R β 1, IFN γ , IFN γ R1, TNF α , TNFR1, IL2, IL4R, IL4, IL8, IL10 e IL6). A amostra foi composta por 98 indivíduos da etnia Aché, 72 indivíduos Guarani-Ñandeva, 72 indivíduos Guarani-Kaiowá e 72 indivíduos Kaingang. A população Kaingang foi polimórfica para todas as variantes analisadas, enquanto que as demais populações apresentaram uma frequência do alelo menos frequente (MAF) abaixo de 0,1 em diversos SNPs. As variantes com essa baixa variabilidade foram nos genes SP110, PTPN22, TNF- α , IL-6, IL12R β 1, IL-10, IFN- γ , TNF- α R1 e IL-12 α , associados com um padrão Th1 de resposta imune. O grau de variabilidade dessas populações parece se correlacionar com miscigenação, a população Kaingang é a mais miscigenada e a mais variável, enquanto que a população Aché é não miscigenada e a menos variável. A relação entre baixa diversidade genética em Th1 e predominância de um padrão Th2 poderia explicar, ao menos parcialmente, a alta suscetibilidade das populações ameríndias às doenças infecciosas. A baixa variabilidade observada nesses grupos pode ser o resultado de um efeito fundador, de uma alta taxa de endocruzamento associado com o isolamento durante o processo de formação das tribos ou de seleção natural.

Estudos com outras populações ameríndias são necessários para um completo entendimento dos processos evolutivos que moldaram o sistema imune nessa etnia.

ABSTRACT

The Native Americans have a higher prevalence of infectious diseases than non-native populations living in the same environment. This highest prevalence is the result of a higher susceptibility to infectious diseases. There are several factors that are responsible for this higher susceptibility and the ability to develop adequate immunity to intracellular bacterial pathogens is the main factor. This ability is partly influenced by genetics. There are many genes associated with the Th0 differentiation in Th1 or Th2. These cells subsets trigger differentiated immune response patterns, which are responsible to combat different antigens. Studies that investigated native populations' susceptibility to infectious diseases showed that they have a predominance of Th2 immune response pattern. The aim of this study was to investigate the variability in response immune genes in Amerindians, considering 32 polymorphisms in 18 genes involves in the immune response, previously identified with resistance/ susceptibility to infectious diseases (VDR, SP110, P2X7, PTPN22, IL1 β , IL12 α , IL12 β , IL12R β 1, IFN γ , IFN γ R1, TNF α , TNFR1, IL2, IL4R, IL4, IL8, IL10 and IL6). The sample was composed by 98 individuals from the Aché population, 72 individuals from Guarani-Ñandeva, 72 individuals from Guarani-Kaiowá and 72 individuals from Kaingang populations. The Kaingang population was polymorphic for all variants investigated. The variants in SP110, PTPN22, TNF- α , IL-6, IL12R β 1, IL-10, IFN- γ , TNF- α R1 and IL-12 α genes showed minor allele frequencies lower than 0.1, which demonstrates that they are not polymorphic in these populations. Overall reduced variability was observed in these genes mainly in those associated with a Th1 immune pattern. The degree of variation was associated with admixture; the Kaingang the most admixed population showed more variability than the Aché where no admixture was detected. The relationship between low genetic diversity and Th2 predominance could explain at least partially the high susceptibility of these populations to infectious diseases. The low genetic variability in these genes could be explained through a founder effect or by high inbreeding associated with isolation during the tribalization process. The possibility also exists that these differences might be due to a restricted immune system shaped by natural selection. More Amerindian populations should be investigated to disclose the full spectrum of variation of these immune response genes in Amerindians before a conclusion could be reached.

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

I.1. Os nativos sul-americanos

Muitas perguntas permanecem sem resposta quando a questão é a origem das populações ameríndias, contudo um crescente número de estudos tem fundamentado algumas importantes conclusões em relação à origem desses povos. É consenso entre os pesquisadores que os povos indígenas das Américas são descendentes de um grupo de migrantes asiáticos, mas a datação dessa migração e a rota utilizada por esses migrantes, assim como sua origem ainda são pontos não completamente elucidados (Crawford, 1998; Fiedel, 1992; Jablonski, 2002).

Em revisão sobre o assunto, Salzano (2007) considerou evidências geológicas, arqueológicas, paleoantropológicas, morfológicas, lingüísticas, genéticas e microbiológicas e concluiu que o cenário mais provável para a colonização da América seria o de uma única onda de migração, originária das Montanhas Altai, na Sibéria, sem descontinuidade no tempo. Esses migrantes teriam entrado no continente há 15000 anos, provavelmente usando a costa do Pacífico como rota de dispersão.

Trabalhos posteriores ao de Salzano acrescentam importantes informações referentes a essa questão. Mulligan *et al.* (2008), baseados em dados de DNA mitocondrial (mtDNA), reforçaram o modelo de saída de Beríngia (Bonatto & Salzano, 1997a; b), considerando que os ancestrais ameríndios teriam permanecido de maneira estável na Beríngia por um período de 7000 a 15000 anos. Após, teria ocorrido uma rápida expansão para o interior da América cerca de 16000 anos atrás. A rota da expansão, se através do corredor livre de gelo ou ao longo da costa do Pacífico, não pôde ser elucidada nesse estudo. Há, na literatura, evidências favorecendo ambas as rotas de expansão para as Américas, sendo, portanto a dispersão dos migrantes asiáticos que vieram para as Américas uma questão ainda sem solução (Dillehay *et al.*, 2008; Waguespack, 2007).

Também se observam discrepâncias quando a questão é a data de colonização e o número de ondas de migração que ocorreram (Dillehay, 2009; Goebel *et al.*, 2008). Mesmo com essas incertezas em relação à data em que ocorreu a colonização, alguns estudos concordam que os indígenas já viviam nas Américas quando o complexo Clóvis surgiu (Dillehay *et al.*, 2008; Gilbert *et al.*, 2008; Waters & Stafford, 2007; Waters *et al.*, 2011). Portanto, até o momento, a única certeza que se tem em relação à colonização pré-histórica das Américas é que ela foi um evento realizado por migrantes asiáticos em uma datação precoce [revisão em Salzano (2011)].

As populações indígenas da América exibem marcadas diferenças culturais, lingüísticas e biológicas. No entanto, as origens e a natureza dessa variabilidade, assim como os processos que moldaram toda essa diferenciação entre os grupos, ainda não estão completamente estabelecidos (Perego *et al.*, 2010; Salzano & Bortolini, 2002; Salzano & Callegari-Jacques, 1988). Boa parte da história das populações nativas sul americanas tem sido decifrada através de informações provenientes de estudos morfológicos, grupos sanguíneos e HLA. Os trabalhos realizados mais recentemente envolvem, por exemplo, DNA mitocondrial (Perego *et al.*, 2010; Salzano, 2007), DNA do cromossomo Y (Bortolini *et al.*, 2003), e marcadores em cromossomos autossomos. Nessa última categoria podemos citar os estudos com os receptores de dopamina DRD2 e DRD4 (Hutz *et al.*, 2000; Tovo-Rodrigues *et al.*, 2010), com as seqüências curtas repetidas em tandem (STRs) (Callegari-Jacques *et al.*, 2011; Kohlrausch *et al.*, 2005) e com as inserções *Alu* (Heller *et al.*, 2004; Mateus Pereira *et al.*, 2005), dentre outros.

Atualmente, há cerca de 400 etnias indígenas nas Américas, com aproximadamente 50 milhões de indivíduos vivendo na América Latina, onde representam 10% da população total (PAHO, 2004). No Brasil, há 238 povos listados, sendo que 43 destes têm parte de sua população residindo em outro(s) país(es). Esses 238 povos somam, segundo o censo do IBGE 2010, 817.963 pessoas. Destas, 315.180 vivem em cidades e 502.783 em áreas rurais, o que corresponde aproximadamente a 0,42% da população total do país. A grande maioria das comunidades indígenas vive em terras coletivas, declaradas pelo governo federal para seu usufruto exclusivo. As chamadas Terras Indígenas (TIs) somam, hoje, 669 unidades (PIB, 2012).

I. 2. Os índios Aché, Guarani e Kaingang

Os Aché são uma população nativa do Paraguai oriental que utiliza uma língua do grupo Tupi e têm contato esporádico com não índios desde o século 17. Esse grupo apresenta marcadas diferenças fisiológicas em relação aos demais ameríndios. As principais diferenças são a presença de pele clara, barba espessa, maior tamanho do dedo indicador, estatura baixa, braços longos e pernas curtas (Hill e Hurtado, 1996).

Os primeiros antropólogos que estudaram a população Aché, acreditavam que eles eram descendentes de uma colonização viking precoce ou de uma tribo perdida de japoneses. Recentemente, Callegari-Jacques *et al.* (2008) observaram que eles apresentam um background Tupi, com considerável introgressão de material genético

Jê. Essa incorporação de material Jê seria possivelmente através de capturas de indivíduos em guerras, uma vez que se sabe que essa absorção era um traço cultural comum em tribos Tupi-Guarani.

Os Guaranis habitam áreas do Paraguai, Bolívia, Argentina e sul do Brasil, onde são uma das etnias com maior número de indivíduos. Eles utilizam uma língua classificada no tronco lingüístico Tupi-Guarani e possuem contato com não índios desde o período colonial. Contudo, a miscigenação não é muito alta, uma vez que os Guaranis vivem em reservas especialmente estabelecidas para eles (Menna-Barreto *et al.*, 2005). Atualmente, no Brasil, os índios Guarani vivem nos estados do Mato Grosso do Sul, São Paulo, Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul. Eles são divididos em três subgrupos, de acordo com o dialeto que falam: Ñandeva, Kaiowá e Mbyá (Kohlrausch *et al.*, 2005). Dados da Funasa/Funai de 2008, computam uma população de 51000 indivíduos para o Brasil (PIB, 2012).

Os Kaingangs são uma das principais tribos do sul do Brasil, assim como os Guaranis. Sua designação mudou ao longo do tempo, nos séculos 16 e 17 eram conhecidos como Guaianás, no século 19, como Coroados, até que em 1882 receberam a denominação de Kaingang. Apesar da proximidade física e do convívio ao longo de muitos séculos, diferem dos Guaranis em muitos aspectos culturais e biológicos. A língua dos Kaingang é da família Jê. Eles são reconhecidos como descendentes de nativos do platô sul-brasileiro. Eles dividem-se em dois grupos: Kamé e Kairu. Sua população foi drasticamente reduzida após o contato com os colonizadores europeus e, atualmente, são 33064 indivíduos que vivem em reservas nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, Santa Catarina e São Paulo (PIB, 2012). A agricultura é sua principal atividade de subsistência, embora a caça e a coleta de frutos também sejam importantes (Tsuneto *et al.*, 2003).

I. 3. Resposta Imune e a Imunogenética

Historicamente imunidade refere-se à proteção contra doenças, principalmente doenças infecciosas. As células e moléculas responsáveis pela imunidade formam o sistema imunológico e sua resposta coletiva e coordenada à introdução de substâncias estranhas (ou seja, substâncias que não são próprias do indivíduo) é denominada de resposta imunológica (Abbas *et al.*, 2008).

Uma definição mais abrangente de imunidade coloca-a como uma reação a substâncias estranhas, incluindo microorganismos e macromoléculas como proteínas e polissacarídeos, e a pequenas substâncias químicas que são reconhecidas como elementos estranhos independentemente das conseqüências fisiológicas ou patológicas de tal reação (Abbas *et al*, 2008). A imunidade é classicamente dividida em dois processos denominados de imunidade natural e imunidade adquirida. Contudo, em termos práticos, um número cada vez maior de estudos tem demonstrado que esses mecanismos interagem entre si para que ocorra o desenvolvimento da resposta imune (Janeway & Medzhitov, 2002; Medzhitov & Janeway, 2000).

A imunidade natural, ou inata, é a linha de defesa inicial contra os microorganismos, consistindo em mecanismos de defesa celulares e bioquímicos que já existiam antes do estabelecimento de uma infecção e que estão programados para responder rapidamente a esses episódios. Esse tipo de defesa caracteriza-se por uma resposta menos específica e de rápida assimilação, que apresenta uma duração limitada (Saalmüller, 2006). Seus principais componentes são as barreiras físicas e químicas, tais como o epitélio e as substâncias antibacterianas nas superfícies epiteliais; células fagocitárias como os neutrófilos, as células dendríticas e os macrófagos (Steinman, 1991; Steinman & Cohn, 1973) e células NK (natural killer); proteínas do sangue e citocinas (Glimcher *et al.*, 1977). Seus mecanismos de ação são baseados em receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), os quais reconhecem moléculas microbianas amplamente invariáveis e conservadas. Essas moléculas são conhecidas como padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs). Após reconhecer um PAMP, PRRs ativam diversos mecanismos que iniciam a inflamação e a resposta imune, ajudando a montar a resposta imune adaptativa (Barreiro & Quintana-Murci, 2010). A classe de PRRs melhor caracterizada é a dos receptores do tipo Toll-like (TLRs), que são expressos na superfície celular ou em compartimentos intracelulares e detectam microorganismos através do reconhecimento de vários produtos bacterianos e ácidos nucleicos virais (Akira *et al.*, 2006).

O outro tipo de imunidade é a adaptativa ou adquirida, onde há uma especificidade extraordinária para distinguir as diferentes moléculas e uma habilidade de “lembrar” e responder com mais intensidade a exposições subseqüentes ao mesmo microorganismo. Esse tipo de resposta necessita de mais tempo para se desenvolver, contudo, é mais específica e duradoura. Além disso, precisa ocorrer uma interação com o sistema imune

inato para que a ativação da imunidade adquirida seja efetiva (Saalmüller, 2006). Esse tipo de resposta é mediado pelos receptores de célula T (TCRs) e receptores de células B (Cooper & Alder, 2006). Há dois tipos de resposta adquirida: a humoral e a celular, dependendo do componente do sistema imunológico que está agindo.

A imunidade humoral é mediada pelas moléculas presentes no sangue e nas secreções das mucosas, chamadas de anticorpos, que são produzidas pelos linfócitos B. Esse é o principal mecanismo de defesa contra microorganismos extracelulares e suas toxinas, pois os anticorpos se ligam a eles e ajudam na sua eliminação (Lilic, 2009).

A imunidade celular é mediada pelos linfócitos T e promove a destruição de microrganismos ou a destruição de células infectadas por vírus e bactérias. Esses organismos têm a capacidade de sobreviver e proliferar dentro de células do hospedeiro onde estão protegidos da ação dos anticorpos, daí a necessidade da ação dos linfócitos T (Lilic, 2009).

Os linfócitos T auxiliares (Th) só conseguem exercer suas funções com a assistência das citocinas, que são pequenas proteínas que atuam na célula que as produzem ou em células próximas. São proteínas mensageiras que regulam o desenvolvimento, o reparo de tecidos e a resposta imune. Essas moléculas ligam-se aos receptores específicos na membrana, ativando uma cascata que leva à expressão de genes que induzem, aumentam ou inibem as vias de sinalização intracelular.

Diferentes citocinas ativam a expressão de diferentes genes que levam a diferenciação das células Th0 em Th1 ou Th2. A diferenciação em Th1 depende da ação das interleucina-12 (IL-12) e 3 (IL-3), do interferon gama (IFN- γ), e do fator de necrose tumoral beta (TNF- β). Já o processo de diferenciação em Th2 é mediado pelas IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 (Janeway, 1999).

I. 4. Imunogenética em indígenas

Há duas teorias principais que procuram explicar por que os nativos americanos são mais suscetíveis aos novos patógenos do que os não nativos, que são a hipótese da memória imunológica e a hipótese da heterozigosidade do HLA. Ambas consideram adaptações imunológicas.

A hipótese da memória imunológica argumenta que a falta de exposição aos patógenos na infância leva a um aumento na suscetibilidade a doenças infecciosas. Sem essa exposição primária, o sistema imune não está apto a responder de maneira efetiva

quando ocorrer a subsequente exposição (Neel, 1977). Essa hipótese sugere que após uma exposição adequada, a capacidade dos nativos de responder seria equivalente a dos não nativos.

A outra hipótese argumenta que uma baixa heterozigosidade relacionada ao HLA entre nativos americanos leva a uma menor diversidade de fenótipos resistentes a doenças do que entre hospedeiros não nativos, uma vez que os primeiros podem reconhecer um menor repertório de proteínas derivadas de patógenos (Black *et al.*, 1977). Essa hipótese sugere que mesmo com a adequada exposição aos patógenos na infância, os nativos nunca terão uma resposta imunológica equivalente aos não nativos.

Além do sistema HLA o balanço entre células Th1, Th2, Th9 e Th17 no hospedeiro é um ponto crítico para o entendimento da resposta imune nessas populações. Uma hipótese postula que esse balanço celular seja parcialmente devido à exposição ambiental durante a primeira infância. No entanto, esse mecanismo é muito diferenciado entre nativos americanos e não nativos, podendo ser um fator determinante para as diferenças na suscetibilidade às doenças (Erb, 1999).

Em caucasianos, neonatos têm uma resposta imune predominantemente do tipo Th2 e, por volta dos cinco anos de idade, esse padrão muda para uma resposta predominante do tipo Th1 (Wilson *et al.*, 1986). Essa mudança deve-se a capacidade de produzir IFN- γ , que é muito menor em bebês e crianças na primeira infância quando comparado com adultos (Holt *et al.*, 1992). Em populações não caucasianas, essa mudança no padrão de dominância parece não acontecer tão precocemente, e se ocorre, pode ser revertida mais tarde. Afro-americanos (Gold *et al.*, 1993; Von Behren *et al.*, 1999) e ameríndios tendem a ser mais Th2 dominantes do que Th1 dominantes (Kaplan *et al.*, 1980; Sousa *et al.*, 1997). As células Th2 estimulam uma produção maior de IgE (imunoglobulina E), que é um anticorpo, do que das demais imunoglobulinas e, através da medida dos níveis desse anticorpo distingue-se uma resposta Th2 dominante de uma Th1 dominante.

As células Th2 seriam as responsáveis pela defesa contra helmintos e ectoparasitas. A alta taxa de infecção por esses organismos em nativos Sul-Americanos (Hurtado *et al.*, 2003), junto com os traumas e a genética são os principais fatores responsáveis pela dominância da resposta do tipo Th2 nesses povos (Finkelman & Urban, 2001). Diversos trabalhos têm demonstrado que os traumas diminuem os níveis

de citocinas que estimulam genes de resposta Th1 e aumentam os níveis das citocinas que estimulam genes de resposta Th2 (Brune *et al.*, 1999; Decker *et al.*, 1996).

Considerando que a exposição ambiental a ferimentos, ectoparasitas e helmintos se mantém durante a história desses nativos, espera-se que seja encontrada uma alta variabilidade em genes de resposta Th2 em detrimento de Th1. Isso implica em um decréscimo na atividade Th1 em relação àquela observada em outras populações e uma conseqüente dificuldade de combater adequadamente patologias que exijam esse tipo de resposta.

As implicações desse novo modelo (hipótese do Th2) são inconsistentes com aquelas derivadas da hipótese de memória imunológica, mas são consistentes com as da hipótese da heterozigiosidade do HLA. Essa última atribui a suscetibilidade a baixa heterozigiosidade, enquanto que a hipótese do Th2 identifica outras regiões dos genes do sistema imune como essenciais para a resistência a doenças infecciosas e coloca agentes ambientais como essenciais para que ocorra a expressão de determinados genes.

Observando as freqüências alélicas encontradas para diversos genes relacionados com o padrão de resposta imune Th2 em diferentes populações (Tabela 1), podemos notar que os indígenas da etnia Xavante apresentam freqüências alélicas bastante diferentes daquelas descritas para os outros grupos étnicos (Zembruski *et al.*, 2010). A estrutura populacional das atuais populações ameríndias resulta de um intrincado conjunto de fatores incluindo as mudanças demográficas, as fissões e fusões de grupos, o contato entre grupos e os diferentes sistemas de cruzamento. Portanto, para explicar diferenças específicas, fatores genéticos devem ser analisados em conjunto com fatores etno-históricos.

Tabela 1- Freqüências do alelo menos freqüente em diferentes populações comparadas aos Xavantes.

Gene	dbSNP ID	Alelo	Freqüência (%)			
			Africanos	Europeus	Asiáticos	Xavante
VDR	rs2228570	A	17-24	34-44	26-51	32
SP110	rs3948464	T	12-27	8-15	0-1	<1
	rs2114592	T	14-28	10	15-26	0
P2X7	rs3751143	C	7-11	14-17	20-25	15

PTPN22	rs2476601	T	0-3	1-21	0-6	0
IL1B	rs1143629	T	55	63-83	46-60	30
IL12RB1	rs11575934	G	10-24	30-37	34-49	1
	rs375947	C	23-26	30-38	27-52	1
IFNGR1	rs1327474	G	3-98	34-43	3-6	6
	rs2234711	C	41-47	35-55	44-50	22
TNFR1	rs4149622	G	60-65	0	10-13	5
IFNG	rs2430561	A	68-76	49-73	64-68	2
IL2	rs2069762	G	0-6	23-38	24-56	17
IL10	rs1800872	C	52-77	45-83	27-77	32
	rs1800896	G	31-47	28-67	4-40	13
IL6	rs1800795	C	0-9	18-57	0-40	0
IL4	rs2243250	C	17-29	83-89	17-89	16
IL4R	rs1801275	G	83-90	22-33	7-23	33

Referências para as frequências alélicas nas populações mundiais podem ser encontradas em Zembruski et al. (2010)

Considerando a importância desses diferentes padrões de resposta imune, genes que codificam citocinas envolvidas na determinação desse padrão são pontos chave para o desenvolvimento da resistência ou da suscetibilidade a inúmeras patologias. A Tabela 2 apresenta alguns desses genes, assim como o tipo de resposta Th que os produtos deles desencadeiam na célula. Uma maior caracterização de cada um dos genes e das relações das variantes investigadas no presente estudo com doenças infecciosas é apresentada a seguir.

Tabela 2- Polimorfismos que foram analisados neste estudo, com suas respectivas localizações cromossômicas e tipo de resposta desencadeada.

Gene	Localização Cromossômica	Polimorfismo	dbSNP ID	Tipo de Resposta desencadeada
VDR	12q13.11	<i>FokI</i> <i>BsmI</i>	rs10735810/ rs2228570 rs 1544410	Th1

SP110	2q37.1	éxon 11 C>T íntron 6 C>T	rs3948464 rs2114592	Th1
P2X7	12q24	1513 A>C	rs3751143	Th1
PTPN22	1p13.3-p13.1	1858 C>T	rs2476601	Th1
IL1B	2q14	íntron 2 C>T -31C>T -511A>G	rs1143629 rs1143627 rs16944	Th2
IL12RB1	19p13.1	-641 A>G -1094 T>C	rs11575934 rs375947	Th1
IFNGR1	6q23.3	-611 G>A -56 T>C	rs1327474 rs2234711	Th1
TNFR1	12p13.2	íntron 1 A>G	rs4149622	Th1
IFNG	12q14	+874 A>T	rs2430561	Th1
IL2	4q23-q27	-330 T>G	rs2069762	Th1
IL10	1q31-q32	-592 A>C -819C>T -1082 A>G	rs1800872 rs1800871 rs1800896	Th2
IL6	7p21	-174 G>C	rs1800795	Th2
IL4	5q31.1	-590 T>C	rs2243250	Th2
IL4R	16p12.1-p11.2	1902 A>G	rs1801275	Th2
IL8	4q13-q21	-251A>T	rs4073	Th1
IL12 α	3q25.33-q26	121G>A	rs568408	Th1
IL12 β	5q31.1-q33.1	3573735T>C 3569458A>G 159A>C	rs7709212 rs2546890 rs3212227	Th1
TNF α	6p21.3	-308C>T -1031C>T -238A>G -863A>C -857C>T	rs1800629 rs1799964 rs361525 rs1800630 rs1799724	Th1

I. 5. Gene *VDR*

O gene *VDR* codifica o receptor de vitamina D, sendo esse um importante hormônio imunorregulatório. Seu metabólito ativo 1,25 dihidroxivitamina D₃ (1,25D₃) ativa monócitos, estimula imunidade mediada por células, e suprime a proliferação linfocítica, a produção de Ig (imunoglobulina) e a síntese de citocinas (Bellamy *et al.*, 1999). Diversos estudos analisaram o polimorfismo *FokI* T>C (rs10735810) desse gene buscando encontrar associação com diferentes patologias.

Foram realizados trabalhos tentando associar esse polimorfismo com suscetibilidade à tuberculose, mas os resultados obtidos são conflitantes. Na revisão de Gao *et al.* (2010), o genótipo TT foi associado com suscetibilidade à tuberculose em asiáticos, mas não em africanos e sul-americanos. Outro trabalho que encontrou essa associação com asiáticos é o de Zhang *et al.* (2010a), onde o genótipo TT parece conferir suscetibilidade à tuberculose espinal em chineses.

Contudo, em uma população iraniana não foi possível encontrar relação entre esse polimorfismo e desenvolvimento de tuberculose pulmonar (Merza *et al.*, 2009). Zembruski *et al.*, (2010) analisando indígenas, originários do Brasil Central, da etnia Xavante também não encontraram associação dessa variante com suscetibilidade a patologia.

Outra doença infecciosa que já foi estudada em busca de uma relação com esse gene é a hanseníase. O trabalho de Sapkota *et al.* (2010) analisou uma amostra de 933 pacientes do Nepal e não encontrou associação dos polimorfismos desse gene com fenótipos da doença.

I. 6. Gene *SP110*

O corpo nuclear (NB) é um complexo multiprotéico que atua na regulação da transcrição gênica. O SP110 é membro de uma das famílias de proteínas do NB que codifica componentes leucócito-específicos, funcionando como um receptor nuclear de hormônio coativador da transcrição. Junto com outras proteínas associadas ao NB induz os interferons do tipo I e II (Fuente *et al.*, 2007). É expresso preferencialmente em leucócitos e células do baço, mas também pode ser expresso em níveis mais baixos em outros tecidos (Thye *et al.*, 2006).

Esse gene é o homólogo humano do gene *Ipr1* de camundongos, que controla a resistência e a suscetibilidade a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. Analisando

polimorfismos nesse gene, Tosh *et al.* (2006) encontraram associação entre as variantes do éxon 11 C>T e íntron 6 C>T e suscetibilidade a tuberculose em populações de Gâmbia e Guiné-Bissau. Contudo, em uma população de Guiné, não foi encontrada associação com a variante do éxon 11.

Outros trabalhos realizados com esses mesmos polimorfismos não encontraram associação com tuberculose. É o caso dos estudos de Babb *et al.* (2007) realizado com uma população da África do Sul e de Szeszko *et al.* (2007) em uma população russa. Thye *et al.* (2006) só analisaram uma das variantes no éxon 11, e não encontraram associação com a patologia em uma população de Gana.

I. 7. Gene P2X₇

O gene *P2X₇* codifica receptores que são altamente expressos nos macrófagos, quando ativados levam ao influxo de cálcio culminando com apoptose (Fernando *et al.*, 2007). Vários polimorfismos já foram descritos nesse receptor, sendo que alguns causam perda de função.

Em um estudo com a população de Gâmbia, uma associação significativa protetora contra tuberculose foi encontrada para um SNP no promotor do gene, na posição -762. Nesse estudo a variante 1513 não foi associada com suscetibilidade à doença. Também foi observado que pacientes com tuberculose ativa exibem expressão reduzida do receptor P2X7 (Li *et al.*, 2002).

Fernando *et al.* (2007) analisaram a variante 1513 em coortes de Liverpool e de Sidney. Os indivíduos da coorte de Liverpool apresentavam resposta de 10mm ou mais ao teste da tuberculina e foram diagnosticados entre 1984 e 1998, os casos com tuberculose ativa foram excluídos desse grupo. Os indivíduos da coorte de Sidney eram pessoas com tuberculose ativa recentemente diagnosticada. Em ambas as coortes não houve associação da variante com tuberculose pulmonar, somente com tuberculose extrapulmonar.

Em um estudo realizado com crianças chinesas diagnosticadas com tuberculose, não foi observada associação desse polimorfismo com suscetibilidade a tuberculose pulmonar e extrapulmonar (Xiao *et al.*, 2009). Tekin *et al.* (2010) analisaram crianças turcas com tuberculose extrapulmonar e encontraram associação com suscetibilidade a esse tipo de tuberculose. Essa mesma variante foi associada com tuberculose pulmonar em uma população de mexicanos mestiços (Niño-Moreno *et al.*, 2007).

Contudo, em uma população de nativos da etnia Xavante provenientes do Brasil Central, não foi possível observar associação entre essa variante e suscetibilidade a tuberculose ou a reação ao teste da tuberculina [PPD] (Zembrzuski *et al.*, 2010).

I. 8. Gene *PTPN22*

O gene *PTPN22* codifica uma proteína, denominada fosfatase intracelular linfóide específica (Lyp), que atua como um importante supressor de cinases que medeiam a ativação das células T (Laddha *et al.*, 2008)

Uma vez que Lyp é uma importante molécula envolvida na resposta imune e inflamatória, e seu nível está aumentado em células que participam da resposta imune contra *Mycobacterium tuberculosis*, trabalhos como o de Gomez *et al.* (2005) e de Lamsyah *et al.* (2009) procuraram por associação entre variantes nesse gene e tuberculose. Gomez analisou indivíduos colombianos com tuberculose pulmonar e encontrou o alelo C da variante 1858 como fator de risco para o desenvolvimento da doença nessa população. O trabalho de Lamsyah foi realizado com uma população marroquina e encontrou associação de tuberculose com essa variante, sendo que o alelo T foi mais frequente em controles do que em pacientes.

Robledo *et al.* (2007) não encontraram associação da variante 1858 desse gene com suscetibilidade a doença de Chagas. Essa é uma doença parasítica da América Latina, onde aproximadamente 25% da população apresentam algum risco de infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Em outro estudo, duas coortes, da Colômbia e do Peru foram analisadas e não foi observada associação dessa variante com suscetibilidade a doença de Chagas em nenhuma das duas populações. (Thye *et al.*, 2006)

I. 9. Gene *IL-1 β*

IL-1 β se inclui em um *cluster* de genes que é codificado por uma família de proteínas IL-1, é um importante modulador das vias inflamatórias. Seus níveis regulam a proteína C reativa no plasma diretamente pela regulação do gene dessa proteína ou pela produção de mediadores inflamatórios como a IL-6 (Enquobahrie *et al.*, 2009).

A tuberculose é uma das doenças que mais causa óbitos dentre as doenças infecciosas, atrás apenas da HIV/AIDS em todo o mundo. Kusuhara *et al.* (2007) estudaram uma população japonesa e encontraram associação de um polimorfismo no íntron 2 (-5839 C>T) do gene *IL-1 β* com suscetibilidade a tuberculose. Contudo,

Zembrzuski *et al.* (2010) não encontraram associação dessa variante com suscetibilidade a tuberculose em uma população de indígenas da etnia Xavante provenientes do Brasil Central.

I. 10. Genes *IL12 α* , *IL12 β* e *IL12RB1*

A interleucina 12 é uma citocina pró-inflamatória que induz a produção de interferon- γ , favorecendo a diferenciação de células Th1 e sendo um ponto de conexão da imunidade inata e adaptativa. As atividades biológicas dessa citocina são mediadas pela sua ligação de alta afinidade com o seu receptor, denominado IL12RB, que é codificado pelo gene de mesmo nome. Variações nesse receptor podem influenciar a sinalização desta citocina (Sánchez *et al.*, 2005).

Remus *et al.* (2004) analisaram o gene desse receptor em uma população marroquina buscando encontrar alguma associação com tuberculose. Esse gene foi escolhido pelos autores por diversas razões, dentre elas: a sua deficiência é a etiologia genética mais comum da chamada suscetibilidade mendeliana a doença micobacteriana (MSMD); esse gene apresenta uma alta heterogeneidade alélica, com mais de 25 alelos diferentes; a penetrância para deficiência nesse gene em fenótipos MSMD é baixa (estimada em 40%), o que mostra que o restante dos afetados pode mostrar um fenótipo diferente, mas relacionado com a tuberculose. Na análise da população marroquina conduzida pelos autores, os polimorfismos -641 e -1094 do IL12RB1 não estavam associados com tuberculose pulmonar, enquanto que as variantes -11 C>T e -2 C>T apresentaram associação com essa patologia.

A produção de interferon gama dependente de IL12 é crucial para os mecanismos de defesa do hospedeiro contra micobactérias. Diante disso, Lee *et al.* (2005) analisaram um grupo de pacientes coreanos com tuberculose, mas não encontraram associação das variantes -641 e -1094 do gene do receptor de IL12 com a doença.

Um estudo com uma população iraniana não encontrou associação entre a variante rs3212227 do gene da IL12 β com tuberculose (Amirzargar *et al.*, 2006). Essa falta de associação também foi observada em uma população Indiana (Prabhu Anand *et al.*, 2007) e em uma Chinesa (Wang *et al.*, 2010). Um estudo de coorte com uma população da Guiné-Bissau revelou sinais de associação dessa variante com tuberculose. Essa associação foi replicada em uma coorte de afro-americanos dos EUA,

o que levou à sugestão de que esse SNP seria um fator de risco para tuberculose em populações de ancestralidade africana (Morris *et al.*, 2011).

Infecções por *Plasmodium falciparum* e suas manifestações clínicas são traços complexos devido a interações entre ambiente e múltiplos fatores de suscetibilidade genética do hospedeiro. A malária cerebral é a complicação mais severa desse tipo de infecção, sendo uma encefalopatia reversível. Indivíduos com esse tipo de complicação apresentam concentrações plasmáticas de interferon gama mais baixas do que os indivíduos com malária sem essa complicação. Como a IL12 induz a produção de interferon, Marquet *et al.* (2008), analisaram polimorfismos nesse gene em busca de associações com suscetibilidade à malária cerebral em crianças de Mali; contudo, essa associação não foi encontrada.

Outra síndrome que é responsável pela mortalidade relacionada à malária em crianças é a anemia decorrente da malária severa, sendo mais comum em crianças com menos de dois anos que vivem em áreas de transmissão intensa. Essa síndrome se caracteriza pela destruição de células vermelhas infectadas por malária e supressão da eritropoiese. Os mecanismos que regulam os efeitos dessa síndrome ainda não estão completamente elucidados, mas estudos em modelos animais demonstraram um importante papel para a IL12, aumentando a expansão de progenitores eritróides. Zhang *et al.* (2010b) não observaram associações entre polimorfismos nesse gene e essa síndrome em crianças quenianas.

A síndrome respiratória aguda severa (SARS) é uma doença infecciosa causada pelo coronavírus SARS que teve 8000 casos e 774 mortes relatadas em 2003, sendo extremamente contagiosa. Já foram obtidos muitos progressos no entendimento desse vírus, mas a patogênese nos indivíduos infectados permanece obscura. Os fatores genéticos do hospedeiro surgem com um importante papel e diversos polimorfismos em *IL12RB* foram estudados procurando associações com essa patologia. Tang *et al.* (2008) analisaram 115 pacientes chineses com SARS e não verificaram associação das variantes -641 e -1094 com essa patologia.

I. 11. Genes *INF-γ* e *IFNγRI*

IFN- γ é produzido predominantemente por células T e células NK (“natural killer”) em resposta a uma variedade de estímulos inflamatórios ou imunes, e em geral, estimula o desenvolvimento e função de células imunes efetoras. Acredita-se que IL-12

e IL-18, secretadas pelos macrófagos e células dendríticas, são estímulos primários para a produção de IFN- γ em uma reação inflamatória.

O receptor funcional de IFN- γ é composto de duas proteínas INF γ R1 e duas INF γ R2. O gene humano *INF γ R1* contém sete éxons e está localizado no cromossomo 6; o gene *INF γ R2* também contém sete éxons e localiza-se no cromossomo 21. IFN- γ ativa a transcrição de um grande número de genes envolvidos na atividade antiviral, apoptose, processamento de antígeno, expressão de proteína MHC, e desenvolvimento de células Th1. IFN- γ também ativa macrófagos, que matam ou restringem o crescimento de alvos microbianos.

Essa restrição quanto a alvos microbianos levou diversos pesquisadores a desenvolverem estudos que objetivavam encontrar associações entre polimorfismos nesse gene e doenças infecciosas. Etokebe *et al.* (2006) analisaram pacientes croatas com tuberculose para dois polimorfismos nesse gene e não encontraram associação com suscetibilidade a doença. Contudo, em uma comparação entre grupos de pacientes com tuberculose pulmonar com resultados positivos e negativos na microscopia, foi possível observar uma associação com o polimorfismo 874. A frequência de homozigotos TT foi menor em pacientes negativos. A sugestão dos autores para explicar esse fato é que a baixa secreção de interferon, que é conferida pelo alelo T, talvez influencie na replicação de *M. tuberculosis*. Entretanto, não foi possível concluir se isso pode aumentar o risco de desenvolver uma doença mais severa.

Em um estudo realizado com populações de 3 países da África Ocidental (Gâmbia, Guiné-Bissau e República de Conacri), compostas por pacientes com tuberculose confirmada por algum dos métodos convencionais, os autores também procuraram por associações de diversos polimorfismos no próprio gene, assim como nos seus receptores. O genótipo CC do polimorfismo -56 do IFNGR1 apresentou associação com tuberculose nessas populações enquanto que não foram observadas associações com o gene *INF- γ* (Cooke *et al.*, 2006).

Ding *et al.* (2008) observaram uma associação do alelo A da variante 874 do gene *INF- γ* com risco aumentado de desenvolver tuberculose em uma população chinesa. Uma vez que esse alelo corresponde a uma baixa expressão de interferon, conforme já explicado anteriormente, isso pode prejudicar a ativação de macrófagos, o que resultaria no desenvolvimento da doença. Em um trabalho mais recente conduzido

por Wang *et al.* (2010) com outra população chinesa de tuberculosos, essa associação não se confirmou. Essa variante não pode ser individualmente associada com suscetibilidade à tuberculose. Contudo, os genótipos AT/TT conferiam 82% menos risco de falha no tratamento da doença com drogas específicas para tuberculose.

Bulat-Kardum *et al.* (2006) conduziram um estudo caso-controle com uma população croata com tuberculose para determinar se os SNPs -56 e -611 de IFNGR1 estão correlacionados com a doença ou não. Contudo, nesse trabalho não foi possível correlacionar essas variantes com a patologia. Essa associação também não foi observada quando essas variantes foram analisadas em uma população de Gâmbia (Awomoyi *et al.*, 2004).

Contudo, no estudo de He *et al.* (2010), realizado com uma população chinesa, quando os polimorfismos eram analisados separadamente não era possível identificar associação com a patologia. Quando foi realizada uma análise de associação haplótipo-específica de polimorfismos nesse gene foi possível obter uma associação significativa de variantes desse gene com tuberculose. Zembrzuski *et al.*, (2010) encontraram associação entre heterozigotos A/T para a variante 874 do gene IFNG- γ e resposta positiva ao teste tuberculínico em uma população de indígenas da etnia Xavante.

De acordo com Salih *et al.* (2007), no Sudão, mais do que 50% dos casos tratados com sucesso para sintomas viscerais causados por *Leishmania* levam ao desenvolvimento de uma complicação denominada leishmaniose dermal pós-calazar (PKDL). IFN- γ ativa macrófagos que atuam na destruição de parasitas através da ação do próprio IFN- γ , por meio de seus receptores presentes nas lesões PKDL. Essas lesões estão associadas com elevadas respostas de células T antígeno-específicas; logo, polimorfismos nos genes IFN- γ e IFNGR1 são candidatos para associações com essa patologia. No entanto, os autores não conseguiram encontrar associação de polimorfismos no gene do IFN- γ com suscetibilidade a essa patologia. Essa ausência de associação pode ser devido à baixa variabilidade do IFN- γ nessa população. O polimorfismo -56 do IFNGR1 também não apresentou associação com a patologia, contudo quando analisado em haplótipo com outros polimorfismos nesse gene, parece ter um papel importante na suscetibilidade a PKDL.

Em um estudo realizado com pacientes brasileiros com leishmaniose cutânea (CL) e pacientes com leishmaniose visceral (ML), não foi observada diferença na frequência da variante 874 do IFN- γ entre os dois casos. Pacientes com CL com

genótipo AA produziam níveis mais baixos de IFN- γ do que os de genótipo TA/TT. Já nos casos de ML foi possível observar diferença nos níveis de IFN- γ entre os indivíduos, mas não se observou esta relação entre portadores ou não-portadores do alelo A (Matos *et al.*, 2007).

A resposta imune anti-HBV inicial promove a morte das células infectadas e a secreção de citocinas antivirais pelas células da imunidade inata. Contudo, o controle da doença e eliminação do vírus exige uma resposta imune vigorosa e policlonal das células T. Como as citocinas têm um papel muito importante na determinação da resposta imune, polimorfismos em genes que influenciam na produção dessas citocinas, podem ter influência sobre a evolução da infecção por HBV. Pensando nisso, trinta pacientes brasileiros com infecção crônica por HBV foram genotipados para polimorfismos em genes que influenciam a produção de citocinas, dentre eles o *IFN- γ* . Nesse estudo, não foi possível observar associação entre a variante 874 e suscetibilidade à infecção por HBV (Ribeiro *et al.*, 2007).

Uma vez que se sabe da ação das citocinas sobre esses genes varia entre indivíduos, conforme o genótipo, isso poderia também influenciar no grau de resposta imune humoral a vacina contra HBV. No Brasil, utiliza-se a vacina Butang®, produzida pelo Instituto Butantã, onde 68% das crianças vacinadas são responsivas e 32% são altamente responsivas. Diante disso, Macedo *et al.* (2010) analisaram a influência de polimorfismos em citocinas na indução da resposta imune humoral em crianças vacinadas contra hepatite B, um desses polimorfismos era o 874 do *IFN- γ* . Contudo, não foi possível estabelecer associação com essa variante, nem com os demais polimorfismos analisados pelos autores.

Sendo a resposta celular aos níveis de IFN- γ mediada por seu receptor, polimorfismos no *IFNGR1* podem alterar o resultado clínico de uma infecção por HBV, através de alterações nos níveis de IFN- γ que são efetivamente captados pela célula. Zhou *et al.* (2009) estudaram uma população chinesa de indivíduos infectados pelo HBV para diversos polimorfismos nesse receptor. A única variante a apresentar associação foi a -56. Homozigotos CC para essa variante foram associados com recuperação mais rápida de uma infecção aguda por HBV, enquanto que o genótipo TT foi associado com uma maior persistência viral.

I. 12. Gene *TNFR1*:

A expressão correta do receptor de TNF α que é codificado pelo gene *TNFR1* é necessária para o desenvolvimento normal da imunidade. O bloqueio dos sinais para esse receptor produz importantes mudanças na função dos macrófagos, incluindo o cancelamento da liberação de óxido nítrico seguido pela estimulação de interferon- γ . Diversas investigações sugerem que o controle da proliferação de células T pode depender da sinalização adequada desse receptor (Raveney *et al.*, 2010).

TNF α é uma citocina central na patogênese da tuberculose, estando envolvida na formação de granulomas induzindo sintomas como febre e perda de peso e é importante na contenção da infecção latente. Stein *et al.* (2007) analisaram polimorfismos em genes que podem atuar na expressão ou regulação de TNF α em uma população de Uganda. A variante A>G no íntron 1 do *TNFR1* foi associada com regulação de TNF α e suscetibilidade a tuberculose nessa população. A sugestão dos autores é que a porção solúvel desse receptor pode bloquear a atividade de TNF α , aumentando a suscetibilidade à tuberculose.

Contudo, em um estudo conduzido em uma população de indígenas da etnia Xavante, que vivem no Brasil Central, não foi possível estabelecer associação entre essa variante e suscetibilidade a tuberculose (Zembruski *et al.*, 2010).

I. 13. Gene *IL2*:

IL2 é um gene que codifica uma citocina pró-inflamatória (interleucina-2) que medeia a ativação, crescimento e diferenciação de linfócitos T e B e células NK. Polimorfismos nesse gene foram associados com produção alterada de interleucina 2 ou identificados como marcadores prognósticos para várias doenças infecciosas (Reichert *et al.*, 2009).

No início da infecção por *Helicobacter pylori* os níveis de várias citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-2, estão elevados na mucosa gástrica, provavelmente em resposta a fagocitose bacteriana e resultam em uma inflamação crônica do epitélio gástrico. Tseng *et al.* (2006) não verificaram associação de polimorfismos em genes de citocinas, inclusive a IL-2 em crianças jamaicanas infectadas por *H. pylori*. Já em um estudo conduzido com uma população brasileira, esse polimorfismo foi negativamente associado com a infecção, além de aumentar o nível de expressão de IL-2 em adultos e

crianças infectadas. Nessa população, a variante -330 G>T foi associada com aumento nos níveis de IL-2 e IFN- γ que protegem contra a infecção (Queiroz *et al.*, 2009).

Outra infecção bacteriana altamente prevalente em todo o mundo é a gonorréia. Nos EUA, é a segunda infecção sexualmente transmitida bacteriana mais reportada, com mais de 330.000 casos em 2004. Os antibióticos utilizados no tratamento geralmente erradicam a doença, mas a re-infecção é comum, o que sugere que há uma falha do sistema imune em criar uma imunidade duradoura contra *Neisseria gonorrhoeae*. Estudos *in vitro* demonstraram que citocinas pró-inflamatórias predominam durante a infecção aguda. Em um estudo realizado com jovens norte-americanos, as variantes -330G e -166T de *IL-2* foram menos freqüentes em pacientes infectados do que nos controles, sugerindo que essa citocina pode ser um fator limitante na resposta imune a essa bactéria (Geisler *et al.*, 2008).

A ligação de IL-2 em seu receptor induz a expansão clonal de células T antígeno-específicas, aumentando a secreção de citocinas e a expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II. Uma vez que níveis alterados de citocinas podem estar relacionados com resistência ou suscetibilidade a tuberculose, Selvaraj *et al.* (2008) analisaram uma população indiana com tuberculose pulmonar e encontraram associação do homozigoto TT com proteção a essa patologia. Zembruski *et al.*, (2010) não encontraram associação dessa variante com tuberculose em uma população de indígenas da etnia Xavante, do Brasil Central.

I. 14. Gene *IL10*:

O gene da *IL10* codifica uma citocina Th2 (antiinflamatória) pleiotrópica, denominada interleucina-10, que apresenta um papel chave na regulação negativa da resposta inflamatória citotóxica e na mediada por células. Aparentemente 75% da variação na produção de IL-10 parece ser geneticamente determinada, devido à presença de diversos sítios polimórficos na região promotora desse gene (Mohebbatikaljahi *et al.*, 2009).

A associação da severidade patológica com aumento nos níveis circulantes de citocinas pró e antiinflamatórias é bem estabelecida em tuberculose. Polimorfismos no gene da IL-10, conferindo fenótipos mais ou menos produtores de citocina, mostram resultados conflitantes dependendo da população. Esta citocina é particularmente importante nessa patologia, uma vez que antagoniza a função de IFN- γ e a proporção

delas mostra significativa correlação com severidade clínica em pacientes com tuberculose extrapulmonar. Em uma população paquistanesa não foi encontrada associação da variante -1082 de IL-10 com suscetibilidade a tuberculose. Contudo, quando analisada a combinação de genótipos de IFN- γ e IL-10, o genótipo AA do primeiro com o GG do segundo aumentam o risco de tuberculose pulmonar avançada e de tuberculose extrapulmonar disseminada (Ansari *et al.*, 2009).

Taype *et al.* (2010) analisaram uma população peruana com tuberculose e encontraram associação da variante -592 com suscetibilidade a doença. Contudo, nesse estudo não foi observada associação da variante -1082 com suscetibilidade a doença. Essa ausência de associação para essa variante também havia sido observada em uma população indiana com tuberculose (Prabhu Anand *et al.*, 2007). Zembruski *et al.*, (2010) encontraram que indivíduos homocigotos GG para a variante -1082 apresentavam um maior risco de anergia ao PPD quando comparados com indivíduos portadores do alelo A, em uma população da etnia Xavante. Também muito predominante no mundo, a malária é uma das principais causas de mortalidade e morbidade, particularmente na África Subsaariana. Indivíduos contaminados pelo plasmódio podem permanecer assintomáticos ou desenvolver uma doença severa, sendo que essa variação é atribuída a fatores genéticos e ambientais. Carpenter *et al.* (2009) estudando uma população da Tanzânia não encontraram associação das variantes -1082 e -592 da IL-10 com suscetibilidade a essa patologia. Contudo, esse estudo observou associação de LT- α (linfotóxina alfa) com a densidade de parasitas e de TNF com número médio de episódios clínicos, mostrando que aparentemente são outros genes, e não a IL-10, que conferem suscetibilidade a essa patologia.

A infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) é uma das principais causas de doença crônica do fígado em todo o mundo. De 60 a 80% dos indivíduos infectados desenvolvem infecção crônica e essa pode progredir para uma cirrose ou um carcinoma hepatocelular. Muitos fatores afetam a doença, sendo os fatores genéticos e imunológicos os principais. Uma recente meta-análise mostra que o repertório genético do hospedeiro tem uma participação muito importante na infecção por HCV. O genótipo GG da variante -1082 de IL-10 foi associado com suscetibilidade a infecção crônica por HCV, enquanto que as demais variantes do promotor desse gene (-819 e -592) não foram relacionadas com essa via de infecção (Zhang *et al.*, 2010c).

Vários estudos provêm evidências que fatores genéticos e imunes estão conectados com a patogênese da bronquiolite aguda. Crianças finlandesas com quadro de bronquiolite foram genotipadas para polimorfismos em genes de citocinas. Os resultados obtidos indicam que a homozigose para o alelo A da variante -1082 de IL-10 está associada com a patologia, mas somente quando o vírus causador da infecção não é o RSV, no caso específico desse trabalho o agente era o rinovírus (Helminen *et al.*, 2008).

Estudos considerando polimorfismos relacionados com diferentes níveis de expressão de IL-10 sugerem que a produção dessa citocina pode reduzir a suscetibilidade à infecção por esse vírus e proteger contra a progressão da doença. Indivíduos infectados com o HIV-1 subtipo C da África do Sul foram genotipados para as variantes -1082 e -592 de IL-10. Em relação a variante -1082, não foi observada diferença nas frequências genotípicas entre os grupos de infectados e não infectados, demonstrando que essa variante não tem relação com a suscetibilidade ao vírus. Contudo, a variante -592 apresentou um risco aumentado de infecção para os indivíduos portadores do genótipo AA em relação aos genótipos AC e CC, sugerindo uma relação entre os níveis dessa citocina e a patologia em questão (Naicker *et al.*, 2009). Resultados similares foram obtidos para uma população de indianos HIV positivos, onde a variante -592 foi associada com a transmissão e progressão da doença (Chatterjee *et al.*, 2009).

Um estudo com uma população caucasiana da Holanda não foi capaz de observar associação das variantes -1082 e -819 desse gene com suscetibilidade à artrite reumatóide ou com severidade da doença (Emonts *et al.*, 2011). Entretanto o alelo G da variante -1082 foi associado com essa patologia em uma população turca (Ates *et al.*, 2008).

I. 15. Gene *IL6*:

A citocina pró-inflamatória denominada interleucina-6 (IL- 6) que é sintetizada e secretada em resposta a um insulto inflamatório, desencadeando o processo inflamatório é determinada pelo gene *IL6*. Ela estimula a secreção da proteína C reativa que é um importante biomarcador para o status pró-inflamatório em várias doenças. Polimorfismos nesse gene foram relacionados com os níveis dessa proteína circulante e com diferentes perfis de resposta plasmática a imunização (Slattery *et al.*, 2007).

O processo inflamatório apresenta uma série de características especiais, incluindo a formação de espécies reativas de oxigênio, degradação do tecido, angiogênese e efeitos anti-apoptóticos (Ognjanovic *et al.*, 2010). Uma vez que as citocinas são as mediadoras da inflamação, polimorfismos em genes que codificam essas proteínas podem apresentar alguma associação com suscetibilidade ou progressão de diferentes tipos de patologias. O polimorfismo -174GC na região promotora da IL-6 foi associado com decréscimo na expressão e nos níveis plasmáticos circulantes dessa citocina (Brenner *et al.*, 2007).

Henao *et al.* (2006) analisaram uma população colombiana composta por indivíduos com tuberculose pulmonar, pleural ou disseminada e não encontraram associação dessa variante com suscetibilidade a nenhum dos tipos da doença. Em uma população indiana com essa patologia também não foi observada associação (Selvaraj *et al.*, 2008).

I. 16. Genes *IL4* e *IL4R*:

A interleucina-4 é produzida pelas células Th2 e, assim como as demais citocinas produzidas por essas células, apresenta um papel importante na rota de produção de anticorpos IgE (Yang *et al.*, 2005).

O gene do receptor da IL4 (*IL4R*) está relacionado com as vias de sinalização da IL4 e da IL13, uma vez que codifica uma cadeia alfa que é utilizada pelos receptores dessas citocinas. É de fundamental importância no desenvolvimento de células Th2 e na produção de IgE (Zhang *et al.*, 2007).

Em um estudo com uma população iraniana com leishmaniose, foram observadas diferenças entre os pacientes e os controles em relação às duas variantes. A variante -590 de *IL-4* foi associada com maior risco de desenvolver leishmaniose cutânea, enquanto que a variante +874 de *IFN- γ* pode influenciar na progressão da doença em direção à leishmaniose cutânea crônica (Kamali-Sarvestani *et al.*, 2006).

Em um estudo realizado com uma população venezuelana com altas taxas de infecção por *H. pylori*, não foi observada associação entre a variante -590 e lesões gástricas pré-cancerosas (Kato *et al.*, 2006). Em um estudo realizado com a população europeia proveniente de 10 países (Dinamarca, França, Grécia, Alemanha, Itália, Nova Zelândia, Noruega, Espanha, Suécia e Reino Unido), não foi observada associação entre essa variante e câncer gástrico (Crusius *et al.*, 2008).

Um estudo realizado com populações de diversos estados norte-americanos não encontrou associação da variante -590 de *IL-4*, nem da variante 1902 de *IL-4R* com essa variação fenotípica de resposta a infecção crônica determinada pelo vírus da hepatite B (Wang *et al.*, 2004).

Zembrzusi *et al.* (2010) encontraram uma associação entre homozigotos CC para a variante -590 de *IL-4* e resposta positiva ao teste tuberculínico em uma população Xavante.

I. 17. Gene *IL8*:

A interleucina 8 é uma importante quimiocina nos processos inflamatórios humanos e funciona no recrutamento de leucócitos para os sítios inflamatórios. Estudos demonstram que essa interleucina é produzida e liberada pelos leucócitos e células estruturais em resposta a antígenos derivados de agentes infecciosos (Ma *et al.*, 2003).

Em uma população do Reino Unido de indivíduos com bronquiolite viral sincicial, o alelo A da variante -251 da *IL8* foi associado com severidade da bronquiolite aguda (Hull *et al.*, 2000). Quando essa variante foi analisada em uma população alemã com asma, associação do alelo T com essa doença foi também descrita (Heinzmann *et al.*, 2004). Esses resultados seriam indicadores de que essas patologias não utilizam a mesma rota na resposta imune.

Em um estudo realizado com caucasianos e afro-americanos dos EUA, indivíduos portadores do alelo A da variante -251 apresentaram um risco aumentado para tuberculose (Ma, 2003). Entretanto, em uma população de Gâmbia não foi observada evidência de associação entre genótipos para essa variante e tuberculose pulmonar (Cooke *et al.*, 2004).

I. 18. Gene *TNF α* :

O gene *TNF- α* , que codifica a citocina *TNF- α* , está localizado dentro da região do HLA de classe III no cromossomo 6, estando em forte ligação com o HLA de classe I e II. Essa citocina é produzida principalmente por monócitos e macrófagos ativados (Sharma *et al.*, 2010). *TNF- α* é um importante mediador da resposta inflamatória contra doenças infecciosas que é controlado a nível de transcrição e pós transcrição (Merza *et al.*, 2009).

Em países em desenvolvimento, a febre tifóide é uma patologia altamente preocupante. É causada pela *Salmonella typhi* e transmitida pela rota fecal-oral através de comida e bebidas contaminadas. Um estudo com uma população da Indonésia não conseguiu associar as variantes -238 e -308 do gene *TNF α* com suscetibilidade a essa patologia; no entanto, os autores sugerem que a variante -308 estaria relacionada com a severidade da doença (Ali *et al.*, 2007).

Em uma população chinesa, SNPs da região promotora do gene *TNF α* não foram associados à maior chance de desenvolver SARS, nem afetavam a fibrose pulmonar intersticial em pacientes portadores da doença. Contudo, os genótipos CT/CC da variante -1031 e o genótipo AC da variante -863 parecem ser fatores de risco para necrose do fêmur em pacientes que tiveram a patologia (Wang *et al.*, 2008).

No estudo de Emonts *et al.* (2011), realizado com uma população holandesa, não foi possível observar associações entre as variantes -238, -308, -857 e -863 com artrite reumatóide, tampouco com a severidade dessa doença.

A doença de Chagas é uma importante infecção crônica causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, que se mantém como um dos principais problemas de saúde pública nos países da América Latina. Um estudo genético realizado em uma população brasileira sugere que a variante -238 influenciaria a suscetibilidade a infecção por esse protozoário e que o alelo A dessa variante estaria associado com maior produção de *TNF α* em indivíduos soropositivos (Pissetti *et al.*, 2011).

Considerando os estudos referentes à tuberculose, os resultados tendem a ser contrastantes conforme a população que é analisada. Podemos citar o trabalho de Amirzargar *et al.* (2006) que analisou a variante -238 em uma população Iraniana buscando associações com essa doença. Nessa população o genótipo GG dessa variante foi associado com tuberculose pulmonar. Já em outra investigação na população do Norte da Índia nenhuma associação foi observada (Sharma *et al.*, 2010).

CAPÍTULO II - JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

No período pré-contato dos indígenas com os chamados “homens brancos” os principais vilões da saúde dos povos indígenas foram as doenças helmínticas, os traumas e os parasitas. Durante muito tempo da história pós-contato as principais vilãs foram as doenças infecciosas. Ainda nos dias atuais epidemias de doenças virais podem dizimar populações em um curto período de tempo, colocando em perigo a continuidade biológica e social dos grupos afetados, ainda que epidemias dessa magnitude ocorram com uma frequência bem menor do que no passado. Diversos trabalhos demonstraram um aumento na suscetibilidade a infecções por patógenos em povos indígenas em relação àquela observada em populações não nativas, contudo as bases genéticas que resultam nesse aumento ainda não estão completamente elucidadas. A teoria do balanço entre células Th1 e Th2 atribui essa variação a manutenção de um padrão de resposta Th2 dominante nesses grupos enquanto adultos, em detrimento a mudança para o padrão Th1 dominante como é observado nas demais etnias.

Entre as populações ameríndias da América do Sul, apenas os Xavante foram genotipados para um conjunto de genes que determinam citocinas do tipo Th1 e Th2 por Zembruski *et al.* (2010). A frequência alélica observada para as interleucinas associadas a esses padrões de resposta nessa população mostraram resultados muito diferentes das descritas para outros grupos étnicos. Portanto, a expansão desse conhecimento para outras populações ameríndias torna-se extremamente necessária para que se possa conhecer o padrão de resposta imune predominante nessa etnia. Além disso, informações referentes a essas frequências poderão contribuir para um melhor entendimento da suscetibilidade a várias doenças que afetam esses grupos, facilitando a tomada de medidas de saúde mais efetivas.

Este trabalho teve por objetivo geral determinar as frequências de polimorfismos em genes relacionados com o padrão de resposta imune em uma amostra de indígenas das etnias Kaingang, Aché, Guarani Nãndeva e Guarani Kaiowá, buscando subsídios para as bases genéticas da teoria do balanço entre células Th1 e Th2.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

1- Determinar as frequências dos polimorfismos dos genes *VDR*, *SP110*, *P2X7*, *PTPN22*, *IL12RB1*, *IFNG*, *IFNGR1*, *TNFR1*, *IL-1B*, *IL-2*, *IL-4*, *IL-4R*, *IL-6*, *IL-10*, *IL12 α* , *IL12 β* , *TNF α* e *IL8*.

2- Verificar se ocorrem relações entre as frequências obtidas e os padrões de resposta imune predominantes em ameríndios.

**CAPÍTULO III – Cytokine allele frequencies among Native
American populations**
(em preparação para ser submetido à revista *Tissue Antigens*)

Cytokine allele frequencies among Native American populations.

J. D. Lindenau¹, F. M. Salzano¹, A. M. Hurtado², K. R. Hill², M. L. Petzl-Erler³, L. T. Tsuneto⁴, M. H. Hutz^{1#}

1 Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

2 School of Human Evolution & Social Change, Arizona State University, Tempe, AZ 85287-2402, USA

3 Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

4 Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, PR, Brazil

Short title: Immune response SNPs in Amerindians

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflicts of interest.

Correspondence to:

Prof. Mara H. Hutz

Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS

Caixa Postal 15053

91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: 55-51-3308-7311

E-mail: Mara.hutz@ufrgs.br

Abstract

Native Americans generally have a higher prevalence of infectious diseases than non-native populations. Thirty-two polymorphisms in immune response genes were investigated in four South Amerindian populations. An overall reduced variability was observed in these genes, mainly in those associated with a T-helper 1 cell immune response. The degree of variability was associated with admixture; Kaingang, the most admixed population, showed more variability than the Aché, where no admixture was detected. The relationship between low genetic diversity and Th2 predominance could explain at least partially the high susceptibility of these populations to infectious diseases.

Keywords: South American Native populations, immune response genes; inteleukins.

Several evidences point to a major role of host genetic constitution in explaining inter-individual variation in susceptibility to infectious diseases. Previous studies reported that Native American populations have lower variability in several immune system genes such as KM, GM, Kell, and HLA (1, 2). The HLA system reduced diversity seems to be especially important for introduced disease susceptibility in Amerindians (3). However, the immune response is dependent of others factors besides HLA. One of these factors is the T-helper immune response, which is predominantly composed by the balance between Th1 and Th2 cells. Th1 cells are hypothesized to lead the attack against intracellular pathogens such as viruses, raise the classic delayed-type hypersensitivity (DTH) skin response to viral and bacterial antigens, and fight cancer cells. Th2 cells are believed to enhance protection against extracellular pathogens such as multicellular parasites (4). Interleukin genes might also be important to explain the reasons for the higher susceptibility to introduced diseases in these populations; however knowledge about these genes and their variability in this ethnic group is scarce.

In a previous study with the Xavante population of Central Brazil, allele frequencies observed for interleukin polymorphisms differed from those reported in other major ethnic groups; for instance, *SP110*, *PTPN22*, *IL12RB1* and *IL6* SNPs were not polymorphic in this community (5). The current study describes the frequency of 32 SNPs in immune system genes that lead to different cytokine expression in four Native South American populations (Aché, Guarani-Kaiowá, Guarani-Ñandeva and Kaingang) and suggests why such distinct cytokine SNP profiles may have evolved at the population level.

The characteristics of the populations investigated are described in Table 1. Genomic DNA was extracted from blood samples and genotyping was carried out by TaqMan® SNP Genotyping Assay methods (Applied Biosystems, Foster City, USA). The polymorphisms investigated in this study are described in Table 2. Allele frequencies were obtained directly by gene counting.

Table 2 shows the minor allele frequencies (MAF) of all SNPs investigated together with the prevalences of these variants in other ethnic groups as well as in the Xavante, the only other native South American population previously investigated.

Figure 1 shows the relationships between these Native populations and other continental groups using these markers, DA distances and a neighbor joining tree (6, 7).

The Xavante and Aché are the more differentiated whereas the Kaingang, the most admixed native population investigated, is placed closest to the other ethnic groups. Native populations with no evidence of admixture with non-Indian populations, as the Aché, presented more SNPs with low variability. In this population 8/32 SNPs presented MAF frequencies lower than 1%. These figures for the Guarani-Kaiowá and Guarani-Ñandeva were 5 and four respectively. All genes were highly variable in the Kaingang. Non-Indian admixture has been estimated as 7% in this population (8); therefore, this higher variability might be due to European and/or African admixture. Among the 32 SNPs studied three, *IL6*, *SP110*, and *PTPN22* were monomorphic in the Guarani and Aché, as was previously observed in the Xavante (5). *TNF α* , not previously investigated in the Xavante, was also monomorphic in these populations (Table 2).

When the overall allele frequencies observed in Native South American populations are compared with those reported in other continental groups, a unique pattern is observed. Only four variants present allele frequencies in the same range of variation described in Asians, with whom they have more recent common ancestors (*IL4*, *IL8* and *VDR* genes). All the other genes had higher or lower allele frequencies than Asians in at least one Amerindian population. Most of the variants with lower allele frequencies are in genes involved in the Th1 immune response. Previous investigations based on susceptibility studies where the immune response against a specific antigen was known in Amerindian populations suggested that these groups have a predominant Th2 immune response, while the non-native populations have a predominance of Th1 immune responses, maybe associated with different patterns of parasite exposure and trauma (9). In the present study most of the monomorphic sites and/or those with low allele frequencies are involved in the Th1 immune response.

When a population is polymorphic to a variant, there is a greater possibility that the immune response would be adequate, at the population level, than when the population is not polymorphic. This genetic variability allows at least some individuals in the population to develop an adequate immune response to the antigen, while the lack of variability minimizes immune response diversity. The ability to switch between Th1 and Th2 immune responses is also essential for individual success. At the population level, it is important that most individuals have an appropriate antigen response.

It is difficult to infer the microevolutionary processes that shaped this unique pattern observed in Amerindians. The low genetic variability in these genes could be

explained through a founder effect or by high inbreeding associated with isolation during the tribalization process. The possibility also exists that these differences might be due to a restricted immune system shaped by natural selection. More Amerindian populations should be investigated to disclose the full spectrum of variation of these immune response genes in Amerindians before a conclusion could be reached.

Our results demonstrate that the immune response frequencies are different in the South Native American populations in relation to the non-native populations. Further studies may provide important insights into the implications of these observations for introduced diseases susceptibility and the reasons for the low variability in these populations.

Acknowledgments

Thanks are due to the Fundação Nacional do Índio for authorizing this study and for logistic assistance. The Indian leaders and the subjects of investigation were adequately informed about the aims of the study and gave their approval, which is gratefully acknowledged. Our research program was approved by the Brazilian Ethics National Committee (Resolution 123/98). The authors also thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support.

Conflict of interest:

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

1. Black FL. Disease susceptibility among New World peoples. In: Salzano FM, Hurtado AM, eds. *Lost Paradises and the Ethics of Research and Publication*. New York: Oxford University Press, 2004, 146-63.
2. Black FL, Pandey JP. Evidence for balancing at KM but not GM alleles by heterotic advantage in South Amerinds. *Hum Genet*. 1997; **100**:240-4.
3. Bhatia KK, Black FL, Smith TA, Prasad ML, Koki GN. Class I HLA antigens in two long-separated populations, Melanesians and South Amerinds. *Am Phys Anthropol* 1995; **97**:291-305.
4. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* 2003;**8**:223-46.
5. Zembrzuski VM, Basta PC, Callegari-Jacques SM, et al. Cytokine genes are associated with tuberculin skin test response in a native Brazilian population. *Tuberculosis* 2010;**90**:44-9.
6. Nei M, Tajima F, Tatenno Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *J Mol Evol* 1983;**19**:153-70.
7. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;**4**:406-25.
8. Callegari-Jacques SM, Salzano FM. Brazilian Indian/non-Indian interactions and their effects. *Brazilian Assoc Advanc Science* 1999;**51**:166-74.
9. Hurtado A, Hurtado I, Hill K. Public health and adaptative immunity among Natives of South America. In: Salzano F, Hurtado A, eds. *Lost paradises and the Ethics of Research and Publication*. New York, Oxford University Press 2004, p:164-90.

Table 1: Characteristics of the populations investigated

Characteristics	Populations		
	Aché	Guarani Kaiowá 72 Ñandeva 72	Kaingang 72
Number of individuals investigated	98		
Localities	Arroyo Bandera	Amambai	Nonoai
Geographic location	Chupa-pou	Limão Verde	
		Porto Lindo	
	55°W, 23°S	55°W, 23°S	52°W, 27°S
	56°W, 24°S	55°W, 23°S	
Country and region	South Paraguay	Central Brazil	South Brazil
Linguistic group	Tupi	Tupi	Jê
Non-Indian admixture (%)*	0	3	7

* Estimated by Callegari-Jacques et al (8).

Table 2: Minor allele frequencies (MAF) for the polymorphisms in the Native American populations studied here and their frequency range in world populations

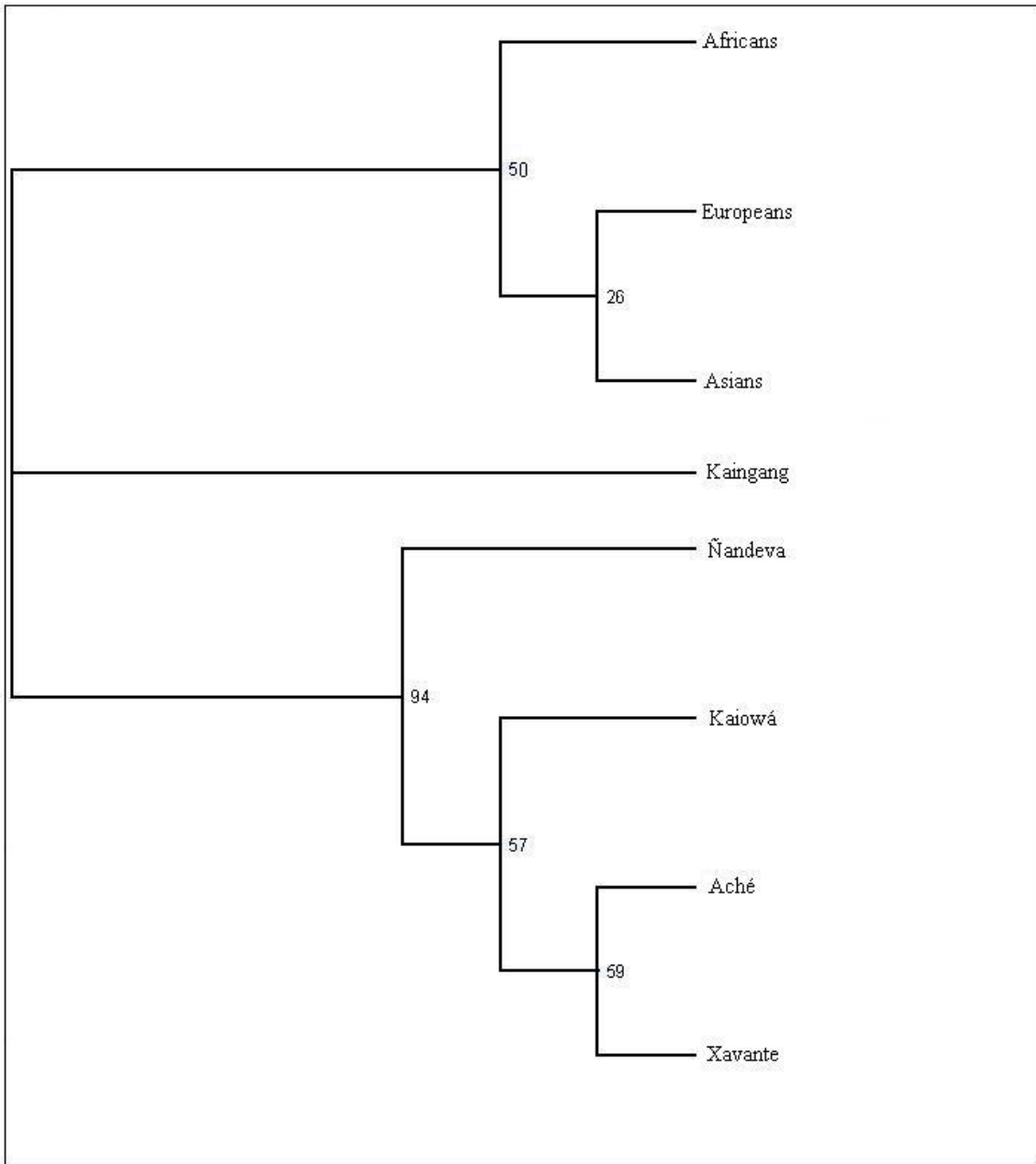
Gene	dbSNP ID	Allele	MAF (%)							Guarani	Guarani
			Africans	Europeans	Asians	Xavante	Aché	Kaingang	Kaiowá	Ñandeva	
IL-1 β	rs1143629	T	55	63-83	46-60	30.0	3.6	26.4	5.6	12.5	
	rs1143627	T	35	63-83	52-56	NA	3.6	25.7	5.6	11.1	
	rs16944	G	40-42	64-82	51-55	NA	3.6	25.7	5.6	11.1	
IL-2	rs2069762	G	0-6	23-38	24-56	17.0	3.1	20.4	55.6	69.5	
IL-4	rs2243250	C	17-29	83-89	17-89	16.0	20.5	53.4	36.8	27.1	
IL-4R	rs1801275	G	83-90	22-33	7-23	33.0	26.5	41.0	44.4	29.2	
IL-6	rs1800795	C	0-9	18-57	0-40	0.0	0.0	10.4	1.4	0.7	
IL-8	rs4073	A	82	34-40	27-39	NA	32.6	29.2	8.5	21.8	
IL-10	rs1800872	C	52-77	45-83	27-77	32.0	7.1	45.1	26.4	49.3	
	rs1800896	G	31-47	28-67	4-40	13.0	0.0	19.4	3.5	5.6	
	rs1800871	C	52-54	75-83	26-31	NA	7.2	45.1	25.0	51.4	
IL-12 α	rs568408	A	22	19	6-15	NA	26.0	3.5	0.0	2.1	
IL-12 β	rs3212227	C	33	19-24	37-56	NA	3.1	35.5	70.5	54.3	
	rs7709212	T	75	62-68	48-65	NA	32.6	29.2	28.5	40.3	
	rs2546890	A	31	20-56	40-51	NA	32.1	22.9	27.1	40.3	
IL-12R β 1	rs375947	C	23-26	30-38	27-52	1.0	1.0	22.9	2.8	16.4	
	rs11575934	G	10-24	30-37	34-49	1.0	1.0	22.2	2.1	13.6	
SP110	rs2114592	T	14-28	10	15-26	0.0	0.0	4.2	0.7	0.0	
	rs3948464	T	12-27	8-15	0-1	<1	0.0	3.5	12.5	4.9	
TNF- α	rs1800629	A	6-9	17-22	2-15	NA	0.0	2.1	0.7	0.7	
	rs1799964	C	12-14	21-26	14-23	NA	32.5	19.5	20.8	24.3	
	rs361525	A	0.8	7	0-4	NA	31.6	8.3	0.7	2.1	
	rs1800630	A	10-12	15-20	12-20	NA	0.5	16.4	40.2	34.9	

	rs1799724	T	3	4-7	9-19	NA	19.1	33.8	47.2	36.4
TNF- α R1	rs4149622	G	60-65	0	10-13	5.0	0.0	6.4	4.9	8.5
IFN- γ	rs2430561	A	68-76	49-73	64-68	2.0	0.5	11.1	0.0	2.8
IFN- γ R1	rs1327474	G	3-98	34-43	3-6	6.0	34.7	36.1	11.1	15.3
	rs2234711	C	41-47	35-55	44-50	22.0	19.9	34.7	25.7	31.2
VDR	rs10735810	A	17-24	34-44	26-51	32.0	25.5	45.1	44.4	34
	rs1544410	A	28-29	37-44	2-41	NA	25.0	13.9	9.8	4.7
PTPN22	rs2476601	T	0-3	1-21	0-6	0.0	0.0	2.1	0.0	0.7
P2X7	rs3751143	C	7-11	14-17	20-25	15.0	42.2	17.4	22.2	24.6

NA: Not Available.

Source of allelic frequencies in world populations: Zembrzuski *et al.* (5).

Figure 1: Neighbor-joining tree based on modified Cavalli-Sforza distances (DA) for 18 polymorphisms in 5 South Amerindian populations and Africans, Europeans and Asians populations.



CAPÍTULO IV - DISCUSSÃO

A discussão específica referente aos resultados obtidos no presente trabalho encontra-se no capítulo três.

Diversas evidências sugerem que os ancestrais das populações ameríndias atuais provavelmente foram para áreas de refúgio durante a última era glacial. Durante esse processo possivelmente através do efeito de deriva parte da variabilidade genética do grupo ancestral pode ter sido perdida enquanto que algumas variantes tornaram-se predominantes devido ao efeito fundador (Achilli *et al.*, 2008; Perego *et al.*, 2009; Schroeder *et al.*, 2009; Tamm *et al.*, 2007).

Nosso trabalho permitiu a constatação de que há uma redução ou ausência de variabilidade em alguns genes importantes para a resposta imune do tipo Th1 nas populações nativas sul-americanas estudadas. Comparando nossos achados com aqueles observados para os indígenas da etnia Xavante, podemos observar uma similaridade em relação aos genes que apresentam esse padrão de falta de variabilidade.

Conforme discutido anteriormente, mais populações ameríndias precisam ser analisadas para um completo entendimento dos processos microevolutivos que moldaram o sistema imune desses grupos. Mesmo com as informações adicionadas pelo nosso estudo, ainda não podemos concluir se essa baixa variabilidade observada em genes relacionados com a resposta imune é o resultado de um efeito fundador, de uma alta taxa de endocruzamento ou de um processo de seleção natural.

As frequências alélicas de STR, SNPs e indels em ameríndios diferem das observadas no resto do mundo (Hofer *et al.*, 2009). Entre as buscas de uma explicação para essas diferenças foi sugerido que a seleção teria tido pouco tempo para atuar nesses grupos, especialmente devido ao pequeno tamanho das populações e, portanto, não seria a explicação mais provável para esses achados (Wang *et al.*, 2007). O mais provável, segundo Hofer *et al.* (2009) é que essas diferenças sejam devidas a fatores demográficos, como gargalos de garrafa, que tenham ocorrido durante a ocupação do território americano que possam ter aumentado a possibilidade de “surfe” alélico durante as expansões espaciais subseqüentes.

Considerando que é difícil distinguir os efeitos de seleção positiva daqueles provenientes de processos demográficos, uma vez que eventos demográficos antigos como gargalos de garrafa ou amplas expansões podem mimetizar as assinaturas genéticas de varreduras seletivas (como, por exemplo, diversidade alélica reduzida), a análise de mais populações ameríndias permitirá uma visão mais ampla do real perfil de

variabilidade desses grupos e contribuirá para o estabelecimento de qual processo evolutivo atuou sobre genes relacionados à resposta imune (Hofer *et al.*, 2009).

Essa baixa variabilidade observada em nosso estudo acaba por determinar uma expressão mais restrita de citocinas, que por sua vez acabam por ativar a expressão de um número menor de genes de resposta imune. Esse processo de ativação gênica afeta diretamente a diferenciação das células Th0 em células Th1 ou Th2, o que acaba por influenciar no padrão de resposta que será predominantemente desencadeado no momento da exposição a determinado antígeno.

As frequências obtidas nessas populações podem ser uma das explicações para a alta suscetibilidade desses grupos às doenças introduzidas pelas populações que habitam regiões ao redor das reservas indígenas. Trabalhos que tenham como objetivo relacionar polimorfismos em genes de resposta imune e doenças introduzidas tornam-se claramente necessários para um completo entendimento da resposta desses grupos a esse tipo de patologia.

Diversas investigações demonstraram que nosso sistema imune sofreu mudanças durante as fases mais recentes da evolução humana e que essa mudança pode ser o reflexo de nossa exposição às doenças infecciosas. Essas patologias estão associadas com o advento da agricultura no começo do período Neolítico (Cavalli-Sforza, 1966). A maneira pela qual os humanos se adaptam aos patógenos depende de uma gama de fatores, incluindo o tipo de microorganismo, a diferente presença temporal e espacial do patógeno durante a evolução, sua patogenicidade, a natureza da interação entre o hospedeiro e o patógeno e a taxa em que o patógeno evolui. Portanto, é difícil inferir que determinado patógeno é o responsável pela pressão seletiva que é exercida em determinado gene. Isso se dá principalmente pelo fato de que vários patógenos podem exercer pressão nos mesmos genes, sendo que essa seleção acaba somente por variar em forma, tempo e espaço (Barreiro & Quintana-Murci, 2010).

Conforme demonstrado na revisão sobre a epidemiologia da tuberculose em populações nativas sul americanas (anexo 1), esses grupos só foram expostos a essa patologia recentemente, no momento do contato com os portugueses que “descobriram” o Brasil. Dentre as doenças infecciosas, a tuberculose ainda é um importante problema de saúde pública para essas populações, mesmo com todas as medidas de vacinação que são tomadas por parte do governo. As taxas de anergia ao PPD nesses grupos se mantêm em um valor muito superior àquelas observadas em populações não nativas.

Conforme discutimos em nossa revisão, a principal explicação sugerida pelos pesquisadores em relação a essa questão parece se embasar na teoria de predominância de um padrão Th2 de resposta imune nesses grupos. Nenhuma investigação analisou as bases genéticas que poderiam justificar essa teoria, sendo que essa hipótese acaba por se basear, predominantemente, em estudos com anticorpos.

Em relação a essa questão, o presente trabalho acrescenta informações importantes para um melhor entendimento da resposta imune em populações nativas, uma vez que apresenta uma visão geral da variabilidade genética presente nesses grupos. Considerando que foi observada uma baixa variabilidade em polimorfismos de citocinas que desencadeiam um padrão Th1 de resposta imune, pode-se sugerir ser essa uma das razões para a maior suscetibilidade dessas populações às doenças bacterianas introduzidas, uma vez que essas normalmente necessitam de um padrão Th1 de resposta para serem combatidas.

Torna-se necessário que outros trabalhos tentem relacionar os genótipos obtidos para esses polimorfismos com doenças introduzidas comuns nesses grupos, pois isso permitirá um melhor entendimento das reais diferenças em termos de sistema imune entre populações nativas e não nativas. A tuberculose é uma dessas doenças onde essa relação entre polimorfismos em genes de citocinas e suscetibilidade à doença deveria ser estabelecida. Isso se justifica principalmente pelas altas taxas de infecção nos grupos indígenas e pela baixa eficácia das medidas de saúde pública que estão sendo tomadas para o combate a essa patologia nessas populações. Um maior conhecimento sobre os mecanismos por trás da resposta imune pode ajudar no estabelecimento de medidas de combate mais efetivas e direcionadas a determinado grupo.

Recentemente dois novos subconjuntos de células T foram descobertos e suas associações com padrões de resposta imune ainda não estão completamente estabelecidas. Em 2006, três estudos independentes encontraram que a combinação de TGF- β com IL-6 induzia a diferenciação das células produtoras de IL-17, caracterizando um conjunto de células chamado de Th17 (Bettelli *et al.*, 2006; Mangan *et al.*, 2006; Veldhoen *et al.*, 2006). A função primária das células Th17 parece ser a eliminação de patógenos que não foram adequadamente combatidos por células Th1 ou Th2. Entretanto, estudos demonstraram que células Th17 são potentes indutoras de inflamação e têm sido associadas com patogênese de doenças auto-imunes e condições inflamatórias (Korn *et al.*, 2009).

Em 2008, dois grupos mostraram que a combinação de TGF- β com IL-4 induzia a diferenciação de células CD4⁺ em um conjunto de células T produtoras de IL-9, chamadas de células Th9 (Dardalhon *et al.*, 2008; Veldhoen *et al.*, 2008). A função exata desse subconjunto de células Th ainda não foi completamente elucidada, mas funções na imunidade contra helmintos, infecções e/ou na promoção de doenças inflamatórias tem sido propostas (Ma *et al.*, 2010). Estudos que analisem variantes em genes que condicionem a expressão desses padrões de células Th9 e Th17 poderiam contribuir para uma melhor compreensão das respostas imunes em populações nativas.

Também se chama a atenção para a questão de que os resultados obtidos nesse trabalho e o tipo de estudo realizado, englobando diversas etnias indígenas, são inéditos e, portanto, necessitam ser acrescentados por outros trabalhos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH e Pillai S (2008). *Imunologia Celular e Molecular*. 6 edição.

Achilli A, Perego UA, Bravi CM, Coble MD, Kong QP, Woodward SR, Salas A, Torroni A, Bandelt HJ (2008) The phylogeny of the four pan-American MtDNA haplogroups: implications for evolutionary and disease studies. *PLoS One* 3, e1764.

Akira S, Uematsu S and Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783-801.

Ali S, Vollaard AM, Kremer D, de Visser AW, Martina CA, Widjaja S, Surjadi C, Slagboom E, van de Vosse E, van Dissel JT (2007) Polymorphisms in proinflammatory genes and susceptibility to typhoid fever and paratyphoid fever. *J Interferon Cytokine Res* 27: 271-9.

Amirzargar AA, Rezaei N, Jabbari H, Danesh AA, Khosravi F, Hajabdolbaghi M, Yalda A, Nikbin B (2006) Cytokine single nucleotide polymorphisms in Iranian patients with pulmonary tuberculosis. *Eur Cytokine Netw* 17: 84-9.

Ansari A, Talat N, Jamil B, Hasan Z, Razzaki T, Dawood G, Hussain R (2009) Cytokine gene polymorphisms across tuberculosis clinical spectrum in Pakistani patients. *PLoS One* 4, e4778.

Ates O, Hatemi G, Hamuryudan V, Topal-Sarikaya A (2008) Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene promoter polymorphisms in Turkish rheumatoid arthritis patients. *Clin Rheumatol* 27: 1243-8.

Awomoyi AA, Nejentsev S, Richardson A, Hull J, Koch O, Podinovskaia M, Todd JA, McAdam KP, Blackwell JM, Kwiatkowski D *et al.* (2004) No association between interferon-gamma receptor-1 gene polymorphism and pulmonary tuberculosis in a Gambian population sample. *Thorax* 59: 291-4.

Babb C, Keet EH, van Helden PD, Hoal EG (2007) SP110 polymorphisms are not associated with pulmonary tuberculosis in a South African population. *Hum Genet* 121: 521-2.

Barreiro LB, Quintana-Murci L (2010) From evolutionary genetics to human immunology: how selection shapes host defence genes. *Nat Rev Genet* 11: 17-30.

Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam KP, Thursz M, Whittle HC, Hill AV (1999) Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene. *J Infect Dis* 179: 721-4.

Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK (2006) Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441: 235-8.

Black FL, Pinheiro F, Hierholzer WJ and Lee RV (1977) Epidemiology of infectious disease: the example of measles. *Ciba Found Symp*, 115-30.

Bonato SL, Salzano FM (1997a) A single and early migration for the peopling of the Americas supported by mitochondrial DNA sequence data. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1866-71.

Bonato SL, Salzano FM (1997b) Diversity and age of the four major mtDNA haplogroups, and their implications for the peopling of the New World. *Am J Hum Genet* 61: 1413-23.

Bortolini MC, Salzano FM, Thomas MG, Stuart S, Nasanen SP, Bau CH, Hutz MH, Layrisse Z, Petzl-Erler ML, Tsuneto LT *et al.* (2003) Y-chromosome evidence for differing ancient demographic histories in the Americas. *Am J Hum Genet* 73: 524-39.

Brenner AV, Butler MA, Wang SS, Ruder AM, Rothman N, Schulte PA, Chanock SJ, Fine HA, Linet MS, Inskip PD (2007) Single-nucleotide polymorphisms in selected cytokine genes and risk of adult glioma. *Carcinogenesis* 28: 2543-7.

Brune IB, Wilke W, Hensler T, Holzmann B, Siewert JR (1999) Downregulation of T helper type 1 immune response and altered pro-inflammatory and anti-inflammatory T cell cytokine balance following conventional but not laparoscopic surgery. *Am J Surg* 177: 55-60.

Bulat-Kardum L, Etokebe GE, Knezevic J, Balen S, Matakovic-Mileusnic N, Zaputovic L, Pavelic J, Beg-Zec Z, Dembic Z (2006) Interferon-gamma receptor-1 gene promoter polymorphisms (G-611A; T-56C) and susceptibility to tuberculosis. *Scand J Immunol* 63: 142-50.

Callegari-Jacques SM, Hill K, Hurtado AM, Rodrigues LT, Bau CH, Salzano FM (2008) Genetic clues about the origin of Aché hunter-gatherers of Paraguay. *Am J Hum Biol* 20: 735-7.

Callegari-Jacques SM, Tarazona-Santos EM, Gilman RH, Herrera P, Cabrera L, dos Santos SE, Morés L, Hutz MH, Salzano FM (2011) Autosomal STRs in native South America-Testing models of association with geography and language. *Am J Phys Anthropol* 145: 371-81.

Carpenter D, Rooth I, Färnert A, Abushama H, Quinnell RJ, Shaw MA (2009) Genetics of susceptibility to malaria related phenotypes. *Infect Genet Evol* 9, 97-103.

Cavalli-Sforza LL (1966) Population structure and human evolution. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 164: 362-79.

Chatterjee A, Rathore A, Sivarama P, Yamamoto N, Dhole TN (2009) Genetic association of IL-10 gene promoter polymorphism and HIV-1 infection in North Indians. *J Clin Immunol* 29: 71-7.

Cooke GS, Campbell SJ, Fielding K, Sillah J, Manneh K, Sirugo G, Bennett S, McAdam KP, Lienhardt C, Hill AV (2004) Interleukin-8 polymorphism is not associated with pulmonary tuberculosis in the gambia. *J Infect Dis* 189: 1545-6; author reply 1546.

Cooke GS, Campbell SJ, Sillah J, Gustafson P, Bah B, Sirugo G, Bennett S, McAdam KP, Sow O, Lienhardt C, *et al.* (2006) Polymorphism within the interferon-gamma/receptor complex is associated with pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 174: 339-43.

Cooper MD, Alder MN (2006) The evolution of adaptive immune systems. *Cell* 124: 815-22.

Crawford M (1998) *The Origins of Native Americans. Evidence from Anthropological Genetics.* Cambridge University Press.

Crusius JB, Canzian F, Capellá G, Peña AS, Pera G, Sala N, Agudo A, Rico F, Del Giudice G, Palli D, *et al.* (2008) Cytokine gene polymorphisms and the risk of adenocarcinoma of the stomach in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC-EURGAST). *Ann Oncol* 19: 1894-902.

Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, Mitsdoerffer M, Strom TB, Elyaman W, Ho IC, *et al.* (2008) IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol* 9: 1347-55.

Decker D, Schondorf M, Bidlingmaier F, Hirner A, von Ruecker AA (1996) Surgical stress induces a shift in the type-1/type-2 T-helper cell balance, suggesting down-regulation of cell-mediated and up-regulation of antibody-mediated immunity commensurate to the trauma. *Surgery* 119: 316-25.

Dillehay TD (2009) Probing deeper into first American studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 971-8.

Dillehay TD, Ramírez C, Pino M, Collins MB, Rossen J, Pino-Navarro JD (2008) Monte Verde: seaweed, food, medicine, and the peopling of South America. *Science* 320: 784-6.

Ding S, Li L, Zhu X (2008) Polymorphism of the interferon-gamma gene and risk of tuberculosis in a southeastern Chinese population. *Hum Immunol* 69: 129-33.

Emonts M, Hazes MJ, Houwing-Duistermaat JJ, van der Gaast-de Jongh CE, de Vogel L, Han HK, Wouters JM, Laman JD, Dolhain RJ (2011) Polymorphisms in genes controlling inflammation and tissue repair in rheumatoid arthritis: a case control study. *BMC Med Genet* 12.

Enquobahrie DA, Rice K, Williams OD, Williams MA, Gross MD, Lewis CE, Schwartz SM, Siscovick DS (2009) IL1B genetic variation and plasma C-reactive protein level among young adults: the CARDIA study. *Atherosclerosis* 202, no. 2 (Fevereiro): 513-520.

Erb KJ (1999) Atopic disorders: a default pathway in the absence of infection? *Immunol Today* 20: 317-22.

Etokebe GE, Bulat-Kardum L, Johansen MS, Knezevic J, Balen S, Matakovic-Mileusnic N, Matanic D, Flego V, Pavelic J, Beg-Zec Z, *et al.* (2006) Interferon-gamma gene (T874A and G2109A) polymorphisms are associated with microscopy-positive tuberculosis. *Scand J Immunol* 63: 136-41.

Fernando SL, Saunders BM, Sluyter R, Skarratt KK, Goldberg H, Marks GB, Wiley JS, Britton WJ (2007) A polymorphism in the P2X7 gene increases susceptibility to extrapulmonary tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 175, no. 4 (Fevereiro 15): 360-366.

Fiedel S (1992) *Prehistory of the Americas*. Cambridge University Press.

Finkelman FD, Urban JF (2001) The other side of the coin: the protective role of the TH2 cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 107: 772-80.

Fuente J, Manzano-Roman R, Blouin E, Naranjo V, Kocan K (2007) Sp110 transcription is induced and required by *Anaplasma phagocytophilum* for infection of human promyelocytic cells. *BMC Infectious Diseases* 7, no. 1: 110.

Gao L, Tao Y, Zhang L, Jin Q (2010) Vitamin D receptor genetic polymorphisms and tuberculosis: updated systematic review and meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 14: 15-23.

Geisler WM, Wang C, Tang J, Wilson CM, Crowley-Nowick PA, Kaslow RA (2008) Immunogenetic correlates of *Neisseria gonorrhoeae* infection in adolescents. *Sex Transm Dis* 35: 656-61.

Gilbert MT, Jenkins DL, Götherstrom A, Naveran N, Sanchez JJ, Hofreiter M, Thomsen PF, Binladen J, Higham TF, Yohe RM, *et al.* (2008) DNA from pre-Clovis human coprolites in Oregon, North America. *Science* 320: 786-9.

Glimcher L, Shen FW, Cantor H (1977) Identification of a cell-surface antigen selectively expressed on the natural killer cell. *J Exp Med* 145: 1-9.

Goebel T, Waters MR, O'Rourke DH (2008) The late Pleistocene dispersal of modern humans in the Americas. *Science* 319: 1497-502.

Gold DR, Rotnitzky A, Damokosh AI, Ware JH, Speizer FE, Ferris BG, Dockery DW (1993) Race and gender differences in respiratory illness prevalence and their relationship to environmental exposures in children 7 to 14 years of age. *Am Rev Respir Dis* 148: 10-8.

Gomez LM, Anaya JM, Martin J (2005) Genetic influence of PTPN22 R620W polymorphism in tuberculosis. *Hum Immunol* 66: 1242-7.

He J, Wang J, Lei D, Ding S (2010) Analysis of functional SNP in *ifng/ifngr1* in Chinese Han population with tuberculosis. *Scand J Immunol* 71: 452-8.

Heinzmann A, Ahlert I, Kurz T, Berner R, Deichmann KA (2004) Association study suggests opposite effects of polymorphisms within IL8 on bronchial asthma and respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Allergy Clin Immunol* 114: 671-6.

Heller AH, Salzano FM, Barrantes R, Krylov M, Benevolenskaya L, Arnett FC, Munkhbat B, Munkhtuvshin N, Tsuji K, Hutz MH, *et al.* (2004) Intra- and intercontinental molecular variability of an Alu insertion in the 3' untranslated region of the LDLR gene. *Hum Biol* 76: 591-604.

Helminen M, Nuolivirta K, Virta M, Halkosalo A, Korppi M, Vesikari T, Hurme M (2008) IL-10 gene polymorphism at -1082 A/G is associated with severe rhinovirus bronchiolitis in infants. *Pediatr Pulmonol* 43: 391-5.

Henao MI, Montes C, París SC, García LF (2006) Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 86: 11-9.

Hofer T, Ray N, Wegmann D, Excoffier L (2009) Large allele frequency differences between human continental groups are more likely to have occurred by drift during range expansions than by selection. *Ann Hum Genet* 73: 95-108.

Hill K, Hurtado AM (1996) *Aché life history: the ecology and demography of a foraging people*. Transaction Publishers.

Holt PG, Clough JB, Holt BJ, Baron-Hay MJ, Rose AH, Robinson BW, Thomas WR (1992) Genetic 'risk' for atopy is associated with delayed postnatal maturation of T-cell competence. *Clin Exp Allergy* 22: 1093-9.

Hull J, Thomson A, Kwiatkowski D (2000) Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families. *Thorax* 55: 1023-7.

Hurtado AM, Hill KR, Rosenblatt W, Bender J, Scharmen T (2003) Longitudinal study of tuberculosis outcomes among immunologically naive Aché natives of Paraguay. *Am J Phys Anthropol* 121: 134-50.

Hutz MH, Almeida S, Coimbra CE, Santos RV, Salzano FM (2000) Haplotype and allele frequencies for three genes of the dopaminergic system in South American Indians. *Am J Hum Biol* 12: 638-645.

Jablonski N (2002) *The first Americans: the Pleistocene colonization of the New World*. University of California Press.

Janeway C (1999) *Immunobiology: The immune system in health and disease*. Current Biology Publications.

Janeway CA, Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20: 197-216.

Kamali-Sarvestani E, Rasouli M, Mortazavi H, Gharesi-Fard B (2006) Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Iranian patients. *Cytokine* 35: 159-65.

Kaplan JE, Larrick JW, Yost J, Farrell L, Greenberg HB, Herrmann KL, Sulzer AJ, Walls KW, Pederson L (1980) Infectious disease patterns in the Waorani, an isolated Amerindian population. *Am J Trop Med Hyg* 29: 298-312.

Kato I, Canzian F, Franceschi S, Plummer M, van Doorn LJ, Lu Y, Gioia-Patricola L, Vivas J, Lopez G, Severson RK, *et al.* (2006) Genetic polymorphisms in anti-inflammatory cytokine signaling and the prevalence of gastric precancerous lesions in Venezuela. *Cancer Causes Control* 17: 1183-91.

Kohlrausch FB, Callegari-Jacques SM, Tsuneto LT, Petzl-Erler ML, Hill K, Hurtado AM, Salzano FM, Hutz MH (2005) Geography influences microsatellite polymorphism diversity in Amerindians. *Am J Phys Anthropol* 126: 463-70.

Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK (2009) IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 27: 485-517.

Kusuhara K, Yamamoto K, Okada K, Mizuno Y, Hara T (2007) Association of IL12RB1 polymorphisms with susceptibility to and severity of tuberculosis in Japanese: a gene-based association analysis of 21 candidate genes. *Int J Immunogenet* 34: 35-44.

Laddha NC, Dwivedi M, Shajil EM, Prajapati H, Marfatia YS, Begum R (2008) Association of PTPN22 1858C/T polymorphism with vitiligo susceptibility in Gujarat population. *Journal of Dermatological Science* 49, no. 3 (Março): 260-262.

Lamsyah H, Rueda B, Baassi L, Elaouad R, Bottini N, Sadki K, Martin J (2009) Association of PTPN22 gene functional variants with development of pulmonary tuberculosis in Moroccan population. *Tissue Antigens* 74: 228-32.

Lee HW, Lee HS, Kim DK, Ko DS, Han SK, Shim YS, Yim JJ (2005) Lack of an association between interleukin-12 receptor beta1 polymorphisms and tuberculosis in Koreans. *Respiration* 72: 365-8.

Li CM, Campbell SJ, Kumararatne DS, Bellamy R, Ruwende C, McAdam KPWJ, Hill AVS, Lammas DA (2002) Association of a polymorphism in the P2X7 gene with tuberculosis in a Gambian population. *The Journal of Infectious Diseases* 186, no. 10 (Novembro 15): 1458-1462.

Lilic D (2009) Immune response to infection. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, 218-220.

Ma CS, Tangye SG, Deenick EK (2010) Human Th9 cells: inflammatory cytokines modulate IL-9 production through the induction of IL-21. *Immunol Cell Biol* 88: 621-3.

Ma X, Reich RA, Wright JA, Tooker HR, Teeter LD, Musser JM, Graviss EA (2003) Association between interleukin-8 gene alleles and human susceptibility to tuberculosis disease. *J Infect Dis* 188: 349-55.

Macedo LC, Isolani AP, Visentainer JE, Moliterno RA (2010) Association of cytokine genetic polymorphisms with the humoral immune response to recombinant vaccine against HBV in infants. *J Med Virol* 82: 929-33.

Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT (2006) Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441: 231-4.

Marquet S, Doumbo O, Cabantous S, Poudiougou B, Argiro L, Safeukui I, Konate S, Sissoko S, Chevereau E, Traore A, *et al.* (2008) A functional promoter variant in IL12B predisposes to cerebral malaria. *Hum Mol Genet* 17: 2190-5.

Mateus Pereira LH, Socorro A, Fernandez I, Masleh M, Vidal D, Bianchi NO, Bonatto SL, Salzano FM, Herrera RJ (2005) Phylogenetic information in polymorphic L1 and Alu insertions from East Asians and Native American populations. *Am J Phys Anthropol* 128: 171-84.

Matos GI, Covas CJ, Bittar RC, Gomes-Silva A, Marques F, Maniero VC, Amato VS, Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Pirmez C, *et al.* (2007) IFNG +874T/A polymorphism is not associated with American tegumentary leishmaniasis susceptibility but can influence *Leishmania* induced IFN-gamma production. *BMC Infect Dis* 7.

Medzhitov R, Janeway C (2000) Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 173: 89-97.

Menna-Barreto M, Bender AL, Bonatto SL, Freitas LB, Salzano FM, Tsuneto LT, Petzl-Erler ML (2005) Human T-cell lymphotropic virus type II in Guaraní Indians, Southern Brazil. *Cadernos de Saúde Pública* 21, no. 6 (12).

Merza M, Farnia P, Anoosheh S, Varahram M, Kazampour M, Pajand O, Saeif S, Mirsaeidi M, Masjedi MR, Velayati AA, *et al.* (2009) The NRAMPI, VDR and TNF-alpha gene polymorphisms in Iranian tuberculosis patients: the study on host susceptibility. *Braz J Infect Dis* 13: 252-6.

Mohebbatikaljahi H, Menevse S, Yetkin I, Demirci H (2009) Study of interleukin-10 promoter region polymorphisms (-1082A/G, -819T/C and -592A/C) in type 1 diabetes mellitus in Turkish population. *J Genet* 88: 245-8.

Morris GA, Edwards DR, Hill PC, Wejse C, Bisseye C, Olesen R, Edwards TL, Gilbert JR, Myers JL, Stryjewski ME, *et al.* (2011) Interleukin 12B (IL12B) genetic variation and pulmonary tuberculosis: a study of cohorts from The Gambia, Guinea-Bissau, United States and Argentina. *PLoS One* 6: e16656.

Mulligan CJ, Kitchen A, Miyamoto MM (2008) Updated three-stage model for the peopling of the Americas. *PLoS One* 3, e3199.

Naicker DD, Werner L, Kormuth E, Passmore JA, Mlisana K, Karim SA, Ndung'u T, CAPRISA Acute Infection Study Team (2009) Interleukin-10 promoter polymorphisms influence HIV-1 susceptibility and primary HIV-1 pathogenesis. *J Infect Dis* 200: 448-52.

Neel JV (1977) Health and disease in unacculturated Amerindian populations. *Ciba Found Symp*, 155-68.

Niño-Moreno P, Portales-Pérez D, Hernández-Castro B, Portales-Cervantes L, Flores-Meraz V, Baranda L, Gómez-Gómez A, Acuña-Alonzo V, Granados J, González-Amaro R (2007) P2X7 and NRAMP1/SLC11 A1 gene polymorphisms in Mexican mestizo patients with pulmonary tuberculosis. *Clinical and Experimental Immunology* 148, no. 3 (Junho): 469-477.

Ognjanovic S, Yamamoto J, Saltzman B, Franke A, Ognjanovic M, Yokochi L, Vogt T, Decker R, Le Marchand L (2010) Serum CRP and IL-6, genetic variants and risk of colorectal adenoma in a multiethnic population. *Cancer Causes Control* 21: 1131-8.

Pan American Health Organization (PAHO) (2004). Encuentro Regional para el análisis del acceso a tratamiento anti-tuberculoso em poblaciones indígenas: Documento memoria. Ciudad de Panamá. In: <http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/tb-indigenas-pan.htm>

Perego UA, Achilli A, Angerhofer N, Accetturo M, Pala M, Olivieri A, Kashani BH, Ritchie KH, Scozzari R, Kong QP, *et al.* (2009) Distinctive Paleo-Indian migration routes from Beringia marked by two rare mtDNA haplogroups. *Curr Biol* 19: 1-8.

Perego UA, Angerhofer N, Pala M, Olivieri A, Lancioni H, Kashani BH, Carossa V, Ekins JE, Gómez-Carballa A, Huber G, *et al.* (2010) The initial peopling of the Americas: a growing number of founding mitochondrial genomes from Beringia. *Genome Res* 20: 1174-9.

Povos Indígenas no Brasil (PIB). Instituto Socioambiental. (<http://www.socioambiental.org>).

Pissetti CW, Correia D, de Oliveira RF, Llaguno MM, Balarin MA, Silva-Grecco RL, Rodrigues V (2011) Genetic and functional role of TNF-alpha in the development Trypanosoma cruzi infection. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e976.

Prabhu Anand S, Selvaraj P, Jawahar MS, Adhilakshmi AR, Narayanan PR (2007) Interleukin-12B & interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *Indian J Med Res* 126: 135-8.

Queiroz DM, Saraiva IE, Rocha GA, Rocha AM, Gomes LI, Melo FF, Bittencourt PF (2009) IL2-330G polymorphic allele is associated with decreased risk of Helicobacter pylori infection in adulthood. *Microbes Infect* 11: 980-7.

Raveney BJ, Copland DA, Calder CJ, Dick AD, Nicholson LB (2010) TNFR1 signalling is a critical checkpoint for developing macrophages that control of T-cell proliferation. *Immunology* 131: 340-9.

Reichert S, Machulla HK, Klapproth J, Zimmermann U, Reichert Y, Gläser C, Schaller HG, Schulz S (2009) Interleukin-2 -330 and 166 gene polymorphisms in relation to aggressive or chronic periodontitis and the presence of periodontopathic bacteria. *J Periodontal Res* 44: 628-35.

Remus N, El Baghdadi J, Fieschi C, Feinberg J, Quintin T, Chentoufi M, Schurr E, Benslimane A, Casanova JL, Abel L (2004) Association of IL12RB1 polymorphisms with pulmonary tuberculosis in adults in Morocco. *J Infect Dis* 190: 580-7.

Ribeiro CS, Visentainer JE, Moliterno RA (2007) Association of cytokine genetic polymorphism with hepatitis B infection evolution in adult patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 435-40.

Robledo G, González CI, Morillo C, Martín J, González A (2007) Association study of PTPN22 C1858T polymorphism in *Trypanosoma cruzi* infection. *Tissue Antigens* 69: 261-4.

Saalmüller A (2006) New understanding of immunological mechanisms. *Vet Microbiol* 117: 32-8.

Salih MA, Ibrahim ME, Blackwell JM, Miller EN, Khalil EA, ElHassan AM, Musa AM, Mohamed HS (2007) IFNG and IFNGR1 gene polymorphisms and susceptibility to post-kala-azar dermal leishmaniasis in Sudan. *Genes Immun* 8: 75-8.

Salzano F (2007) *The Prehistoric Colonization of the Americas. Anthropological Genetics. Theory, Methods and Applications*, Cambridge University Press. pp. 433-55.

Salzano F (2011) *The Prehistoric Colonization of the Americas: Evidence and Models. Evo Edu Outreach* 4: 199-204.

Salzano FM, Bortolini MC (2002) *The Evolution and Genetics of Latin American Populations*. Cambridge University Press.

Salzano FM, Callegari-Jacques SM (1988) *South American Indians: a Case Study in Evolution*. Claredon Press- Oxford.

Sánchez E, Morales S, Paco L, López-Nevot MA, Hidalgo C, Jiménez-Alonso J, Torres B, González-Gay MA, Callejas JL, Ortego-Centeno N, *et al.* (2005) Interleukin 12 (IL12B), interleukin 12 receptor (IL12RB1) and interleukin 23 (IL23A) gene polymorphism in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 44, no. 9: 1136-1139.

Sapkota BR, Macdonald M, Berrington WR, Misch EA, Ranjit C, Siddiqui MR, Kaplan G, Hawn TR (2010) Association of TNF, MBL, and VDR polymorphisms with leprosy phenotypes. *Hum Immunol* 71: 992-8.

Schroeder KB, Jakobsson M, Crawford MH, Schurr TG, Boca SM, Conrad DF, Tito RY, Osipova LP, Tarskaia LA, Zhadanov SI, *et al.* (2009) Haplotypic background of a private allele at high frequency in the Americas. *Mol Biol Evol* 26: 995-1016.

Selvaraj P, Alagarasu K, Harishankar M, Vidyarani M, Nisha Rajeswari D, Narayanan PR (2008) Cytokine gene polymorphisms and cytokine levels in pulmonary tuberculosis. *Cytokine* 43: 26-33.

Sharma S, Rathored J, Ghosh B, Sharma SK (2010) Genetic polymorphisms in TNF genes and tuberculosis in North Indians. *BMC Infect Dis* 10.

Slattery ML, Wolff RK, Herrick JS, Caan BJ, Potter JD (2007) IL6 genotypes and colon and rectal cancer. *Cancer Causes Control* 18: 1095-105.

Sousa AO, Salem JI, Lee FK, Verçosa MC, Cruaud P, Bloom BR, Lagrange PH, David HL (1997) An epidemic of tuberculosis with a high rate of tuberculin anergy among a

population previously unexposed to tuberculosis, the Yanomami Indians of the Brazilian Amazon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 13227-32.

Stein CM, Zalwango S, Chiunda AB, Millard C, Leontiev DV, Horvath AL, Cartier KC, Chervenak K, Boom WH, Elston RC, *et al.* (2007) Linkage and association analysis of candidate genes for TB and TNF α cytokine expression: evidence for association with IFNGR1, IL-10, and TNF receptor 1 genes. *Hum Genet* 121: 663-73.

Steinman RM (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9: 271-96.

Steinman RM, Cohn ZA (1973) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137: 1142-62.

Szeszko JS, Healy B, Stevens H, Balabanova Y, Drobniowski F, Todd JA, Nejentsev S (2007) Resequencing and association analysis of the SP110 gene in adult pulmonary tuberculosis. *Hum Genet* 121: 155-60.

Tamm E, Kivisild T, Reidla M, Metspalu M, Smith DG, Mulligan CJ, Bravi CM, Rickards O, Martinez-Labarga C, Khusnutdinova EK, *et al.* (2007) Beringian standstill and spread of Native American founders. *PLoS One* 2, e829.

Tang F, Liu W, Zhang F, Xin ZT, Wei MT, Zhang PH, Yang H, Ly H, Cao WC (2008) IL-12 RB1 genetic variants contribute to human susceptibility to severe acute respiratory syndrome infection among Chinese. *PLoS One* 3, e2183.

Taype CA, Shamsuzzaman S, Accinelli RA, Espinoza JR, Shaw MA (2010) Genetic susceptibility to different clinical forms of tuberculosis in the Peruvian population. *Infect Genet Evol* 10: 495-504.

Tekin D, Kayaalti Z, Dalgic N, Cakir E, Soylemezoglu T, Isin Kutlubay B, Aydin Kilic B (2010) Polymorphism in the p2x7 gene increases susceptibility to extrapulmonary tuberculosis in Turkish children. *Pediatr Infect Dis J* 29: 779-82.

Thye T, Browne EN, Chinbuah MA, Gyapong J, Osei I, Owusu-Dabo E, Niemann S, Rüsç-Gerdes S, Horstmann RD, Meyer CG (2006) No associations of human pulmonary tuberculosis with Sp110 variants. *Journal of Medical Genetics* 43, no. 7.

Tosh K, Campbell SJ, Fielding K, Sillah J, Bah B, Gustafson P, Manneh K, Lisse I, Sirugo G, Bennett S, *et al.* (2006) Variants in the SP110 gene are associated with genetic susceptibility to tuberculosis in West Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 10364-8.

Tovo-Rodrigues L, Callegari-Jacques SM, Petzl-Erler ML, Tsuneto L, Salzano FM, Hutz MH (2010) Dopamine receptor D4 allele distribution in Amerindians: a reflection of past behavior differences? *Am J Phys Anthropol* 143: 458-64.

Tseng FC, Brown EE, Maiese EM, Yeager M, Welch R, Gold BD, Owens M, Cranston B, Hanchard B, El-Omar E, *et al.* (2006) Polymorphisms in cytokine genes and risk of *Helicobacter pylori* infection among Jamaican children. *Helicobacter* 11: 425-30.

Tsuneto LT, Probst CM, Hutz MH, Salzano FM, Rodriguez-Delfin LA, Zago MA, Hill K, Hurtado AM, Ribeiro-dos-Santos AKC, Petzl-Erler ML (2003) HLA class II diversity in seven Amerindian populations. Clues about the origins of the Aché. *Tissue Antigens* 62, no. 6: 512-526.

Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B (2006) TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24: 179-89.

Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J, Martin B, Wilhelm C, Stockinger B (2008) Transforming growth factor-beta 'reprograms' the

differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol* 9: 1341-6.

Von Behren J, Kreutzer R, Smith D (1999) Asthma hospitalization trends in California, 1983-1996. *J Asthma* 36: 575-82.

Waguespack N (2007) Why We're Still Arguing About the Pleistocene Occupation of the Americas *Evol Anthropol* 16: 63-74.

Wang C, Tang J, Song W, Lobashevsky E, Wilson CM, Kaslow RA (2004) HLA and cytokine gene polymorphisms are independently associated with responses to hepatitis B vaccination. *Hepatology* 39: 978-88.

Wang J, Tang S, Shen H (2010) Association of genetic polymorphisms in the IL12-IFNG pathway with susceptibility to and prognosis of pulmonary tuberculosis in a Chinese population. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29: 1291-5.

Wang S, Lewis CM, Jakobsson M, Ramachandran S, Ray N, Bedoya G, Rojas W, Parra MV, Molina JA, Gallo C, *et al.* (2007) Genetic variation and population structure in native Americans. *PLoS Genet* 3, e185.

Wang S, Wei M, Han Y, Zhang K, He L, Yang Z, Su B, Zhang Z, Hu Y, Hui W (2008) Roles of TNF-alpha gene polymorphisms in the occurrence and progress of SARS-Cov infection: a case-control study. *BMC Infect Dis* 8, 27.

Waters MR, Stafford TW (2007) Redefining the age of Clovis: implications for the peopling of the Americas. *Science* 315: 1122-6.

Waters MR, Stafford TW, McDonald HG, Gustafson C, Rasmussen M, Cappellini E, Olsen JV, Szklarczyk D, Jensen LJ, Gilbert MT, *et al.* (2011) Pre-Clovis mastodon hunting 13,800 years ago at the Manis site, Washington. *Science* 334: 351-3.

Wilson CB, Westall J, Johnston L, Lewis DB, Dower SK, Alpert AR (1986) Decreased production of interferon-gamma by human neonatal cells. Intrinsic and regulatory deficiencies. *J Clin Invest* 77: 860-7.

Xiao J, Sun L, Jiao W, Li Z, Zhao S, Li H, Jin J, Jiao A, Go Y, Jiang Z, *et al.* (2009) Lack of association between polymorphisms in the P2X7 gene and tuberculosis in a Chinese Han population. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 55, no. 1: 107-111.

Yang Y, Lingling S, Ying J, Yushu L, Zhongyan S, Wei H, Weiping T (2005) Association study between the IL4, IL13, IRF1 and UGRP1 genes in chromosomal 5q31 region and Chinese Graves' disease. *J Hum Genet* 50: 574-82.

Zembrzuski VM, Basta PC, Callegari-Jacques SM, Santos RV, Coimbra CE, Salzano FM, Hutz MH (2010) Cytokine genes are associated with tuberculin skin test response in a native Brazilian population. *Tuberculosis* 90: 44-9.

Zhang H, Zhang Q, Wang L, Chen H, Li Y, Cui T, Huang W, Zhang L, Yan F, Xu Y, *et al.* (2007) Association of IL4R gene polymorphisms with asthma in Chinese populations. *Hum Mutat* 28.

Zhang HQ, Deng A, Guo CF, Wang YX, Chen LQ, Wang YF, Wu JH, Liu JY (2010a) Association between FokI polymorphism in vitamin D receptor gene and susceptibility to spinal tuberculosis in Chinese Han population. *Arch Med Res* 41: 46-9.

Zhang L, Prather D, Vanden Eng J, Crawford S, Kariuki S, ter Kuile F, Terlouw D, Nahlen B, Lal AA, Slutsker L, *et al.* (2010b) Polymorphisms in genes of interleukin 12 and its receptors and their association with protection against severe malarial anaemia in children in western Kenya. *Malar J* 9.

Zhang LZ, Zhang TC, Pan FM, Zhang ZH, Li X (2010c) Interleukin-10 gene polymorphisms in association with susceptibility to chronic hepatitis C virus infection: a meta-analysis study. *Arch Virol* 155: 1839-42.

Zhou J, Chen DQ, Poon VK, Zeng Y, Ng F, Lu L, Huang JD, Yuen KY, Zheng BJ (2009) A regulatory polymorphism in interferon-gamma receptor 1 promoter is associated with the susceptibility to chronic hepatitis B virus infection. *Immunogenetics* 61: 423-30.

ANEXO - The epidemiology of tuberculosis in South Native Americans populations: implications for immune response patterns.

(a ser submetido à revista *Medical Anthropology*)

**The epidemiology of tuberculosis in South Native American populations:
implications for immune response patterns.**

Tuberculosis in Native Populations

Juliana Dal-Ri Lindenau¹, Francisco Mauro Salzano¹, Mara Helena Hutz^{1#}

¹ Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Corresponding Author:

Mara Helena Hutz

Departamento de Genética, Instituto de Biociências,

Universidade Federal do Rio Grande do Sul,

Av. Bento Gonçalves, 9500

91509-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel/Fax: 55-51-33086735

E-mail: mara.hutz@ufrgs.br

Abstract

Historically, tuberculosis (TB) was a major cause of population decline among Native South Americans and remains a leading cause of morbidity and mortality in these populations; however few susceptibility studies have been performed on these populations. Specifically in relation to purified protein derivative (PPD) skin test reactivity, all studies have reported that PPD reactivity in Amerindians is low as compared to populations of European or African descent. Anergy rates are high, usually being over 50%, even in populations with relatively high BCG coverage. These investigations have focused on socioeconomic factors as contributing to disease resistance and susceptibility; genetic differences between populations are also acknowledged in most of these studies; but, the basis for this genetic diversity remains largely unexplored.

Introduction

Tuberculosis (TB) is an ancient disease caused by the bacterial pathogen *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), which co-evolved with humans for millennia (Smith 2009). The disease continues to be an important public health problem despite the existence of national and international tuberculosis control programs. About one-third of the world's population is infected by MTB and one-tenth will develop active TB. More than 90% of TB cases are from developing countries (WHO 2009). Infection with MTB is controlled in most infected individuals, while in a minority of cases containment of infection fails over time, and active TB disease develops (Chan 2004). Although only a minority of exposed individuals develop active disease, morbidity and mortality in humans worldwide remain high, with nearly 2 million deaths annually (Kaufmann 2005; WHO 2009).

TB is highly endemic in Brazil. Despite major government investments in control measures, especially in recent decades, the annual incidence of notified cases surpasses 50 new cases per 100000 individuals (Kritski 2000; Barreto 2002). In some states and municipalities of the Amazon region, incidence rates may surpass 70 per 100000. Environmental factors such as poor economic conditions, malnutrition, stress, and overcrowding play a role in determining the prevalence of tuberculosis in human populations. But genetic and non-genetic factors of both the bacterium and the host should also be important in the immune response to MTB. The interaction between these different factors as well as their impact on disease development is presently unknown.

It is generally accepted that a competent immune response is key to control of MTB infection (Flynn 2001). Although the adaptive immune response induces the development of solid granulomas, which contain the bacteria (Ulrichs 2006), control of latent MTB infection also requires robust innate immunity. The precise mechanisms by which these innate processes contribute to the control of latent infection remain elusive (Dorhoi 2009). Innate and adaptive defense mechanisms contribute to anti-MTB immunity. The view that successful infection control mostly depends on adaptive responses reflects observations made with the intradermal application of tuberculin (purified protein derivative; PPD). Most TB patients develop a delayed-type hypersensitivity reaction to tuberculin and are, if remaining healthy, considered

protected from active TB (Thye 2009). Since the skin papule indicating PPD positivity contains reactive T lymphocytes, protection is believed to result from acquired T-cell-mediated immunity. PPD negativity can result from either lack of previous exposure, anergy due to overwhelming TB, or from any form of immunosuppression. In addition, antigen-specific tuberculin anergy in patients with pulmonary TB during the course of the disease and persisting after successful treatment has been reported (Delgado 2002). PPD negativity may also indicate innate immunity after exposure without induction of adaptive mechanisms.

Increasing evidence points to a major role for host genetics in explaining inter-individual variation in susceptibility to infectious diseases, since intracellular pathogens contribute to a significant proportion of infectious disease morbidity and mortality worldwide. Immune response to TB is regulated by interactions between lymphocytes with antigen-presenting cells and the cytokines secreted by these cell types. Upon infection, phagocytes are activated to produce proinflammatory cytokines including Tumor necrosis factor- α (TNF- α) and Interleukin-12 (IL-12). IL-12 drives T cells and natural killer cells (NK) to produce T helper 1 (Th1) cytokines such as Interferon- γ (IFN- γ) which activates infected macrophages to eliminate MTB (Flynn 2001). Antigenic stimulation of T cells in the presence of proinflammatory cytokines such as IL-6 and co-stimulatory molecules induce secretion of IL-2. Binding of IL-2 to IL-2 receptors induces clonal expansion of antigen-specific T cells, enhanced secretion of cytokines and expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules. IL-6 secreted by macrophages is involved in stimulating early IFN- γ production (Flynn 2001; Selvaraj 2008). IL-10, an anti-inflammatory cytokine secreted by alternatively activated macrophages and T cells, is known to down-regulate Th1 responses and suppresses the surface expression of MHC class II molecules. IL-4, a potent inducer of Th2 cell differentiation, down-regulates Th1 responses (Selvaraj 2008; Kidd 2003). The pattern of cytokine expression is genetically determined by polymorphisms in the genes that encode these interleukins (Kidd 2003).

Th1 cells are hypothesized to lead the attack against intracellular pathogens such as viruses, to raise the classic delayed-type hypersensitivity (DTH) skin response to viral and bacterial antigens, and to fight cancer cells. Th2 cells are believed to enhance protection against extracellular pathogens such as multicellular parasites (Kidd 2003).

2. Anergy and tuberculosis in Native American populations

TB is important among indigenous peoples in South America, not only because of its historical role in regional depopulation, but because it is still widespread. There are about 400 aboriginal ethnicities in the Americas, with approximately 50 million indigenous people living in Latin America, representing 10% of the total population (Salzano 2002). Most of these groups suffer discrimination, and live in conditions of marginality and poverty. There are also difficulties in accessing indigenous regions, limiting the provision of health services to them. All these limitations are important for the epidemiology of tuberculosis in South Native American populations. These groups have a TB prevalence higher than those of the general populations of their countries, and seem particularly vulnerable to it, with a greater risk of acquiring and dying from TB than non-Indians (Coimbra 2007). Table 1 presents the tuberculosis incidence ratios in eight South American countries (Abadía 2009; Culqui 2010; Greene 2004; PAHO 2004).

Several authors suggested that tuberculosis arrived in the Americas together with the earliest people who crossed the Bering land bridge and that it reached epidemic levels when large communities were formed. When people lived in small hunter-gatherer groups, tuberculosis was only an occasional disease (Daniel 2000). Mathematical models showed that in pre-historic cultures between 180 to 400 people would be necessary for the maintenance of tuberculosis as an endemic disease. In smaller groups, MTB or the host would not survive (McGrath 1988).

The earliest evidence for tuberculosis in the Americas was detected in Peruvian mummies (Salo 1994). Other studies also showed indication of tuberculosis in USA, Canadian and Chilean prehistoric populations (Daniel 2000). These cases are dated around year 500 and continue until the beginning of the colonial era. Despite this finding for the presence of tuberculosis in high-density populations of highland South America (Salo 1994; Allison 1973), there is no evidence for pre-Columbian exposure of lowland groups. In addition, the response to MTB soon after contact indicates that remote lowland groups are susceptible to this pathogen. Based on data from Europe, Grigg argued that tuberculosis epidemics run for about 300 to 400 years (Grigg 1958). Considering this view, an epidemic wave of tuberculosis beginning in the Andean region of South America about 1500 years ago, would leave many generations for

susceptibility to redevelop among Native Americans. This epidemic probably did not reach lowland populations.

High susceptibility to tuberculosis is probably common in most South American Native communities. The median percentage of positive responses to tuberculin tests (PPD) among adults of indigenous South American communities that have not been vaccinated with BCG at the time of the studies is 18.5% (range, 0% –71%; 24 communities (Salzano 1988). Considering the investigations that took place between the 1940s and 1960s there was a correspondence between degree of contact with non-Indians and positive reactions to PPD.

More recent studies of TB immunology of indigenous peoples have stressed the characteristics of PPD skin test reactivity. All these studies have reported that PPD reactivity in Amerindians is low as compared to those of populations of European descent. Anergy rates are high, occurring usually over 50% of the subjects tested, even in populations with relatively high BCG coverage (Sousa 1997; Escobar 2004; Hurtado 2003).

A survey of an emerging tuberculosis epidemic among the Yanomami of the Amazonian rain forest provided a unique opportunity to study the impact of tuberculosis on an isolated population (Sousa 1997). An extraordinarily high prevalence of active tuberculosis (6.4%) was observed among the Yanomami, a ratio 100-fold higher than that observed in the Amazonian state in general, where they live. Fragment length restriction patterns and a MTB phage lysotype profile were similar to that observed in local strains, indicating that tuberculosis was introduced in this population in a recent time. Studies on cell-mediated and humoral immune responses of the Yanomami compared to those of other residents of the region suggested profound differences in immunological responsiveness to MTB infection. Among the Yanomami, a very high prevalence of tuberculin skin test anergy was found (76%). The Yanomami also had higher titers of antibodies against MTB glycolipid antigens (>70%) than the control Brazilians of European descent (14%). The antibodies were mostly of the IgM isotype. Among the tuberculosis patients who also produced IgG antibodies, the titers of IgG4 were significantly higher among the Yanomami than in the control population. The results suggest that the first encounter of the Yanomami with tuberculosis engendered a diminished cell-mediated immune response and an increased antibody production. The peculiarities in the immune responsiveness of the Yanomami may be due in part to a

high prevalence of diminished cell-mediated immunity with high rates of antibody production, and Th2-mediated activation (Sousa 1997). Such Th2 immune responses compete with Th1-mediated defenses that are more effective against infectious diseases such as tuberculosis.

The study made by Amarante *et al* (Amarante 1999) in the borders of the Araguaia River (56°W 15°S) with Karajá and Tapirapé populations showed that these groups had a low occurrence of PPD reactors, even in regions with high vaccination coverage (Amarante 1999). But no further investigations were conducted at the immunological or genetic level in these groups.

The Brazilian state of Rondônia, near the border with Bolivia, is the home of the Pakaanóva Amerindians, which began to make contact with other groups around 1950. At that time, half the population died from epidemics of influenza, malaria and measles. It was at this same period that tuberculosis was introduced, and since it is the leading cause of mortality and morbidity in this population. The epidemiology of this group shows an infant mortality due to diarrhea and pneumonia much higher than that observed in non-indigenous populations of the region; endemic malaria and intestinal parasitism are widespread. This could explain the high rate of non-reactors to PPD observed in this population, with 54.8% of the population having skin reaction tests of <5mm (Escobar 2004). As discussed above, the diseases to which this population is exposed stimulates a predominance of a Th2 pattern of immune response, leading to an increased susceptibility to tuberculosis and a lack of PPD reaction.

In the same Brazilian state, among 1991 and 2002, the mean incidence of tuberculosis among the Suruí was 2518.9/100000, with approximately half of cases diagnosed in children younger than 15 years. The contact of this group with other people began in 1969 and, since then, several epidemics of infectious diseases decimated the population. Examples of these epidemics are malaria, influenza, measles, and tuberculosis, the latter being still currently a major cause of morbidity and mortality (Basta 2006). The prevalence of tuberculosis among the Surui presently is 815.2/100000, much higher than that of the population of Rondônia (37.5/100000) or Brazil in general (41.9/100000) in 2003. In addition, the rate of anergy to PPD in this group is extremely high, exceeding 60% (Basta 2006). Genotyping of MTB isolates present in this population, had the LAM genotype and one repeat at MIRU locus 24, both characteristics of the MTB modern group (Basta 2006). In other studies in South

America (Venezuela and Paraguay) the LAM family is also predominant (Abadía 2009). These results reinforce the view that MBT infection was introduced only recently in these populations.

In Central Brazil the Guarani-Kaiowá presented an incidence of tuberculosis of 740/100 000 whereas in the state of Mato Grosso do Sul where they live the general incidence is of 49/100 000 individuals. The Amerindian rate is the same since 1967, showing that the actions for control of the disease have not been efficient in this population (Marques 2003).

The most recent study in Brazil was conducted among the Xavante Indians of the state of Mato Grosso, Central Brazil. Permanent contact of the Xavante with the national Brazilian society took place in the late 1940s. During the next two decades nearly half of the population died due to epidemics of infectious diseases (Coimbra 2002). Results from a recent TB survey carried out in 2006 among the Pimentel Barbosa Xavante indicated a moderately high annual risk of TB infection (0.94%) and a moderate prevalence of infection (16.6%), defined as a Tuberculin skin test reaction ≥ 10 mm (Basta 2010). In the 1960's, Neel *et al* (Neel 1968) studied the same Amerindian group; at that time, the Xavante had not yet been exposed to BCG and just one person tested positive for PPD. At present, although there is almost 90% BCG coverage in the population, a high percentage of anergy to PPD (69%) is still observed (Basta 2010).

The Xavante cytokine allele frequencies were different from those reported in other major ethnic groups. When these allele frequencies were compared to those described for Asians, with whom they share more recent common ancestors, we observed that for three SNPs the minor allele presented higher frequencies but for eight absence or very low prevalences occurred; whereas in the remaining eight polymorphisms the allele frequencies were into the range of variation as that of Asians. It is clear, therefore, that the Xavante present a very distinctive pattern of frequencies for most of these systems. Since no information for other Amerindian samples has been reported for these polymorphisms, it is difficult to infer whether the three variants lost and the other differences were due to microevolutionary processes or if these polymorphisms were not present in the founder group (Zembruski 2010).

Although less investigated, the pattern of TB susceptibility and anergy in other indigenous South American populations is similar to those described in Brazil except for the Trio population from Suriname. A study conducted between 1995 and 2000

among them showed a prevalence of tuberculosis of 4.2/1,000 per year, while the population of Suriname as a whole presents a prevalence of 0.16/1,000 per year. Unlike what has been observed in Native Brazilian populations, the rate of anergy to PPD in the Trio was not high. In addition, there was a low proportion of latent as compared to active infection, indicating a high risk of progression to active tuberculosis after MTB infection there. A low prevalence of latent infection among children was also found, and the highest frequency was found in older persons indicating that the infections occurred mainly in the past (van Crevel 2004). The Trio would therefore be an example of a population that had reached a later stage in the tuberculosis epidemic pattern.

A study with the Warao children of Venezuela reported that 17.6% of them were anergic to PPD. The authors presented as possible explanations for this high rate of anergy viral, bacteria and parasites infection rates to which this population is exposed, as well as undernutrition. Antibody analyses revealed that individuals anergic to PPD had high IgE levels. It is known that IgE is dependent on IL-4 and is therefore a marker of Th2 response, and that their levels decrease after tuberculosis treatment when the Th1 response is prevalent in the organism (Araujo 2004). An important aspect of Th2 responses is overproduction of immunoglobulin E (IgE). South American Indians produce IgE at some of the highest levels ever reported anywhere in the world and yet they do not experience asthma, allergies, or the more severe manifestation of atopy, lethal anaphylaxis, that individuals with high IgE levels in other populations generally experience (Hurtado 2003).

The Aché population lives in the tropical forests of the southwestern part of South America in Paraguay. There is no evidence that they ever experienced amicable relations with other ethnic populations in Paraguay until the 1960s and 1970s, when various groups made contact with outsiders. Rates of tuberculosis infection and disease reached epidemic proportions during the 1990s in two Aché communities of Mbaracayú. In fewer than 15 years after first contact, 18% of the population had been diagnosed with active tuberculosis (Hurtado 2003). The negative tuberculin reaction rate observed among the Aché is slightly lower (68.3%) than the rate reported for the Yanomami and the Xavante of Brazil (76% and 69% respectively) (Sousa 1997; Hurtado 2003; Basta 2010), suggesting that the Amerindian immune response to tuberculosis may be different from that of populations of African or European ancestry.

On average, when compared to other populations, Amerindians have much less heterogeneity in highly polymorphic loci that control the immune system, such as class I and II histocompatibility antigens (MHC), and the immunoglobulin allotype genes (Black 1994). The genetic pattern of cytokine genes has only been investigated in the Xavante, but as previously stated (Zembrzuski 2010) high differences in allele frequencies and reduced diversity in important genes for TB susceptibility were observed when compared to other ethnic groups.

The ability to switch between the Th1 and Th2 immune response pattern is essential to organism success. Considering that an individual is exposed to different kinds of antigens every day, a variability of the immune responses is important for the success in fighting disease. At the population level, it is important that the majority of the individuals develop an appropriate response to the antigen. If the antigens are the same all the time, an invariable immune system would not be a problem. However, when a new antigen is present, the lack of variability could lead to an inappropriate immune response and the population could be decimated. Therefore the relationship between low genetic diversity and Th2 predominance as well as the interaction between genetic diversity and helminthic infection on Th2 predominance should be more properly investigated.

3. Conclusion

At the community level, socioeconomic and epidemiologic (including access to adequate health services) factors play the leading roles in TB morbidity and mortality; but at the individual level the containment and cure of TB requires an effective cell-mediated immune response. Once infected with MTB, the risk of an individual to develop the disease is influenced by many factors, including nutritional status, presence of co-infections, exposure to other environmental microbes, and previous vaccination. However, it is clear that genetic host factors also play an important role in controlling disease susceptibility to intracellular pathogens (van de Vosse 2004). Human immune response genes are more diverse than any other gene group, suggesting that infectious diseases have been important driving forces in human evolution (Newport 2004). Candidate genes studies for immunogenetic polymorphisms and their association with infectious diseases in humans should add to answer these important questions. Moreover, the absence of delayed-type hypersensitivity responses to mycobacterial

antigens during active TB infection can be associated with poor clinical outcome, and new health policies for populations having individuals with this condition should be implemented.

Acknowledgments

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support.

References:

- Abadía, E., M. Sequera, D. Ortega, M.V. Méndez, A. Escalona, O. Da Mata, E. Izarra et al.
2009 *Mycobacterium tuberculosis* ecology in Venezuela: epidemiologic correlates of common spoligotypes and a large clonal cluster defined by MIRU-VNTR-24, *BMC Infect Dis* 9: 122
- Allison, M. J, D. Mendoza, A. Pezzia
1973 Documentation of a case of tuberculosis in Pre-Columbian America, *Am Rev Respir Dis*, 107:985-91.
- Amarante, J. M., V. L. A. Costa, F. A. Silva
1999 Sensibilidade tuberculínica e vacina BCG entre os índios do Araguaia – MT, 1997, *Boletim de Pneumologia Sanitária*, 7(1): 79-86.
- Araujo, Z., J. H. Waard, C. Fernández de Larrea, D. López, C. Fandiño, A. Maldonado, E. Hernández et al.
2004 Study of the antibody response against *Mycobacterium tuberculosis* antigens in Warao Amerindian children in Venezuela, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99(5): 517-24.
- Barreto, M. L., L.C. Rodrigues, S.S. Cunha, S. Pereira, M.A. Hijjar, M. Y. Ichihara, S. C. de Brito and I. Dourado.
2002 Design of the Brazilian BCG-REVAC trial against tuberculosis: a large, simple randomized community trial to evaluate the impact on tuberculosis of BCG revaccination at school age, *Control Clin Trials*, 23:540-53.
- Basta, P. C., C. E. Coimbra, A. L. Escobar, R. V. Santos, L. C. Alves, L. S. Fonseca
2006 Survey for tuberculosis in an indigenous population of Amazonia: the Suruí of Rondônia, Brazil, *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100(6): 579-85.
- Basta, P. C., C. E. Coimbra, L. A. Camacho, R. V. Santos
2006 Risk of tuberculous infection in an indigenous population from Amazonia, Brazil *Int J Tuberc Lung Dis* 10(12): 1354-9.
- Basta, P. C., M. A. Oelemann, W. M. Oelemann, L. S. Fonseca, C. E. Coimbra
2006 Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum from Suruí Indian subjects, Brazilian Amazon, *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101(6): 581-4.

- Basta, P. C., C. E. Coimbra, J. R. Welch, L. C. Corrêa Alves, R. V. Santos, L. A. Bastos Camacho
2010 Tuberculosis among the Xavante Indians of the Brazilian Amazon: an epidemiological and ethnographic assessment, *Ann Hum Biol*, 37:643-57.
- Black, F. L.
1994 An explanation of high death rates among New World peoples when in contact with Old World diseases, *Perspect Biol Med*, 37:292-307.
- Chan, J. and J.L. Flynn
2004 The immunological aspects of latency in tuberculosis, *Clin Immunol*, 110:2-12.
- Coimbra, C., N. Flowers, F. Salzano, R. Santos
2002 *The Xavante in Transition: Health, Ecology, and Bioanthropology in Central Brazil*, Ann Arbor: University of Michigan Press.
- Coimbra, C. E. and P.C. Basta
2007 The burden of tuberculosis in indigenous peoples in Amazonia, Brazil, *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 101:635-6.
- Culqui, D. R., O. V. Trujillo, N. Cueva, R. Aylas, O. Salaverry, C. Bonilla
2010 Tuberculosis in the indigenous population of Peru 2008, *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 27(1): 8-15.
- Daniel, T. M.
2000 The origins and precolonial epidemiology of tuberculosis in the Americas: can we figure them out? *Int J Tuberc Lung Dis*, 4(5): 395-400.
- Delgado, J. C., E.Y. Tsai, S. Thim, A. Baena, V.A. Boussiotis, J. M. Reynes, S. Sath, P. Grosjean, E. J. Yunis and A. E. Goldfeld.
2002 Antigen-specific and persistent tuberculin anergy in a cohort of pulmonary tuberculosis patients from rural Cambodia, *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:7576-81.
- Dorhoi, A. and S.H. Kaufmann
2009 Fine-tuning of T cell responses during infection, *Curr Opin Immunol*, 21:367-77.
- Escobar, A. L., C. E. Coimbra, L. A. Camacho, R. V. Santos

- 2004 Tuberculin reactivity and tuberculosis epidemiology in the Pakaanóva (Wari') Indians of Rondônia, south-western Brazilian Amazon, *Int J Tuberc Lung Dis* 8(1): 45-51.
- Flynn, J. L. and J. Chan
2001 Immunology of tuberculosis, *Annu Rev Immunol*, 19:93-129,
- Greene, J. A.
2004 An ethnography of nonadherence: culture, poverty, and tuberculosis in urban Bolivia, *Cult Med Psychiatry*, 28(3): 401-25.
- Grigg, E. R.
1958 The arcana of tuberculosis with a brief epidemiologic history of the disease in the U.S.A., *Am Rev Tuberc* 78(2): 151-72.
- Hurtado, A. M., K. R. Hill, W. Rosenblatt, J. Bender, T. Scharmen
2003 Longitudinal study of tuberculosis outcomes among immunologically naive Aché natives of Paraguay, *Am J Phys Anthropol*, 121(2): 134-50.
- Kaufmann, S. H., S.T. Cole, V. Mizrahi, E. Rubin, C. Nathan.
2005 *Mycobacterium tuberculosis* and the host response, *J Exp Med*, 201:1693-7.
- Kidd, P
2003 Th1/ Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease, *Altern Med Rev*, 8(3): 223-46.
- Kritski, A.L. and A. Ruffino-Netto
2000 Health sector reform in Brazil: impact on tuberculosis control, *Int J Tuberc Lung Dis*, 4:622-6.
- Marques, A. M. and R. V. da Cunha
2003 Assisted treatment and tuberculosis cure and treatment dropout rates in the Guaraní-Kaiwá Indian nation in the municipality of Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil, *Cad Saude Publica* 19(5): 1405-11.
- McGrath, J. W.
1988 Social networks of disease spread in the lower Illinois valley: a simulation approach, *Am J Phys Anthropol*, 77(4): 483-96.
- Neel, J. V., A. H. Andrade, G. E. Brown, W. E. Eveland, J. Goobar, W. A. Sodeman, G. H. Stollerman, E. D. Weinstein and A. H. Wheeler.
1968 Further studies of the Xavante Indians. IX. Immunologic status with respect to various diseases and organisms, *Am J Trop Med Hyg*, 17:486-98.

Newport, M. J. and S. Nejentsev

2004 Genetics of susceptibility to tuberculosis in humans, *Monaldi Arch Chest Dis*, 61:102-11.

Pan American Health Organization

2004 Encuentro Regional para el análisis del acceso a tratamiento anti-tuberculoso em poblaciones indígenas: Documento memoria. Ciudad de Panamá, 13–15 octubre 2004. In: <http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/tb-indigenas-pan.htm>

Salo, W., A.C. Aufderheide, J. Buikstra, T.A. Holcomb

1994 Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy, *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 2091–2094.

Salzano, F. M. and S. M. Callegari-Jacques

1988 *South American Indians: a Case Study in Evolution*, Claredon Press- Oxford.

Salzano, F. M. and M.C. Bortolini

2002 *The Evolution and Genetics of Latin American Populations*, Cambridge University Press.

Selvaraj, P., K. Alagarasu, M. Harishankar, M. Vidyarani, D. Nisha Rajeswari, P. R. Narayanan.

2008 Cytokine gene polymorphisms and cytokine levels in pulmonary tuberculosis, *Cytokine*, 43:26-33.

Smith, N. H., R. G. Hewinson, K. Kremer, R. Brosch, S. V. Gordon

2009 Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*, *Nat Rev Microbiol*, 7:537-44.

Sousa, A. O., J. I. Salem, F. K. Lee, M. C. Verçosa, P. Cruaud, B. R. Bloom, P. H. Lagrange, H. L. David.

1997 An epidemic of tuberculosis with a high rate of tuberculin anergy among a population previously unexposed to tuberculosis, the Yanomami Indians of the Brazilian Amazon, *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(24): 13227-32.

Thye, T., E.N. Browne, M.A. Chinbuah, J. Gyapong, I. Osei, E. Owusu-Dabo, N. W. Brattig, et al.

2009 IL10 haplotype associated with tuberculin skin test response but not with pulmonary TB, *PLoS One*, 4:e5420.

Ulrichs, T. and S. H. Kaufmann

- 2006 New insights into the function of granulomas in human tuberculosis, *J Pathol*, 208:261-9.
- van Crevel, R., D. J. van Doorninck, J. E. van Ams, H. T. K. Fat, S. G. S. Vreden en, J. W. M. van Der Meer.
- 2004 Tuberculose onder Trio-indianen in Suriname, *Ned Tijdschr Geneeskd*, 148(9): 425-429.
- van de Vosse, E., M. A. Hoeve, T. H. Ottenhoff
- 2004 Human genetics of intracellular infectious diseases: molecular and cellular immunity against mycobacteria and salmonellae, *Lancet Infect Dis*, 4:739-49.
- World Health Organization Annual Report 2009.
- 2009 Global Tuberculosis Control—Epidemiology, Strategy, Financing. WHO: Geneva, Switzerland, In http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/en/index.html
- Zembrzuski, V. M., P. C. Basta, S. M. Callegari-Jacques, R. V. Santos, C. E. Coimbra, F. M. Salzano, M. H. Hutz
- 2010 Cytokine genes are associated with tuberculin skin test response in a native Brazilian population, *Tuberculosis* 90(1): 44-9.

Table 1: Incidence ratios to tuberculosis in South America.

Country	Incidence Ratios (/100 000)	
	Native	General
Nicaragua	55.5	45.6
Venezuela	70-105	34
Colombia	112 - 60	26.1
Peru	300-400	106
Paraguay	392.2	37.8
Brazil	189.2	46.4
Bolivia	390	78

Source: (Abadía 2009) for Venezuela, (Culqui 2010) for Peru, (Greene 2004) for Bolivia, and (PAHO 2004) for all others.