

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**SUSCETIBILIDADE GENÉTICA À INFECCÃO PELO *Mycobacterium tuberculosis*
EM INDÍGENAS DA ETNIA XAVANTE (MATO GROSSO - BRASIL)**

VERÔNICA MARQUES ZEMBRZUSKI

**Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Genética e Biologia
Molecular da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em Ciências**

ORIENTADOR: Profa. Dra. MARA HELENA HUTZ

PORTO ALEGRE, JANEIRO DE 2009

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), Institutos do Milênio, Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

A aluna recebeu bolsa de estudos concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

*“Nós e nossos agentes patogênicos
estamos agora envolvidos em uma
crescente disputa evolucionista, em que a
morte de um concorrente é o preço da
derrota e a seleção natural desempenha o
papel de árbitro.”*

Jared Diamond in Armas, Germes e Aço (1997)

AGRADECIMENTOS

Ao longo destes quatro anos de doutorado, tive o apoio de muitas pessoas que colaboraram de várias maneiras para a realização desta tese. Gostaria de agradecer...

Aos meus pais, por todo o apoio emocional, financeiro e logístico. Como eu já havia dito antes: “Vocês são a essência da minha vida”.

À Fernanda, minha irmã, por acompanhar de perto (ou de longe) meus momentos de raiva, de frustração e de tristeza, e os meus momentos de alegria, as novidades, as viagens e tudo mais que essa tese me proporcionou.

Às amigas Alessandra Tamajusuku, Samanta Campos e Viviane Kogler, pela grande amizade e por compartilharmos experiências de nossas vidas pessoais e científicas com muito bom humor.

Às amigas Júlia Genro e Verônica Contini, pelas discussões e boas risadas, sempre com muito vinho ou champagne.

À Fabiana Kohlrausch, simplesmente por ser uma amiga imprescindível, nos bons e nos maus momentos.

À Thatiana Cappi e à Renata Braga, por me salvarem em momentos críticos em que a combinação “samba e chope” ajudou muito.

Ao Ricardo Dobrovolski, pela agradável e surpreendente companhia nestes últimos meses de doutorado. Obrigada pelas discussões científicas, filosóficas e sociais, e pelas valiosas sugestões que destes à minha tese.

Às gurias do futebol, aos colegas de laboratório “do presente ou do passado” (especialmente Ana, Janaína, Marilu, Silvana e Tatiana G.), aos meus familiares, colegas e demais amigos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS. Ao Elmo, à Ellen e aos professores.

À Mara Hutz, pela orientação e confiança depositada no meu trabalho, não só nesta tese, mas ao longo dos quase nove anos em que estive no Departamento de Genética. Obrigada pela oportunidade de trabalhar neste projeto de saúde indígena. Afinal, há tempos que eu tentava colocar o “componente indígena” em tudo o que vinha fazendo.

À professora Sidia Callegari-Jacques, pela ajuda com as “eternas” estatísticas que, no meu caso, nunca eram as básicas. Apesar disso, levamos as coisas sempre de um jeito bem humorado.

Ao professor Francisco Salzano, pelo exemplo de pesquisador e, principalmente, pelo pioneirismo no estudo genético das populações indígenas brasileiras.

Ao Carlos Coimbra e ao Ricardo V. Santos, pelos seus estudos epidemiológicos com populações indígenas e pelas várias conversas. Com certeza, elas fizeram muita diferença.

A todas as pessoas que participaram do trabalho de campo realizado na aldeia *Etêñitépa*, em julho de 2006, tornando-o descontraído e prazeroso. Esse foi um momento único e especial na minha vida acadêmica e pessoal, sem o qual esta tese não teria tido o mesmo brilho.

- Ao Paulo Basta, não somente pelo seu profissionalismo, mas por sua amizade. Agora acredito na frase: “Quando o mosquito da saúde indígena te picar, não tem jeito. Você não conseguirá mais sair”.

- Ao Luiz Carlos, pela amizade e pela paciência nas explicações sobre laudos de raios-X e granulomas.

- À Aline, Gabriella, Geisa, James, João, Perseverando, Silvia, à equipe de técnicos de enfermagem e outros profissionais que colaboraram para a realização do trabalho.

- Aos agentes de saúde Francisco Xavante e Jamiro Xavante, pela imensa ajuda na tradução e por acompanharem nosso trabalho todo o tempo.

Aos líderes Tsuptó Xavante e Paulo Xavante, e a todos os Xavante que conheci e pude conviver naqueles dias. Agradeço à hospitalidade, ao empenho na realização da coleta, à disponibilidade para a doação das amostras e a todas as atividades extra-acadêmicas que essas pessoas nos proporcionaram, como o acompanhamento de suas atividades diárias, celebrações e festas.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	09
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO.....	15
<i>I.1. Considerações gerais.....</i>	<i>16</i>
<i>I.2. Características da doença.....</i>	<i>17</i>
<i>I.3. O bacilo de Koch e a vacina BCG.....</i>	<i>19</i>
<i>I.4. Patogênese.....</i>	<i>21</i>
<i>I.5. Mecanismos imunológicos.....</i>	<i>23</i>
<i>I.6. Bases genéticas.....</i>	<i>25</i>
<i>I.7. Anergia.....</i>	<i>37</i>
<i>I.8. Grupos indígenas brasileiros.....</i>	<i>38</i>
<i>I.8.1. Os índios Xavante.....</i>	<i>39</i>
CAPÍTULO II. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	42
CAPÍTULO III. Immune response genes are associated with tuberculin anergy in a native Brazilian population.....	45
CAPÍTULO IV. No association between genes related to immune response and susceptibility to tuberculosis in Xavante Indians from Central Brazil.....	78

CAPÍTULO V. DISCUSSÃO.....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
ANEXO.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

AIDS: Síndrome da imunodeficiência adquirida

BCG: bacilo de Calmette-Guérin

D3: colecalciferol

DTH: hipersensibilidade do tipo tardia

FUNASA: Fundação Nacional de Saúde

HIV: vírus da imunodeficiência humana

IFN: interferon

IFNGR: receptor de interferon gama

IL: interleucina

IL-1B: interleucina-1 beta

IL-4R: receptor de interleucina-4

IL-12RB: cadeia β do receptor de IL-12

INT: íntron

ISA: Instituto Socioambiental

MDR: resistente a múltiplas drogas

MHC: complexo principal de histocompatibilidade

mRNA: RNA mensageiro

MS: Ministério da Saúde

Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*

NF κ B: fator nuclear κ B

NK: célula exterminadora natural

NRAMP: proteína do macrófago associada à resistência natural

OMS: Organização Mundial de Saúde

P2X7: receptor purinérgico P2X7

PPD: derivado de proteína purificada

PTPN22: proteína tirosina fosfatase, não-receptor tipo 22

RNA: ácido ribonucléico

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SLC11A1: membro 1 do carregador de solutos da família 11A

SP110: proteína de corpo nuclear

TB: tuberculose

Th: célula T ajudante

TLR: receptor “*toll-like*”

TNF: fator de necrose tumoral

TNFR1: receptor 1 do fator de necrose tumoral

VDR: receptor de vitamina D

A tuberculose, doença infecto-contagiosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), constitui, em escala mundial, um sério problema de saúde pública, com altos índices de morbidade e mortalidade. Alguns grupos são mais suscetíveis à doença, como é o caso das populações indígenas brasileiras. Estudos prévios indicam um risco dez vezes maior de contrair a tuberculose, e morrer devido a ela, nessas populações do que na população brasileira como um todo. Exemplos disso são as altas incidências de tuberculose em indivíduos da etnia Xavante. Evidências sugerem um forte componente genético na suscetibilidade à tuberculose e aos fenótipos relacionados à doença. Um desses fenótipos é a anergia ao PPD, isto é, a ausência de reatividade ao teste que utiliza derivados de proteína purificada da bactéria para verificar resposta imune celular e diagnosticar infecção pelo *Mtb*. Vários são os genes associados à suscetibilidade à tuberculose ou à infecção pelo bacilo em diferentes populações. Com o objetivo de investigar essa suscetibilidade genética em ameríndios brasileiros, neste estudo foram analisados 19 polimorfismos em 15 genes envolvidos com a resposta imune já identificados com resistência/suscetibilidade à tuberculose (*SLC11A1*, *VDR*, *SP110*, *P2X7*, *PTPN22*, *IL1B*, *IL12RB1*, *IFNGR1*, *TNFR1*, *IFNG*, *IL2*, *IL10*, *IL6*, *IL4* e *IL4R*). A amostra foi composta por 492 indivíduos de uma população da etnia Xavante, da aldeia *Etéñitépa*, localizada no Estado de Mato Grosso, região central do Brasil. Os seguintes resultados foram obtidos: a) redução ou ausência de variabilidade em seis variantes (*SP110* éxon 11 C>T e íntron 6 C>T, *PTPN22* 1858 C>T, *IL12RB1* 641 A>G e 1094 T>C e *IL6* -174 G>C); b) associação entre os polimorfismos *IFNG* +874 A>T e *IL4* -590 T>C e reatividade ao PPD (P=0,018 e 0,009, respectivamente); após ajustes na regressão de Poisson com variância robusta, os genótipos

IFNG +874 T/A e *IL4* -590 C/C foram duas vezes mais prevalentes do que seus genótipos complementares (1,9; CI: 1,1-3,1 e 2,0; CI: 1,2-3,3, respectivamente); c) o polimorfismo *IL10* -1082 A>G foi associado com anergia ao PPD ($P < 0,001$); o risco de anergia foi de 1,5 (CI: 1,2-1,7) em indivíduos homozigotos para o alelo G, comparados com portadores do alelo A; d) em relação à reatividade ao PPD, nenhum dos outros polimorfismos mostrou alguma associação; e) não foram observadas associações significativas entre os genes estudados e tuberculose. Os resultados obtidos sugerem que o componente genético tem uma grande influência nos mecanismos imunes relacionados à anergia ao PPD e, conseqüentemente, à infecção pelo *Mtb* nos Xavante. Apesar da ausência de associações em relação à tuberculose, há uma complexidade dos fatores genéticos nas doenças infecciosas e o envolvimento de muitos genes na etiologia da doença. Portanto, a replicação deste estudo em outros grupos indígenas e a pesquisa de outros genes, que poderiam estar envolvidos com a suscetibilidade à tuberculose e aos fenótipos a ela relacionados, são essenciais para se ter um melhor entendimento do sistema imune humano e seus complexos mecanismos de resposta, podendo fornecer, futuramente, novos alvos para tratamentos preventivos e profiláticos diferenciados para grupos étnicos específicos.

ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease which is caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). It constitutes a serious problem in public health, causing high standards of morbidity and mortality all over the world. Some groups are more susceptible to the disease such as, for example, the Brazilian indigenous populations. According to previous studies, the risk of getting this disease and consequently die from it is ten times higher for indigenous populations than for the Brazilian population in general. As an example of this phenomenon, there is the Xavante group. These individuals suffer from a high incidence of tuberculosis among them. Evidences suggest a strong genetic component related to this susceptibility to tuberculosis, and to the phenotypes related to the disease as well. One of these phenotypes is anergy to PPD, i.e., the absence of reactivity to the test in which derivatives of the purified protein from the bacteria are employed, in order to check an immune cellular response and to diagnose infection by *Mtb*. There are many genes associated with the susceptibility to tuberculosis or to the infection through the bacillus in different populations. The aim of this study was to investigate TB genetic susceptibility in Brazilian Amerindians, considering 19 polymorphisms in 15 genes involved in the immune response, previously identified with resistance/susceptibility to tuberculosis (*SLC11A1*, *VDR*, *SP110*, *P2X7*, *PTPN22*, *IL1B*, *IL12RB1*, *IFNGR1*, *TNFR1*, *IFNG*, *IL2*, *IL10*, *IL6*, *IL4*, and *IL4R*). The sample was composed by 492 individuals from a Xavante population, at the *Etéñitépa* village, Mato Grosso State, Central Brazil. The following results were obtained: a) reduction or absence of variability in six variants (*SP110* exon 11 C>T and intron 6 C>T, *PTPN22* 1858 C>T, *IL12RB1* 641 A>G and 1094 T>C and *IL6* -174 G>C); b) association between the polymorphisms *IFNG* +874 A>T and *IL4* -590 T>C and

reactivity to PPD ($P=0.018$ and 0.009 , respectively); after adjustments by Poisson regression with robust variance the *IFNG* +874 T/A and *IL4* -590 C/C genotypes were two times more prevalent than their complementary genotypes (1.9; CI: 1.1-3.1 e 2.0; CI: 1.2-3.3, respectively); c) *IL10* -1082 A>G polymorphism was associated with anergy to PPD ($P<0.001$); the risk of anergy was 1.5 (CI: 1.2-1.7) in G/G homozygous individuals when compared with carriers for the A allele; d) in relation to reactivity to PPD, no associations were observed for the other polymorphisms; e) no associations were observed between the genes studied and tuberculosis. The results suggest that the genetic component has a important influence in immune mechanisms related to PPD anergy, and therefore to the infection by *Mtb* in the Xavante group. In spite of the absence of association related to tuberculosis, there is also a great complexity of genetic factors in infectious diseases, and the involvement of many genes in the disease etiology. Consequently, the replication of this study in other indigenous groups and also the investigation of other genes that could be involved with susceptibility to tuberculosis and to phenotypes related to it as well are essential. In this way, we would have a better understanding of the human immune system and its complex mechanisms of response. This research could provide, in the future, new targets for preventive and prophylactic treatments that would be different, according to specific ethnic groups.

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO

I.1. Considerações gerais

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa causada por uma micobactéria (*Mycobacterium tuberculosis* – *Mtb*), que se transmite principalmente por via aérea de uma pessoa doente para um indivíduo sadio. Constitui, em escala mundial, um sério problema de saúde pública e calcula-se que oito milhões de pessoas a contraem e três milhões morrem devido a essa doença anualmente (Organização Mundial de Saúde – OMS, 2006). Para o Brasil, o Ministério da Saúde (MS) registra oficialmente entre 80.000 e 90.000 novos casos por ano, sendo o coeficiente anual da ordem de 54 a 58 novos casos por 100.000 habitantes, com alguma variação anual (MS, 1999). O país ocupa a sexta posição no mundo em termos de número absoluto de casos de tuberculose, após Filipinas, África do Sul, Índia, Vietnã e Rússia. (Revisão em Buchillet, 2000).

Dois bilhões de pessoas são infectadas com o agente etiológico – *Mtb*, e, mesmo mantendo o bacilo em seus corpos, apenas 10% desenvolvem ou desenvolverão a doença. Entretanto, com a epidemia da AIDS, esse número aumenta consideravelmente, sendo a infecção por *Mtb* o maior fator de risco de mortalidade em indivíduos co-infectados com HIV (vírus da imunodeficiência humana). Somado a esse cenário, aproximadamente 50 milhões de pessoas são infectadas com cepas de *Mtb* resistentes a múltiplas drogas (MDR). Este conjunto de fatores levou a OMS, em 1995, a declarar a TB como uma emergência sanitária mundial (OMS, 2006).

A TB é uma doença muito antiga. Sinais da mesma foram encontrados, através de identificação por métodos de biologia molecular que empregam seqüências conhecidas do genoma da micobactéria, em material retirado de múmias egípcias de 4.000 anos. Também

há evidências de TB óssea no homem do Neolítico (Revisão em Lapa e Silva e Boéchat, 2004). A história mostra que todas as vezes que os colonizadores portadores do bacilo aportaram em regiões geográficas nas quais os povos nativos eram virgens da infecção, vitimaram um grande número de pessoas, com quadros graves da primo-infecção. Com o decorrer dos tempos, os aborígenes mais resistentes passaram a influenciar na epidemia de TB, ocorrendo a dominância das formas clínicas crônicas; isso sucedeu na África, Ásia, Polinésia, Austrália e no continente americano (Revisão em Rosemberg, 2001). Nos Estados Unidos e Canadá, no final do século 19, os nativos – índios Apache, ao entrarem em contato com os “civilizados”, sofreram a maior dizimação pela TB que se tem notícia, atingindo o coeficiente de mortalidade de 9.000/100.000 habitantes (Ferguson, 1955).

No Brasil, durante a colonização, a TB veio com os jesuítas e colonos, que acabaram por contaminar os índios em massa. Cartas de Inácio de Loyola e de Anchieta, dirigidas ao Reino de Portugal, informavam:

“...os índios ao serem catequizados, adoecem com tosse e febre, muitos cuspiendo sangue, a maioria morrendo com deserção das aldeias” (Neves, 1984).

1.2. Características da doença

A TB atinge principalmente os pulmões (TB pulmonar), mas em 15 % dos indivíduos doentes ocorre a TB extra-pulmonar, atingindo, por exemplo, pleura, órgãos linfáticos, ossos, sistema genito-urinário, meninges, peritônio ou pele. Os principais sintomas da doença são: tosse, expectoração, febre, suores noturnos, anorexia e perda de peso, por mais de três semanas (FUNASA – Fundação Nacional de Saúde, 2002; Bottasso e cols., 2007).

Além da avaliação clínica, o diagnóstico da TB deve ser fundamentado nos seguintes métodos (FUNASA, 2002):

- Bacteriológico (exame microscópico direto do escarro e cultura para micobactérias)
- Radiológico
- Prova tuberculínica (PPD – *purified protein derivative*): método auxiliar no diagnóstico da TB.

O resultado positivo, isoladamente, indica apenas infecção pelo *Mtb* e não é suficiente para o diagnóstico da doença. No Brasil, a tuberculina utilizada é o PPD-RT23 (2 UT – unidades de tuberculina), aplicada por via intradérmica no terço médio da face anterior do antebraço esquerdo.

A leitura da prova tuberculínica é realizada 72-96 horas após a aplicação, medindo-se o maior diâmetro transverso da área de endurecimento palpável. O resultado, registrado em milímetros, classifica-se como:

- 0 a 4 mm – não reator – indivíduo não infectado pelo *Mtb* ou com hipersensibilidade reduzida.
- 5 a 9 mm – reator fraco – indivíduo vacinado com BCG ou infectado pelo *Mtb* ou por outras micobactérias.
- 10 mm ou mais – reator forte – indivíduo infectado pelo *Mtb*, que pode estar doente ou não, e indivíduos vacinados com BCG nos últimos dois anos.

Algumas circunstâncias, entretanto, podem interferir no resultado das provas tuberculínicas: portadores de doenças imunossupressoras e situações com imunodepressão transitória. Nos indivíduos infectados

pelo HIV, considera-se reator aquele que apresenta endurecimento de cinco milímetros ou mais.

- Histopatológico: método empregado principalmente na investigação das formas extra-pulmonares.

Um novo teste (ensaio de interferon-gama - IFN- γ - com amostra de sangue total) tem sido recentemente utilizado para diagnosticar a infecção latente. Entretanto, ambos os métodos – ensaio de IFN- γ e teste com PPD – não são capazes de diferenciar a infecção latente da TB ativa (Hernandez e cols., 2008).

O tratamento da TB é realizado com antibióticos e tem duração de seis meses. Normalmente é utilizada uma combinação de três ou mais drogas (rifampicina, isoniazida, pirazimanida e etambutol) (Revisão em Singh, 2006; FUNASA, 2002).

1.3. O bacilo de Koch e a vacina BCG

O bacilo causador da TB foi isolado/descoberto por Robert Koch em 1882, sendo conhecido a partir de então como “bacilo de Koch”. Muitas foram as tentativas para se obter anticorpos capazes de ativar a imunidade antituberculose. Entretanto, levou-se muito tempo para se perceber que essa imunidade não tinha uma base humoral. Após 1914, com uma tese de doutorado relacionada à “derivação dos leucócitos”, no Instituto Pasteur em Paris, demonstrou-se o papel protetor das células mononucleadas contra o *Mtb*, e os estudos subseqüentes indicaram que macrófagos e monócitos em geral exerciam a defesa contra o bacilo de Koch. A partir disso, múltiplos estudos confirmaram que a imunidade na TB é essencialmente mediada por células, e que os anticorpos constituem apenas um epifenômeno do processo imunitário (Revisão em Rosemberg, 2001).

Após os achados de Robert Koch, Albert Calmette e Camille Guérin em 1902, no Instituto Pasteur, Paris, desenvolveram a vacina, que atualmente é utilizada na prevenção da TB – vacina Bacilo Calmette-Guérin (BCG). A vacina BCG deriva de uma cepa do *Mycobacterium bovis*, que no laboratório sofreu mutações, reduzindo sua virulência e mantendo propriedades imunizantes (Revisões em Rosemberg, 2001 e Benévolo-de-Andrade e cols., 2005). No entanto, as cepas de BCG, mantidas em cultura por dezenas de anos em laboratórios de diversos países, sofreram novas mutações, variando seu poder imunizante e sensibilizante. A partir de 1960, esses inconvenientes foram reduzidos em parte, com a conservação do BCG liofilizado, reconstituindo-o de acordo com as necessidades de consumo. As variações genéticas das cepas espalhadas nos países, explicam as diferenças de mobilização do sistema celular imunitário, portanto do poder de proteção e da hipersensibilidade que cada qual desencadeia. De qualquer forma, está comprovado que o BCG é o maior indutor de imunidade mediada por células, produzindo estado imunitário protetor contra a TB por 10 a 15 anos (Rosemberg, 2001). O maior impacto da vacina BCG sobre a epidemiologia da TB se deve à redução significativa do risco das manifestações graves hematogênicas da primo-infecção, como a meningoencefalite e a granuloma (TB miliar generalizada), que ocorrem principalmente em crianças (Rook, 1982).

Na maioria das populações o recém-nascido é vacinado com BCG e freqüentemente um reforço é dado durante a infância. Apesar de a vacina ser efetiva na redução da TB infantil, ela não é muito eficiente na proteção contra TB em adultos e não previne a infecção com *Mtb* (Flynn, 2004). No Brasil, a vacina BCG é prioritariamente indicada para as crianças de zero a quatro anos de idade, sendo obrigatória para menores de um ano, segundo a Portaria nº 452, de 6/12/1976, do MS.

A aplicação da vacina é rigorosamente intradérmica, no braço direito, na altura da inserção inferior do músculo deltóide, em caso de primo-vacinação, e um a dois centímetros acima, na revacinação (FUNASA , 2002).

I.4. Patogênese

O *Mtb* é uma bactéria intracelular gram-positiva, com paredes celulares cerosas, devido à presença de ácidos micólicos. Aeróbico obrigatório, o *Mtb* tem predileção pelos tecidos dos pulmões ricos em suprimento de oxigênio e sobrevive dentro de macrófagos humanos (Casanova e Abel, 2002; Revisão em Raja, 2004).

O bacilo entra no corpo via rota respiratória, através de partículas inaladas, expelidas por um indivíduo doente, e se espalha do sítio de infecção inicial nos pulmões, pelos sistemas linfático e sangüíneo, para outras partes do corpo. A fagocitose do *Mtb* pelos macrófagos alveolares é o primeiro evento na relação patógeno-hospedeiro, que decide o resultado da infecção (Revisão em Raja, 2004). O macrófago, quando ativado, aumenta seu diâmetro e o número de vacúolos fundidos com os fagolisossomos distribuídos no citoplasma. No seu interior, o ambiente é hostil para o bacilo devido ao pH muito baixo (em torno de 4.0 a 5.0) (Rosemberg, 2001).

A infecção pelo *Mtb* pode ter três desfechos: a) controle na porta de entrada (devido à imunidade inata), b) desenvolvimento da doença após a infecção (TB primária ou pós-primária), ou c) desenvolvimento de uma infecção sub-clínica ou assintomática (tuberculose latente), com potencial para desenvolver a doença ativa subsequentemente (reativação endógena) (Revisões em Cosma e cols., 2003 e Lapa e Silva e Boéchat, 2004). De duas a seis semanas após a infecção, desenvolve-se a imunidade mediada por células, ocorrendo um influxo de linfócitos e macrófagos ativados na lesão, resultando na formação

do granuloma (Revisão em Raja, 2004). O granuloma é uma estrutura protetora que contém a infecção fisicamente, consistindo predominantemente de células T e macrófagos infectados por *Mtb*. Essa estrutura desenvolve áreas de necrose centrais, resultando na morte da maioria das bactérias e destruição do tecido circundante. Os bacilos que sobrevivem permanecem em um estado latente e podem ser reativados para desenvolver a doença ativa. A prova de que o bacilo mantém um intercâmbio com o organismo é a permanente resposta positiva à tuberculina (Grosset, 2003; Revisão em Fortin e cols., 2007).

Como mencionado anteriormente, o diagnóstico da TB latente é baseado na presença de uma reação imune, mediada por linfócitos T, à injeção intradérmica de PPD – proteínas processadas do *Mtb* (Cosma e cols., 2003). Há bastante evidência de que, nos infectados com o *Mtb*, o risco de desenvolver a doença é maior nos reatores fortes à tuberculina, e tanto maior quanto mais intensa é a reação (Rosemberg, 2001). Entretanto, a utilidade do teste de PPD na pele pode ser comprometida por sua falta de especificidade, levando a resultados falso-positivos em pessoas vacinadas com BCG ou expostas a outras micobactérias ambientais (American Thoracic Society, 2000). Além disso, resultados falso-negativos – anergia ou falta de reatividade ao PPD – também podem ocorrer. Informações mais detalhadas sobre anergia serão descritas adiante.

A TB latente parece resultar de uma combinação de eventos peculiares que facultam à sobrevivência do *Mtb* com níveis metabólicos mínimos, havendo pouca probabilidade da intervenção do processo imunitário. O desequilíbrio desses eventos, quase sempre somados à exaltação da hipersensibilidade, cria condições para o “despertar” dessa latência do bacilo (Rosemberg, 2001). A reativação da infecção latente ocorre em 5-10% das pessoas infectadas, e pode estar relacionada à imunossupressão devido à idade, corticosteróides, desnutrição, infecção com HIV, entre outros fatores (Flynn, 2004).

1.5. Mecanismos imunológicos

O sistema imunológico do hospedeiro é altamente efetivo na contenção do patógeno, mas falha em erradicá-lo (Kaufmann, 2002). A fagocitose e a subsequente secreção de algumas moléculas específicas são processos iniciados na ausência de exposição prévia ao antígeno, e formam um componente da imunidade inata. Os outros componentes seriam: a proteína do macrófago associada à resistência natural (NRAMP), os neutrófilos, os receptores “*toll-like*” (TLR) e as células “*natural killers*” (NK) (Raja, 2004). Células NK são linfócitos que produzem citocinas imunorregulatórias críticas para a morte da micobactéria (Nicod, 2007). A resposta imune inata contra o bacilo não é muito bem entendida, entretanto, é extremamente importante, porque alguns indivíduos primeiramente expostos ao *Mtb* não se tornam infectados (Ferraz e cols., 2006).

A contenção da bactéria é centrada na lesão granulomatosa, onde diferentes populações de células T participam da resposta imune. Como exemplo podem-se citar as células CD4, que reconhecem peptídeos antigênicos no contexto dos produtos gênicos codificados pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade (“*major histocompatibility complex*” – MHC) classe II, e as células CD8, que reconhecem peptídeos antigênicos no contexto do MHC classe I (Kaufmann, 2002). Portanto, células T CD4 e CD8 tornam-se componentes centrais da resposta imune adquirida, sendo as bases para o sucesso da imunidade e da vacinação. A habilidade dessas células para matar patógenos intracelulares depende de sua capacidade de atrair células infectadas bem como de secretar moléculas efetoras citolíticas e antimicrobianas (Nicod, 2007). Adicionalmente, algumas células T secretam perforina e granulosa, moléculas que matam a micobactéria dentro dos macrófagos (Kaufmann, 2002).

A produção de diferentes citocinas [proteínas ou peptídeos, que podem ter moléculas de açúcar anexadas (Revisão em Kidd, 2003)] pelas células T CD4 levou a sua classificação como células Th (*T helper*)1 ou Th2. As populações de células do tipo Th1 produzem predominantemente interleucina (IL)-2, fator de necrose tumoral (TNF)- β e interferon (IFN)- γ , e são importantes na geração de imunidade mediada por células e na hipersensibilidade do tipo “tardia” (DTH – *delayed-type hypersensitivity*), que no contexto da TB seria a reação ao PPD. As populações de células do tipo Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e outras citocinas que promovem uma resposta imune humoral (Revisão em Howard e Zwillig, 1999; Yilmaz e cols., 2000).

Após o reconhecimento de epítopos micobacterianos apresentados pelos macrófagos e outras células, as células T CD4 produzem determinadas citocinas: IFN- γ aumenta a capacidade de macrófagos para suprimir a replicação, ou possivelmente matar organismos residentes no fagossomo; IL-2 promove a proliferação de linfócitos ativados. Estudos com macrófagos humanos também demonstraram que IFN- γ estimula a produção do fator de necrose tumoral (TNF) e 1,25 dihidroxicolecalciferol (vitamina D₃) os quais facilitam a inibição micobacteriana provavelmente devido à geração de intermediários de oxigênio e nitrogênio reativos, bem como o controle dos níveis de ferro intracelulares (Botasso e cols., 2007). Portanto, IFN- γ é uma molécula central para a ativação do macrófago, atuando juntamente com o TNF- α . (Kaufmann, 2002). Além disso, deve ser considerado o papel das citocinas do tipo Th2, tanto na produção de anticorpos quanto na sub-regulação das atividades Th1 (Botasso e cols., 2007). A IL-10, por exemplo, considerada uma citocina antiinflamatória, produzida pelos macrófagos e células T durante a infecção por *Mtb*, possui propriedades de desativação do macrófago, incluindo diminuição da produção de IL-12, que por sua vez diminui a produção de IFN- γ pelas células T (Revisão em Raja, 2004).

Estudos de pacientes com suscetibilidade familiar ao *Mtb* mostraram que uma resposta imune do tipo Th1 é essencial para a proteção contra esse patógeno. Mutações que afetam os receptores de IFN- γ , a produção de IL-12 ou os receptores de IL-12 (todos mediados por Th1) também aumentam a suscetibilidade ao *Mtb*; em casos onde IFN- γ não pode ser produzido ou não pode responder a algum estímulo, a doença é severa e freqüentemente fatal (Revisão em Kidd, 2003). Além disso, em um estudo realizado por Lienhardt e cols. (2002), os níveis séricos de marcadores Th2 foram mais altos em pacientes infectados com *Mtb* do que em controles. Esses resultados são sugestivos que indivíduos com uma fraca atividade Th1 e/ou uma atividade Th2 mais forte teriam maior risco de infecção (Kidd, 2003).

1.6. Bases genéticas

A variabilidade inter-individual em relação aos resultados clínicos da TB, é resultado também da variabilidade nos genes humanos que controlam as defesas do hospedeiro – o homem (Revisão em Casanova e Abel, 2002). Muitos estudos mostram evidências que a suscetibilidade/resistência à TB é poligênica, incluindo uma maior concordância da doença em gêmeos monozigóticos comparados aos dizigóticos, maior suscetibilidade em populações endocruzadas e a identificação de genes com uma pequena contribuição a essa suscetibilidade, que varia entre as diferentes populações (Revisão em Hill, 2001; Kaufmann e cols., 2005). Fatores genéticos do hospedeiro determinam, em parte, a suscetibilidade à micobactéria, e muitos estudos vêm sendo realizados, a fim de identificar genes específicos que poderiam afetar a suscetibilidade à TB (Bellamy, 2003; Revisão em Newport e Nejentsev, 2004; Bellamy, 2006).

Polimorfismos em genes de citocinas, por exemplo, são conhecidos por influenciar os níveis de citocinas e por sua associação com o resultado das infecções (Selvaraj e cols., 2008). Indivíduos com defeitos mendelianos no gene que codifica a subunidade p40 da IL-12, ou no gene *IL12RB1* (que codifica a cadeia $\beta 1$ do receptor de IL-12) são mais propensos à infecção por *Mtb*. IL-12 é um importante indutor de IFN- γ , citocina chave para regulação das defesas antimicrobianas. Camundongos deficientes em IFN- γ e infectados com *Mtb* morrem rapidamente de doença disseminada. Além disso, raros indivíduos com mutações nos genes que codificam os receptores 1 e 2 de IFN- γ (*IFNGR1* e *IFNGR2*, respectivamente) podem ter uma infecção disseminada fatal por BCG ou micobactérias não-tuberculosas durante a infância (Ferraz e cols., 2006).

Os genes do MHC, principalmente os de classe II, mostraram as associações mais consistentes com TB em diferentes populações, mas é o *SLC11A1* (“*solute carrier family 11 member*”), conhecido como *NRAMP1* (proteína do macrófago associada com resistência natural), o gene melhor caracterizado (Revisão em Newport e Nejentsev, 2004). Em africanos observou-se uma fraca evidência de ligação entre polimorfismos de *NRAMP1* e TB (Bellamy e cols., 2000); em um estudo do tipo caso-controle realizado em Gâmbia (oeste da África), genótipos de *NRAMP1* foram associados com TB (Bellamy e cols., 1998). A associação entre TB e polimorfismos nesse gene foi confirmada em pacientes do Japão, Coreia e Guiné, mas apesar desses estudos, sabe-se que o *NRAMP1* representa apenas uma pequena proporção do componente genético total da suscetibilidade à TB (Bellamy, 2006).

Outro gene bastante estudado é o *IFNG*. Investigações realizadas em populações europeias e africanas indicaram a associação de um polimorfismo na região não-codificante do gene com o risco de desenvolvimento de TB. Um pequeno estudo realizado com uma população italiana (Sicília) (Lio e cols., 2002), replicado por dois estudos

subseqüentes (López-Maderuelo e cols., 2003; Rossouw e cols., 2003), mostrou que o polimorfismo +874 A>T estaria envolvido com o resultado da doença. Esse polimorfismo altera o sítio de ligação para o fator de transcrição NFκB, alterando a expressão do gene, e como resultado, influencia a resposta inflamatória (Cooke e Siddiqui, 2004).

Essas investigações incentivaram a pesquisa de genes candidatos e a busca por polimorfismos que poderiam estar influenciando a suscetibilidade à TB ou à infecção por *Mtb*. A Tabela 1 descreve alguns desses genes e, mais especificamente, descreve os polimorfismos estudados nesta tese de doutorado. Em relação aos estudos compilados na referida tabela, vê-se que quase todos os polimorfismos já investigados mostram associações positivas e negativas com TB, ou mesmo com algum fenótipo relacionado. Os genes *IFNG* e *IL10* foram os mais estudados, com as associações à TB mais consistentes. *NRAMP1*, já mencionado anteriormente, *VDR* e *IL12RB1* já foram alvo de muitos estudos e indicam fortes associações com TB. Um estudo com o gene *VDR*, em índios Aché e Avá do Paraguai, foi realizado recentemente. Os pesquisadores observaram uma associação significativa entre um polimorfismo no gene e proteção contra a infecção por *Mtb*, verificada através da reação ao PPD. (Wilbur e cols., 2007). Há um pequeno número de estudos de associação com o gene *IFNGR1* e fenótipos relativos à TB. Os resultados obtidos (associações positivas e negativas), as raras mutações identificadas em indivíduos com doenças mendelianas, bem como a sua importância como receptor de uma citocina diretamente ligada à resposta imune durante a infecção por *Mtb* e a TB propriamente dita, fazem do gene *IFNGR1* um candidato promissor em estudos de associação com fenótipos da TB. Outros genes citados na Tabela 1 (*SP110*, *P2X7*, *PTPN22*, *IL1B*, *TNFR1*, *IL2*, *IL6*) também têm um número menor de estudos realizados, com resultados algumas vezes em direções opostas, e as publicações relacionadas aos mesmos são mais recentes. Isso sugere que investigações genéticas mais abrangentes, em diferentes populações, seriam

importantes para uma maior compreensão do envolvimento desses genes com a etiologia da TB. Além disso, alguns desses genes também já foram relacionados à artrite reumatóide, uma complexa doença auto-imune. Salienta-se aqui o estudo de Moreno e cols. (2007), em que polimorfismos nos genes que codificam a IL-4, importante citocina do tipo Th2, e seu receptor, estariam associados com essa doença. Devido aos intrincados e interligados mecanismos imunes envolvidos com as doenças infecciosas e inflamatórias, esses genes também seriam bons candidatos para os estudos relacionados à TB.

Muitos dos polimorfismos em genes candidatos, que são associados com suscetibilidade à doença, alteram a função molecular e celular do gene, ou através de efeitos no nível da expressão gênica ou na alteração direta da função da proteína. Para muitos genes, há evidências que variantes alélicas são associadas com expressão alterada no mRNA ou ao nível protéico (*IFNG*, *IL1B*, *IL12RB1*, *IL10* e *TNFA*). Entretanto, para a maioria dos genes, os efeitos são modestos, inconsistentes ou não são replicados em múltiplos estudos (Berrington e Hawn, 2007).

Tabela 1. Genes relacionados à TB ou resposta imune.

Gene	Localização cromossômica	Polimorfismos	dbSNP ID	Estudos de associação
<i>SLC11A1</i> (<i>NRAMP1</i>)	2q35	INT4 (496 + 14 G>C)	rs3731865	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ausência de associação com o status da doença em duas amostras de indivíduos não relacionados de Hong Kong e nativos canadenses (Liu e cols., 1995). 2. Ausência de associação com suscetibilidade ou resistência à TB em Cambodianos (Delgado e cols., 2002a). 3. Ausência de associação com suscetibilidade à TB ou características clínicas da doença em uma população japonesa (Abe e cols., 2003). 4. Desequilíbrio de ligação entre INT4 e dois polimorfismos também da região 5' do gene. Associação com TB pediátrica em um estudo baseado em famílias de Houston (EUA) (Malik e cols., 2005). 5. Associação com duas formas severas de TB pulmonar em chineses (Zhang e cols., 2005).

<i>VDR</i>	12q13.11	<i>FokI</i> A>G	rs10735810	<ol style="list-style-type: none"> 1. Associação com a extensão da TB pulmonar em asiáticos Gurajati de Londres (Wilkinson e cols., 2000). 2. Associação do haplótipo (<i>FokI-ApaI</i>) com TB em estudo baseado em famílias de Gâmbia, Guiné e Guiné-Bissau (Bornman e cols., 2004). 3. Ausência de associação com TB em uma amostra do Peru; associação com resposta ao tratamento da TB pulmonar (Roth e cols., 2004). 4. Associação com proteção contra a infecção por <i>Mtb</i> em nativos do Paraguai – Aché (Wilbur e cols., 2007).
<i>SP110</i>	2q37.1	éxon 11 C>T íntron 6 C>T	rs3948464 rs2114592	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ausência de associação entre rs3948464 e TB pulmonar na população de Gana (oeste da África) (Thye e cols., 2006). 2. Variantes associadas com suscetibilidade à TB em Gâmbia, Guiné (associação somente com rs2114592) e Guiné-Bissau (Tosh e cols., 2006). 3. Ausência de associação das variantes com TB na população da África do Sul (Babb e cols., 2007).

<i>P2X7</i>	12q24	1513 A>C	rs3751143	1. Ausência de associação com TB na população de Gâmbia (Li e cols., 2002). 2. Associação com redução da capacidade de macrófagos na morte de <i>Mtb</i> e com TB extra-pulmonar em uma população do sudeste asiático (Fernando e cols., 2007).
<i>PTPN22</i>	1p13.3-p13.1	1858 C>T	rs2476601	1. Alelo T associado com proteção contra o desenvolvimento de TB, desde que o sistema imune reconheça o <i>Mtb</i> (indivíduos reativos ao PPD), e alelo C associado com risco de desenvolver TB (Gomez e cols., 2005).
<i>IL1B</i>	2q14	íntron 2 C>T	rs1143629	1. Diferenças significativas nas frequências alélicas entre pacientes com TB e controles saudáveis em japoneses (Kusuhara e cols., 2007).
<i>IL12RBI</i>	19p13.1	641 A>G 1094 T>C	rs11575934 rs375947	1. Haplótipo contendo os alelos 641G-1094C em homozigose associado com TB na população japonesa (Akahoshi e cols., 2003). 2. Ausência de associação entre os polimorfismos e TB pulmonar em uma população do Marrocos (Remus e cols., 2004).

3. Variantes associadas com o desenvolvimento de TB e com progressão da doença em japoneses (Kusuhara e cols., 2007).

4. Polimorfismo 641 A>G não associado com TB na população da Indonésia (Sahiratmadja e cols., 2007).

IFNGRI 6q23.3 -611 G>A rs1327474 1. Ausência de associação das variantes com TB em uma população da

-56 T>C rs2234711 Croácia (Bulat-Kardum e cols., 2006).

2. As frequências alélicas para as duas variantes não diferem entre pacientes com TB e controles saudáveis em japoneses (Kusuhara e cols., 2007).

3. Variante rs2234711 associada com TB em uma população de Uganda; rs1327474 não associada com TB (Stein e cols., 2007).

TNFR1 12p13.2 íntron 1 A>G rs4149622 1. Associação com TB em uma população de Uganda (Stein e cols., 2007).

IFNG 12q14 +874 A>T rs2430561 1. Alelo A associado com suscetibilidade à TB em uma população espanhola; homozigotos para esse alelo associados com estágio

avanzado da doença e com risco maior de desenvolver TB (López-Maderuelo e cols., 2003).

2. Associação entre genótipos e alelos com TB em sul-africanos; associação do alelo T com proteção contra a doença (Rossouw e cols., 2003).
3. Associação entre os genótipos e TB em uma população da Croácia (Bulat-Kardum e cols., 2006).
4. Frequência de homozigotos T/T menor em pacientes com TB e microscopia positiva (Etokebe e cols., 2006).
5. Alelo T associado com TB pleural em uma população da Colômbia (Henao e cols., 2006).
6. Ausência de associação funcional do polimorfismo com TB em uma população do sul da Índia (Vidyarani e cols., 2006).
7. Associação entre a presença do alelo A e o desenvolvimento de TB ativa em brasileiros (Amim e cols., 2007).

8. Ausência de associação com TB em uma população do sul da Índia (Selvaraj e cols., 2008).

IL2 4q26-q27 -330 T>G rs2069762 1. Associação entre homozigotos T/T e proteção contra TB pulmonar em uma população do sul da Índia (Selvaraj e cols., 2008).

IL10 1q31-q32 -592 A>C rs1800872 1. Ausência de associação das variantes com TB em uma população de Gâmbia (Bellamy e cols., 1998).

2. Associação entre heterozigotos (rs1800896) e TB em Cambodianos (Delgado e cols., 2002a).

3. Redução de portadores do alelo A (rs1800896) em italianos com TB pulmonar crônica (Scola e cols., 2003).

4. Ausência de associação da variante rs1800896 com TB em uma população espanhola (López-Maderuelo e cols., 2003).

5. Associação entre rs1800872 e risco diminuído de manifestação de TB e uma população coreana; ausência de associação para rs1800896 (Shin e cols., 2005).

6. Associação do genótipo A/A (rs1800896) com TB pleural em uma população da Colômbia; variante rs1800872 não associada à TB (Henao e cols., 2006).
7. Ausência de associação entre rs1800896 e TB em uma população do sul da Índia (Prabhu Anand e cols., 2007).
8. Ausência de associação da variante rs1800872 com TB em uma população de Uganda (Stein e cols., 2007).
9. Associação entre o alelo G (rs1800896) e TB (Ates e cols., 2008).
10. Ausência de associação entre rs1800896 e TB em uma população do sul da Índia (Selvaraj e cols., 2008).

IL6 7p21 -174 G>C rs1800795 1. Ausência de associação com TB em uma população da Colômbia (Henao e cols., 2006).

2. Ausência de associação com TB em uma população do sul da Índia (Selvaraj e cols., 2008).

IL4 5q31.1 -590 T>C rs2243250 1. Associação com suscetibilidade à TB em uma população do sul da

Índia; genótipo C/C associado com proteção contra TB (Vidvarani e cols., 2006).

2. Genótipo T/T mais freqüente em pacientes colombianos com artrite reumatóide do que em controles saudáveis (Moreno e cols., 2007).

IL4R 16p12.1-p11.2 1902 A>G rs1801275 1. Alelo G mais freqüente em pacientes colombianos com artrite reumatóide (Moreno e cols., 2007).

I.7. Anergia

A anergia, no contexto da TB, refere-se à ausência de reatividade à injeção intradérmica com tuberculina ou PPD em indivíduos infectados com *Mtb*. Isso ocorre em aproximadamente 15% dos pacientes com doença pulmonar ativa e é associado com ausência da formação do granuloma e outras manifestações de hipersensibilidade celular. Imunologicamente, anergia é definida como a inabilidade das células T específicas em produzir IL-2. A indução desse fenótipo é um processo de sinalização ativa induzido quando o receptor de célula T é ligado a um antígeno sem co-estimulação (Revisão em Boussiotis e cols., 2000). Conseqüentemente a anergia à tuberculina pode estar refletindo uma inapropriada resposta imune ao patógeno intracelular (Balikó e cols., 1998).

A imunossupressão ativa, particularmente na doença severa, o que é evidenciado pela diminuição de IL-2 e INF- γ juntamente com a anergia ao PPD (Delgado e cols., 2002b; Goldfeld, 2004), é correlacionada com a expansão de células T produtoras de IL-10 (Goldfeld, 2004). No estudo realizado por Balikó e cols. (1998), o objetivo foi investigar a relação entre o padrão de produção de citocinas e a anergia à tuberculina em pacientes com infecção ativa por *Mtb*. Os resultados mostraram uma alta porcentagem de linfócitos expressando IL-4 e IL-10 e mais baixa porcentagem expressando IL-12 em amostras de sangue periférico de pacientes anérgicos, comparados aqueles pacientes com reatividade à tuberculina ou indivíduos saudáveis. IL-4 e IL-10 são conhecidos inibidores de uma resposta de DTH em camundongos, ou seja, estariam envolvidos com anergia. Concentrações mais baixas de INF- γ também foram observadas em pacientes com TB anérgicos, sugerindo uma prevalência do padrão Th2 na resposta imune (Montiel e cols., 2002). Com base nesses estudos, a pesquisa por genes que possam influenciar a produção

dessas citocinas é muito importantes para o entendimento dos mecanismos genéticos envolvidos com a falta de reação ao PPD. Entretanto, estudos nessa área são escassos.

Adicionalmente, a anergia ao PPD pode ser ocasionada por algumas condições específicas, a saber: desnutrição, imunossupressão por doenças, como sarampo, caxumba, varicela e influenza, ou drogas (Yilmaz e cols., 2000).

1.8. Grupos indígenas brasileiros

O conhecimento sobre os muitos aspectos da biologia e epidemiologia dos povos indígenas da Amazônia brasileira tem-se acumulado desde os anos 60 do século XX. As pesquisas têm sido mais intensas nas áreas da genética de populações, epidemiologia e medicina tropical. James V. Neel e Francisco M. Salzano iniciaram os estudos relacionados à genética de populações, enquanto Francis L. Black e Roberto G. Baruzzi realizaram pesquisas na área da epidemiologia das doenças infecciosas e parasitárias (Coimbra e cols., 2002).

O impacto da TB sobre as populações indígenas brasileiras tem sido de grande magnitude, devido ao histórico declínio populacional ocasionado por ela e à sua permanência como importante causa de morbi-mortalidade. Além disso, os bancos de dados nacionais são insuficientes para permitir um estudo abrangente da situação epidemiológica da tuberculose entre as populações indígenas (Basta e cols., 2006). Em um trabalho realizado por Escobar e cols. (2001), viu-se que o risco de contrair tuberculose e morrer devido à doença nessas populações é dez vezes maior que na população brasileira como um todo.

Alguns exemplos de grupos indígenas estudados no Brasil em relação à endemia de TB mostram a magnitude da doença. Os Suruí, no Estado de Rondônia, estão entre os

cinco grupos indígenas do país em termos da incidência de TB: entre 1991 e 2002, a incidência média de TB foi de 2.518,9 por 100.000 habitantes, com aproximadamente metade dos casos diagnosticados em crianças com menos de 15 anos de idade (Basta e cols., 2004). Esses dados contrastam com a incidência para o Estado de Rondônia em 1999 – 43/100.000 (Ruffino-Neto, 2002), e para o Brasil, em 2001 – 47/100.000 (MS, Brasil).

Em relação à reatividade ao PPD, ou à reatividade à tuberculina, indígenas da Amazônia mostram uma reatividade baixa comparada a outras populações (Revisão em Coimbra e Basta, 2007). Em índios Pakaanóva a proporção de não-reatores é de 58% (Escobar e cols., 2004); proporção similar a observada em índios Yanomami por Sousa e cols. (1997).

Sugere-se que mecanismos imunológicos ainda não esclarecidos, que diminuem a resposta imune celular contra o *Mtb*, poderiam ser os responsáveis pela baixa reatividade ao PPD observada na Amazônia, apesar da alta cobertura de vacinação com BCG e das altas taxas de incidência de TB (Sousa e cols., 1997; Gonzáles e cols., 2003; Hurtado e cols., 2003; van Crevel e cols., 2004).

1.8.1. Os índios Xavante

A população Xavante (cerca de 10.000 pessoas) se distribui em cerca de 70 aldeias, de vários tamanhos, localizadas em sete reservas federais (Terras Indígenas) – Pimentel Barbosa, Areões, São Marcos, Sangradouro, *Parabubure*, Marechal Rondon e *Marãiwasede* – no estado de Mato Grosso, na região compreendida pela Serra do Roncador e pelos vales dos rios das Mortes, Kuluene, Couto de Magalhães, Batovi e Garças. (Coimbra e cols., 2002; Instituto Socioambiental – ISA). Em relação ao grupo lingüístico, os Xavante pertencem ao Macro-Jê (Rodrigues, 1986; Greenberg, 1987).

A reserva Pimentel Barbosa está localizada no nordeste do Mato Grosso, com uma área total de 328.996 hectares. Até o ano de 2002, a reserva possuía cinco aldeias: *Etéñitépa*, Tanguro, Caçula, Água Branca e *Pe'azarupré* (Coimbra e cols., 2002).

Dados epidemiológicos da década de 60 do século XX indicam que, naquela época, doenças endêmicas entre as populações rurais do Mato Grosso (TB, leishmaniose e hanseníase), não foram encontradas entre os Xavante. Entretanto, diversos casos de diarreia e infecções parasitárias foram diagnosticados. Nas décadas seguintes, as condições sanitárias na maioria das aldeias Xavante foram afetadas pelas limitadas fontes de água potável. A precária infra-estrutura sanitária certamente contribuiu para o crescimento das taxas de doenças infecciosas e parasitárias. Dados coletados na Casa do Índio de Nova Xavantina (uma das cidades relativamente próxima à *Etéñitépa*) revelam que essas doenças foram as razões mais frequentes de consulta médica (aproximadamente 70%) entre 1994-1995.

Em relação à TB, Neel e cols. (1968) não diagnosticaram casos da doença entre os Xavante, e encontraram somente um indivíduo com resposta positiva à tuberculina. Cabe salientar que nessa época, a cobertura pela vacina BCG em Xavante era nula. A doença se espalhou através da maioria das aldeias entre os anos 60 e metade dos anos 70, quando alcançou proporções epidêmicas. Infelizmente, há poucos dados epidemiológicos sobre TB em Xavante para esse período. (Coimbra e cols., 2002). Atualmente, a doença permanece nas reservas Xavante como uma importante endemia, sendo uma das maiores causas de morbidade e mortalidade. O Distrito de Saúde Pública Xavante é listado como tendo uma das mais altas taxas de incidência de TB entre os povos indígenas brasileiros – aproximadamente 300/100.000 (Amarante e Costa, 2000; Garnelo e cols., 2003). No banco de dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) foram encontrados registros de 37 indivíduos de *Etéñitépa* com tratamento prévio para TB no

período de 1999 a 2004. A média de incidência para esse período foi de 1.289,6 por 100.000 habitantes (Basta e cols., 2009, submetido para publicação).

CAPÍTULO II
JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Aproximadamente 220 grupos indígenas existem no Brasil (totalizando em torno de 450.000 indígenas) e 60% desses vivem na Amazônia. Alguns grupos ainda permanecem relativamente isolados, mas um número significativo vive em áreas urbanas. Apesar da escassez de dados epidemiológicos detalhados sobre as populações indígenas brasileiras, não restam dúvidas sobre a sua precária situação de saúde e o alto risco de contrair TB e morrer devido a ela (Coimbra e Basta, 2007). A deterioração das condições de vida dos índios em decorrência do contato com os “homens brancos”, os problemas de acessibilidade (geográfica, econômica, lingüístico-cultural, entre outros) aos serviços de saúde, bem como os tratamentos mal conduzidos ou mal seguidos, favorecem a manutenção da endemia de tuberculose entre os índios (Buchillet, 2000).

Com o avanço dos conhecimentos sobre os complicados meandros do mecanismo imunitário da tuberculose, melhor serão compreendidas as condições que facultam ao *Mtb* conviver com o hospedeiro por decênios sem morrer, mas sem conseguir multiplicar-se e sem provocar lesões, estabelecendo-se um estado de simbiose (Rosemberg, 2001), ou tuberculose latente.

A contribuição relativa de genes envolvidos depende de “*backgrounds*” genéticos específicos das populações e do estágio de infecção ou doença. Com base nisso, a identificação de genes humanos importantes, bem como de seus alelos associados à suscetibilidade à doença, os quais influenciam a patogênese e a resistência à mesma, fornecerão respostas para se desvendar os mecanismos envolvidos na proteção contra TB.

Pesquisas relacionadas à identificação da suscetibilidade genética à tuberculose em povos indígenas são ainda inexistentes no Brasil. Diante da magnitude da doença, enquanto problema de saúde pública, necessita-se abordar a questão sob os mais diversos ângulos.

Portanto, a pesquisa realizada, poderá trazer novos conhecimentos específicos sobre as populações indígenas, com o potencial de se estabelecer melhores estratégias de prevenção e tratamento.

Este trabalho tem como objetivos específicos:

1) Determinar as frequências das variantes dos genes envolvidos com a resposta imune já identificados com suscetibilidade/resistência à tuberculose em uma população da etnia Xavante.

2) Avaliar se ocorrem diferenças nas frequências gênicas e genótípicas desses genes entre os indivíduos anérgicos e aqueles que mostram algum tipo de reação ao PPD. Além disso, avaliar se essas diferenças ocorrem naqueles indivíduos que já contraíram tuberculose clínica e pessoas saudáveis dentro de uma mesma aldeia.

CAPÍTULO III

IMMUNE RESPONSE GENES ARE ASSOCIATED WITH TUBERCULIN ANERGY IN A NATIVE BRAZILIAN POPULATION.

HUMAN MOLECULAR GENETICS (em preparação)

**IMMUNE RESPONSE GENES ARE ASSOCIATED WITH
TUBERCULIN ANERGY IN A NATIVE BRAZILIAN POPULATION.**

Verônica M. Zembrzusi¹, Paulo C. Basta², Sidia M. Callegari-Jacques^{1,3}, Ricardo V. Santos², Carlos E. A. Coimbra Jr², Francisco M. Salzano¹ and Mara H. Hutz^{1*}

¹Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. ²Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ³Departamento de Estatística, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

*To whom correspondence should be addressed:

Prof. Mara H. Hutz
Departamento de Genética
Instituto de Biociências, UFRGS
Caixa Postal 15053
91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil
Phone: 55 51 3308-6720
Fax: 55 51 3343-5850
E-mail: mara.hutz@ufrgs.br

ABSTRACT

Among indigenous peoples from Brazil, tuberculosis (TB) was a major cause of population decline and remains a leading cause of morbidity and mortality among them. Despite high BCG coverage, results of Tuberculin Skin Test (TST) reactivity, that assessed infection by *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), have shown high rates of anergy, usually over 60%, in Amazonian Indians. Given the high prevalence of anergy in this group and that genetic host factors play an important role in controlling susceptibility to *Mtb*, the aim of this study was to evaluate the association of nineteen polymorphisms in fifteen genes related to immune response and anergy in the Xavante, a indigenous group from Central Brazil. A total of 486 individuals were investigated. TST anergy was observed in 68,7% of them. Polymorphisms in four genes showed absence or very low variability: *SP110*, *PTPN22*, *IL12RB1* and *IL6*. Reactivity to TST was associated with *IFNG* +874 A>T and *IL4* -590 C>T polymorphisms. The *IFNG* +874 A/T heterozygous genotype and *IL-4* -590 C/C homozygous genotype were more frequent in those individuals who presented a positive TST (1.9; CI: 1.1-3.1 and 2.0; CI: 1.2-3.3, respectively). *IL10* -1082 A>G was associated with a higher prevalence of anergy. The risk of anergy was 1.5 (CI: 1.2-1.7) in G/G homozygous individuals when compared with carriers for the A allele. Results obtained indicate that polymorphisms in genes of Th2 immune profile – IL-4 and IL-10 – would be involved with TST reactivity in the Xavante population. Moreover, unique environmental and natural selective factors have resulted in the development of ethnic-specific host genetic factors.

INTRODUCTION

According to the World Health Organization (WHO), tuberculosis (TB) remains the single largest infectious disease causing high mortality in humans, leading to 3 million deaths annually. The estimate is that about one third of the world's populations are currently infected with *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), and approximately 8-10 million people have been infected with this pathogen every year. The scenario of TB in Brazil is also alarming. Incidence rate estimative was 60 per 100,000 in 2004, and Brazil ranks as the 16th most affected country in the world (1). Moreover, TB incidence rates may be higher than 70 cases per 100,000 in some municipalities of the Amazon region (2).

Although TB is a significant health problem for most of the world's populations, some of them have been specially affected. Prevalence rates among indigenous groups are typically higher than among their non-indigenous neighbors. This is the case of Native South Americans that experience high rates of TB. Among indigenous peoples from Brazil, historically tuberculosis was a major cause of population decline and remains a leading cause of morbidity and mortality among them. Recent studies indicated that incidence rates among Amazonian indigenous peoples may be as much as ten times higher than those of general Brazilian population (2-7).

Differential prevalence rates are caused by different factors. The ability to develop adequate immunity to intracellular bacterial pathogens is unequally distributed among humans. In the case of tuberculosis, infection with *Mtb* results in disease in 5-10% of exposed individuals, whereas the remainders control infection effectively (8) that is known as latent infection. The majority of individuals infected with *Mtb* develops a delayed-type hypersensitivity (DHT) response in two to four weeks after infection, which is manifested as a positive response (skin induration) to intradermal injection with purified protein derivative (PPD) from *Mtb*. PPD or tuberculin skin testing (TST) is used not only to

identify persons infected with *Mtb*, but also to assess cell-mediated immune response to *Mtb* and to guide decisions about chemoprophylaxis and treatment (9). However, its utility is compromised by the lack of specificity, which leads to false-positive results in people who are BCG-vaccinated or exposed environmentally to other mycobacteria (10). The lack of skin induration to intradermal injection of PPD, defined as anergy, is observed in many individuals. Immunologically, anergy involves an as the inability of T cells to produce interleukin-2 (IL-2) (11), which occurs together with a decreased production of interferon- γ (IFN- γ), particularly in severe disease (9, 12). Anergy has also been correlated with the expansion of IL-10-producing T cells (12). The interpretation of TST results is affected by the immune status of the individual tested, because conditions that interfere with generalized cell-mediated DHT responses, including HIV infection, chemotherapy, steroid use, and cancer, also interfere with reaction to PPD (9).

Studies which investigated the characteristics of TST reactivity in Amazonian Indians, have reported high rates of anergy, usually over 60%, even when relatively high BCG coverage is observed (7, 13-15). It was suggested that recurrent low reactivity to TST observed in Amazonian Indians, despite high BCG coverage and incidence rates of disease, may be due to an-yet unclear immunological mechanisms that may cause diminished cell-mediated immune response against *Mtb* (7, 15). Cytokines are important modulatory molecules in immune responses against microorganisms and they also have an important role in the setting of disorders that affect the immune system, mainly those produced by populations of Th1 (T helper 1) or Th2 cells. The balance between populations of Th1 and Th2 cells affects cytokines expression and the physiological and pathological processes as well (16). A Th1 cell preferentially produces cytokines as IFN- γ , TNF- α (tumor necrosis factor- α), IL-12 and IL-2. Th2 cells drive humoral immunity, up-regulating antibody production and producing IL-4 and IL-10 cytokines (17). Response against *Mtb* is

preferentially Th1-like, reflected by the production of high titers of IFN- γ and TNF- α with low or undetectable levels of IL-4 (18). IL-12 also leads the development of Th1 responses by enhancing IFN- γ and antagonizing IL-4 and IL-10, thereby down-regulating Th2 responses (19). IL-4 and IL-10 are known to inhibit significantly the development of DTH responses in mice (20); IL-10 also inhibits Th1 activity through macrophage deactivation and the blocking of IFN- γ release by Th1 lymphocytes (21).

In relation to infection by *Mtb*, the outcome is influenced by many factors, such as nutritional status, co-infections, exposure to environmental microbes, and previous vaccinations. However, it is clear that genetic host factors also play an important role in controlling disease susceptibility to intracellular pathogens (8). Human immune response genes are more diverse than any other gene group, suggesting that infectious diseases are an important driving force in human evolution (22). Candidate genes studies have implicated several immunogenetic polymorphisms in human infectious diseases, and their identification may provide insights into protective and pathogenic mechanisms. These candidate genes have been identified in several ways. Most are suggested by studies of immune mechanisms of infectious diseases, such as MHC genes and an increasing number of cytokine and chemokine genes (23). Polymorphisms in genes of immune response are known to influence cytokine levels and may be associated with infection outcome (24).

Several studies have been carried out to associate immune response genes with susceptibility to infection by *Mtb* or TB disease (22, 25-27), nevertheless there are few studies in genes related to DTH, specifically to anergic response to PPD. Given the high prevalence of anergy to PPD in Amerindians (7, 15), this ethnic group offers a unique opportunity to detect genes potentially involved with anergic response to PPD. Thus, in this study we evaluated the association of nineteen single nucleotide polymorphisms

(SNPs) in fifteen genes related to immune response, and anergy to PPD in the Xavante, a Brazilian indigenous group.

RESULTS

The investigated sample consisted of 486 individuals among them 225 were men (46%). Age varied from three months to 91.7 years, with an average of 18.9 ± 18.9 years. Individuals were divided in subgroups according to PPD status: 68.7% of the investigated subjects presented anergy (no induration), while 25.5% had an induration ≥ 5 mm and 16.3% ≥ 10 mm (P.C. Basta, C.E. Coimbra, J.R. Welch, L.C. Alves, R.V. Santos and L.A. Camacho, manuscript in preparation).

Allele frequencies for the polymorphisms investigated in the present study, together with the frequencies reported for Europeans, Africans and Asians are shown in Table 1. Differences in the total number of individuals for each variant were due to genotyping problems. Among the 19 polymorphisms screened, six showed absence or very low variability (minor allele frequency ≤ 0.01) – rs3948464, rs2114592, rs2476601, rs11575934, rs375947 and rs1800795 – in the Xavante besides being polymorphic in other major ethnic groups.

Association tests of genotype frequencies between anergic vs. non-anergic subjects are shown in Table 2. For all markers with a χ^2 *P*-value lower than 0.25, prevalence ratios (PR) were estimated after adjustment for age. Reactivity to PPD was associated with *IFNG* +874 A>T – rs2430561 –, and *IL4* -590 C>T – rs2243250 – polymorphisms. The *IFNG* +874 A/T heterozygous genotype and *IL-4* -590 C/C homozygous genotype were more frequent in those individuals who presented a PPD reaction (Table 3). Adjusted PRs for *IFNG* +874 T/A and *IL4* -590 C/C genotypes were about two times more prevalent in those subjects with a PPD positive reaction (1.9; CI: 1.1-3.1 and 2.0; CI: 1.2-3.3, respectively).

Whereas *IL10* -1082 A>G – rs1800896 – SNP was associated with a higher prevalence of anergy (Table 4). The risk of anergy was 1.5 (CI: 1.2-1.7) in G/G homozygous individuals when compared with carriers for the A allele.

DISCUSSION

In the 60's, Neel and colleagues studied the same Indian group studied in this work. Many of those people still live at *Etéñitépa* village. At that time, vaccination coverage by BCG was null, and just one person tested for PPD showed reactivity (28). Almost five decades after the first visits were performed in the Xavante Reservation, the response to PPD profile has not changed so much, although there is almost total BCG vaccination coverage and several TB cases diagnosed in the village. In our study, while almost 70% of individuals did not show any response to PPD, 16.3% of the sample had a size of induration greater than 10 mm that is considered infected by *Mtb* (P.C. Basta, C.E. Coimbra, Jr. Welch, L.C. Alves, R.V. Santos and L.A. Camacho, manuscript in preparation). Therefore, the aim of this study was to find susceptibility genes that could explain the high rates of anergy to PPD in tuberculin skin tests, in the Xavante population from Central Brazil. This is the first study about susceptibility genes related to TB in a native Brazilian population.

Allele frequencies observed in the Xavante population were different from those reported in other major ethnic groups (Table 1). *SP110*, *PTPN22*, *IL12RB1* and *IL6* SNPs investigated were not polymorphic in the Xavante population. Considering that no information for other Amerindian samples has been reported for these polymorphisms, it is difficult to infer whether these variants were lost due to microevolutionary processes or if these polymorphisms were not present in the founder group. The genetic structure of present-day Native American populations results from an intricate set of interacting factors

which include different demographic changes, group fissions and fusions, intergroup contacts, and different mating systems. Therefore, to explain specific differences, genetic parameters should be examined in conjunction with ethnohistoric factors. The reduction of genetic variability in these genes could be explained through a founder effect, high inbreeding and isolation. On the other hand we cannot exclude that these differences might be due to a restricted immune system shaped by natural selection in the Xavante and other native Brazilian groups. Clearly more native Brazilian populations should be investigated to disclose the full spectrum of variation of these immune response genes in Amerindians.

Three genes showed association with response to PPD: *IFNG*, *IL10* and *IL4*. IFN- γ is a key Th1 cytokine in the immune response against *Mtb*, because it activates macrophages to kill the intracellular bacilli. IL-10 is an immunoregulatory Th2 cytokine produced by T cells, macrophages, and dendritic cells. It can deactivate macrophages and can dampen the immune response to either prevent or limit the pathology from an over-exuberant inflammatory response to a pathogen. It can be suggested that high IL-10 levels could be detrimental to bacterial control (29). IL-4 is also a Th2 type of cytokine, and downregulates protective Th1 response (30). Balikó and colleagues (31) found a significant higher ratio of IL-4 and IL-10 positive lymphocytes and a significant lower ratio of IL-12 in the peripheral blood of patients with tuberculin anergy when compared with tuberculin positive patients or healthy donors. The high percentage of IL-4 and IL-10 positive lymphocytes together with a low percentage of IL-12 positive lymphocytes in the peripheral blood of anergic patients suggest a Th2 biased immune response during the early course of the disease. Montiel and colleagues (32), based on their observation of an increase in IL-4 concentrations together with low concentrations of IFN- γ in anergic patients, suggested that a Th2 pattern of immune response was associated with anergy.

Two previous investigations reported that the G allele of *IL10* -1082 was associated with higher production of IL-10 in TB patients with anergy (33, 34). Therefore the higher prevalence of *IL10* -1082 G/G genotype in anergic to PPD individuals detected in the Xavante is in line with these observations. The higher prevalence of *IL4* -590C homozygous subjects among those who developed skin reactivity to PPD (2.0; CI: 1.2-3.3) points to the same direction because the association of *IL4* -590T allele with increased IL-4 levels (35, 36) suggest that homozygous individuals for *IL4* -590C allele would have lower IL-4 levels therefore they will have a Th1 pattern of response that would explain the positive PPD reaction more frequently observed in these individuals.

Some studies have shown that the *IFNG* +874 A>T polymorphism influences IFN- γ production by providing a binding site for NF κ B. The A allele was found to predispose to disease in several populations (37-40). Electrophoretic mobility shift assays showed specific binding of NF κ B to the allelic sequence containing the +874T allele (38). Since this transcription factor induces IFN- γ expression, the +874T and +874A alleles are probably correlated with high and low IFN- γ expression, respectively (40). Studies carried out in Spanish and Turkish populations revealed an association between the T/T genotype of +874A>T polymorphism with increased IFN- γ production in response to mycobacterial antigens (39-41). However, an association of *IFNG* +874 T/A genotype with reactivity to PPD was obtained in our study, when compared to T/T genotype. If we consider the fact that in anergic individuals the IFN- γ production is lower, and that the T allele could be involved, our results seem to indicate the opposite. Notice, however that no homozygous A/A genotype was observed in this study. On the other hand, in one study (42), neither association of *IL4* -590 genotypes with IL-4 levels nor of *IFNG* +874 with IFN- γ secretion was observed. Clearly more studies are warranted to disclose the functional effect of these SNPs on cytokine levels and their effect on anergy and/or TB susceptibility.

Containment and cure of TB require an effective cell-mediated immune response. Moreover the absence of DTH responses to mycobacterial antigens, defined as anergy, during active TB infection can be associated with poor clinical outcome (11). If DTH is considered an important Th1 marker (43), its lack in immune response could be due to a diminished production of Th1 cytokines and a bias to Th2 cytokines. Results obtained in the present study indicate that polymorphisms in genes of Th2 immune profile – IL-4 and IL-10 – would be involved with response to PPD in the Xavante population. Knowledge about immunological mechanisms involved in maintaining a latent infection is crucial to the ultimate fate of a person with *Mtb* infection. Unique environmental and natural selective factors have resulted in the development of ethnic-specific host genetic factors. Thus, it is very important to investigate other polymorphisms in immune response genes specifically in indigenous populations. Furthermore, special attention should be given to healthy individuals, BCG-vaccinated, who probably have had contact with the *Mtb*, and do not respond to PPD, in order to explain what mechanisms could be occurring in latent infection and causing an inappropriate response to the intracellular pathogens.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

The present day Xavante indigenous population has almost 10,000 individuals living in numerous villages in Mato Grosso State, Brazil. Permanent contact between the Xavante and the Brazilian society was established in the late 1960s, when over half of the population died due to epidemics. TB was introduced at that time, and it has been a major cause of morbidity and mortality ever since (44). TB incidence rates in Xavante are one of the highest among indigenous peoples in Brazil – approximately 300/100,000 (45, 46).

The present study was conducted at *Etéñitépa* village, in Pimentel Barbosa Xavante reservation, located in northeastern Mato Grosso State (approximately 13° 20' S, 51° 40' W). The mean TB incidence rate for the period 1999 to 2004 at *Etéñitépa* village was 1,289.6/100,000 inhabitants, and coverage of BCG vaccination surpassed 90% of individuals (P.C. Basta, C.E. Coimbra, J.R. Welch, L.C. Alves, R.V. Santos and L.A. Camacho, manuscript in preparation). Epidemiological data indicate a high infant mortality, due to diarrhea and pneumonia (44, 47), and high prevalence rates of chronic undernutrition (11,3%) in children under 10 years old, although obesity is seen in older individuals.

The study sample included all individuals at *Etéñitépa* village in whom *Mtb* infection status was determined with purified protein derivative (PPD) skin tests. The sample was composed by 486 subjects (87% of the population at *Etéñitépa* village). Exclusion criteria were pregnant women and newborns. Each participant was injected intradermally on the volar side of the left forearm with 0.1 mL (2 TU) of purified protein derivative (PPD-RT23) (Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark). Tuberculin testing was done by a team of three nurses, each of whom read each test independently. The transverse diameter of indurations was measured at 72 h after inoculation. The agreement among measurements was high [intraclass correlation coefficient > 0.98] (P.C. Basta, C.E. Coimbra, J.R. Welch, L.C. Alves, R.V. Santos and L.A. Camacho, manuscript in preparation).

The Brazilian National Committee on Research Ethics approved this study, and a signed informed consent was obtained from the village leaders since most subjects were not literate in Portuguese, but all subjects provided verbal assent to participate. All activities were accompanied by a Xavante health agent.

Genotyping

Genomic DNA was extracted from buccal swabs (BuccalAmp™ DNA Extraction Kit - Epicentre, Madison, USA), and genotyping for the polymorphisms (except to *SLC11A1*) was carried out by TaqMan® SNP Genotyping Assay methods (Applied Biosystems, Foster City, USA). The *SLC11A1* polymorphism was genotyped by PCR-RFLP as described by Zhang and colleagues (48). Polymorphisms investigated in this study are described in Table 5.

Statistical analysis

Allele and genotype frequencies of individual polymorphisms were determined by direct counting, and compared between groups (anergics vs. non-anergics) using exact χ^2 tests. Association between genotypes and response to PPD was also evaluated using prevalence ratios (PR) estimated by Poisson regression with robust variance. Age and gender were included as covariates in the regression model, but only age was a significant variable. Therefore the PR was adjusted for age in all analyses, for this purpose age was dichotomized as < 15 and ≥ 15 years old.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the Xavante people for their hospitality and interest in participating in the research. We thank the nurse G. Fregona, as well as the staff of the Fundação Nacional de Saúde, for their assistance in fieldwork.

Conflict of Interest statement. All authors have no conflict of interests.

FUNDING

This work was supported by Institutos do Milênio, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) [Grant 420019/2005-7 and 400877/2005-8], Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX, Brazil) [Grant 0408959] and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Brazil).

REFERENCES

1. World Health Organization (2006) The Stop TB Department. WHO Report 2006. Global Tuberculosis Control – surveillance, planning, financing.
2. Basta, P.C., Coimbra, C.E., Escobar, A.L., Santos, R.V., Alves, L.C. and Fonseca, L.S. (2006) Survey for tuberculosis in an indigenous population of Amazonia: the Suruí of Rondônia, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **100**, 579-585.
3. Basta, P.C., Coimbra, C.E., Escobar, A.L. and Santos, R.V. (2004) Epidemiologic aspects of tuberculosis in the Suruí Indians, Brazilian Amazon. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **37**, 338-342.
4. Basta, P.C., Coimbra, C.E., Camacho, L.A. and Santos, R.V. (2006) Risk of tuberculous infection in an indigenous population from Amazonia, Brazil. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, **10**, 1354-1359.
5. Basta, P.C., Oelemann, M.A., Oelemann, W.M., Fonseca, L.S. and Coimbra, C.E. (2006) Detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum from Suruí Indian subjects, Brazilian Amazon. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **101**, 581-584.
6. Coimbra, C.E. and Basta, P.C. (2007) The burden of tuberculosis in indigenous peoples in Amazonia, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **101**, 635-636.
7. Sousa, A.O., Salem, J.I., Lee, F.K., Verçosa, M.C., Cruaud, P., Bloom, B.R., Lagrange, P.H. and David, H.L. (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**, 13227-13232.
8. van de Vosse, E., Hoeve, M.A. and Ottenhoff, T.H. (2004) Human genetics of intracellular infectious diseases: molecular and cellular immunity against mycobacteria and salmonellae. *Lancet Infect. Dis.*, **4**, 739-749.

9. Delgado, J.C., Tsai, E.Y., Thim, S., Baena, A., Boussiotis, V.A., Reynes, J.M., Sath, S., Grosjean, P., Yunis, E.J. and Goldfeld, A.E. (2002) Antigen-specific and persistent tuberculin anergy in a cohort of pulmonary tuberculosis patients from rural Cambodia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **99**, 7576-7581.
10. American Thoracic Society (2000) Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **161**, 1376-1395.
11. Boussiotis, V.A., Tsai, E.Y., Yunis, E.J., Thim, S., Delgado, J.C., Dascher, C.C., Berezovskaya, A., Rousset, D., Reynes, J.M. and Goldfeld, A.E. (2000) IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *J. Clin. Invest.*, **105**, 1317-1325.
12. Goldfeld, AE. (2004) Genetic susceptibility to pulmonary tuberculosis in Cambodia. *Tuberculosis*, **84**, 76-81.
13. Crevel, R., van Doorninck, D.J., van Ams, J.E., Fat, H.T., Vreden, S.G. and van der Meer, J.M. (2004) Tuberculosis among Trio-Indians in Surinam. *Ned. Tijdschr. Geneesk.*, **148**, 425-429.
14. González, N., De Cubeddu, L., de Waard, J.H., Fandiño, C., Fernández de Larrea, C., López, D., Maldonado, A., Ocaña, Y., Hernández, E., Ortega, R. *et al.* (2003) Study of immune response in Warao children from communities with high tuberculosis prevalence. *Invest. Clin.*, **44**, 303-318.
15. Escobar, A.L., Coimbra, C.E., Camacho, L.A. and Santos, R.V. (2004) Tuberculin reactivity and tuberculosis epidemiology in the Pakaanóva (Wari') Indians of Rondônia, south-western Brazilian Amazon. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, **8**, 45-51.
16. Amirzargar, A., Sadeghi, M., Khosravi, F., Dianat, S., Naroueynejad, M., Nicknam, M.H., Hatmi, N., Ansari-pour, B., Moradi, B. and Nikbin, B. (2006) Th1 and Th2

- cytokine gene polymorphisms in two indigenous ethnic groups in Iran. *Int. J. Immunogenet.*, **33**, 429-437.
17. Kidd, P. (2003) Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern. Med. Rev.*, **8**, 223-246.
 18. Mutis, T., Cornelisse, Y.E. and Ottenhoff, T.H. (1993) Mycobacteria induce CD4+ T cells that are cytotoxic and display Th1-like cytokine secretion profile: heterogeneity in cytotoxic activity and cytokine secretion levels. *Eur. J. Immunol.*, **23**, 2189-2195.
 19. Fulton, S.A., Johnsen, J.M., Wolf, S.F., Sieburth, D.S. and Boom WH. (1996) Interleukin-12 production by human monocytes infected with Mycobacterium tuberculosis: role of phagocytosis. *Infect. Immun.*, **64**, 2523-2531.
 20. Tonnetti, L., Spaccapelo, R., Cenci, E., Mencacci, A., Puccetti, P., Coffman, R.L., Bistoni, F. and Romani, L. (1995) Interleukin-4 and -10 exacerbate candidiasis in mice. *Eur. J. Immunol.*, **25**, 1559-1565.
 21. Hsu, N., Young, L.S. and Bermudez, L.E. (1995) Response to stimulation with recombinant cytokines and synthesis of cytokines by murine intestinal macrophages infected with the Mycobacterium avium complex. *Infect. Immun.*, **63**, 528-533.
 22. Newport, M.J. and Nejentsev, S. (2004) Genetics of susceptibility to tuberculosis in humans. *Monaldi Arch. Chest Dis.*, **61**, 102-111.
 23. Hill, A.V. (1998) The immunogenetics of human infectious diseases. *Annu. Rev. Immunol.*, **16**, 593-617.
 24. Selvaraj, P., Alagarasu, K., Harishankar, M., Vidyarani, M., Nisha Rajeswari, D. and Narayanan, P.R. (2008) Cytokine gene polymorphisms and cytokine levels in pulmonary tuberculosis. *Cytokine*, **43**, 26-33.
 25. Hill, A.V. (2006) Aspects of genetic susceptibility to human infectious diseases. *Annu. Rev. Genet.*, **40**, 469-486.

26. Berrington, W.R. and Hawn, T.R. (2007) Mycobacterium tuberculosis, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? *Immunol. Rev.*, **219**, 167-186.
27. Lykouras, D., Sampsonas, F., Kaparianos, A., Karkoulas, K., Tsoukalas, G. and Spiropoulos, K. (2008) Human genes in TB infection: their role in immune response. *Monaldi Arch. Chest Dis.*, **69**, 24-31.
28. Neel, J.V., Andrade, A.H., Brown, G.E., Eveland, W.E., Goobar, J., Sodeman, W.A., Stollerman, G.H., Weinstein, E.D. and Wheeler, A.H. (1968) Further studies of the Xavante Indians. IX. Immunologic status with respect to various diseases and organisms. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **17**, 486-498.
29. Tufariello, J.M., Chan, J. and Flynn, J.L. (2003) Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *Lancet Infect. Dis.*, **3**, 578-590.
30. Biedermann, T., Zimmermann, S., Himmelrich, H., Gumy, A., Egeter, O., Sakrauski, A.K., Seegmüller, I., Voigt, H., Launois, P., Levine, A.D. *et al.* (2001) IL-4 instructs TH1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice. *Nat. Immunol.*, **2**, 1054-1060.
31. Balikó, Z., Szereday, L. and Szekeres-Bartho, J. (1998) Th2 biased immune response in cases with active Mycobacterium tuberculosis infection and tuberculin anergy. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **22**, 199-204.
32. Montiel, M., Rivera, S., Hernández, R., Hassanhi, M., Villalobos, C., Vargas, F. and Núñez, J. (2002) Immune response and anergy. Study in tuberculosis patients from the University Hospital, Maracaibo, Venezuela. *Acta Cient. Venez.*, **53**, 36-43.
33. Turner, D.M., Williams, D.M., Sankaran, D., Lazarus, M., Sinnott, P.J. and Hutchinson, I.V. (1997) An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur. J. Immunogenet.*, **24**, 1-8.

34. Yilmaz, V., Yentür, S.P. and Saruhan-Direskeneli, G. (2005) IL-12 and IL-10 polymorphisms and their effects on cytokine production. *Cytokine*, **30**, 188-194.
35. Rosenwasser, L.J., Klemm, D.J., Dresback, J.K., Inamura, H., Mascali, J.J., Klinnert, M. and Borish, L. (1995) Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy. *Clin. Exp. Allergy*, **25**, 74-78.
36. Luoni, G., Verra, F., Arcà, B., Sirima, B.S., Troye-Blomberg, M., Coluzzi, M., Kwiatkowski, D., Modiano, D. (2001) Antimalarial antibody levels and IL4 polymorphism in the Fulani of West Africa. *Genes Immun.*, **2**, 411-414.
37. Lio, D., Marino, V., Serauto, A., Gioia, V., Scola, L., Crivello, A., Forte, G.I., Colonna-Romano, G., Candore, G. and Caruso, C. (2002) Genotype frequencies of the +874T-->A single nucleotide polymorphism in the first intron of the interferon-gamma gene in a sample of Sicilian patients affected by tuberculosis. *Eur. J. Immunogenet.*, **29**, 371-374.
38. Pravica, V., Perrey, C., Stevens, A., Lee, J.H. and Hutchinson, I.V. (2000) A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. *Hum. Immunol.*, **61**, 863-866.
39. López-Maderuelo, D., Arnalich, F., Serantes, R., González, A., Codoceo, R., Madero, R., Vázquez, J.J. and Montiel, C. (2003) Interferon-gamma and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **167**, 970-975.
40. Rossouw, M., Nel, H.J., Cooke, G.S., van Helden, P.D. and Hoal, E.G. (2003) Association between tuberculosis and a polymorphic NFkappaB binding site in the interferon gamma gene. *Lancet*, **361**, 1871-1872.

41. Sallakci, N., Coskun, M., Berber, Z., Gürkan, F., Kocamaz, H., Uysal, G., Bhuj, S., Yavuzer, U., Singh, M. and Yeğın, O. (2007) Interferon-gamma gene+874T-A polymorphism is associated with tuberculosis and gamma interferon response. *Tuberculosis*, **87**, 225-230.
42. Vidyarani, M., Selvaraj, P., Prabhu Anand, S., Jawahar, M.S., Adhilakshmi, A.R. and Narayanan, P.R. (2006) Interferon gamma (IFNgamma) & interleukin-4 (IL-4) gene variants & cytokine levels in pulmonary tuberculosis. *Indian J. Med. Res.*, **124**, 403-410.
43. Yılmaz, M., Bingöl, G., Altıntaş, D. and Kendirli, S.G. (2000) Correlation between atopic diseases and tuberculin responses. *Allergy*, **55**, 664-667.
44. Coimbra, C.E., Flowers, N.M., Salzano, F.M. and Santos, R.V. (2002) The Xavante in Transition: health, ecology, and bioanthropology in Central Brazil. *Ann Arbor: University of Michigan Press*.
45. Amarante, J.M. and Costa, V.L.A. (2000) A tuberculose nas comunidades indígenas brasileiras na virada do século. *Boletim de Pneumologia Sanitária*, **8**, 5-12.
46. Garnelo, L., Macedo, G. and Brandão, L.C. (2003) Os Povos Indígenas e a Construção das Políticas de Saúde no Brasil. Brasília: *Organização Pan-Americana da Saúde*.
47. Lunardi, R., Santos, R.V. and Coimbra, C.E. (2007) Morbidade hospitalar de indígenas Xavante, Mato Grosso, Brasil (2000-2002). *Revista Brasileira de Epidemiologia* 10: 441-452.
48. Zhang, W., Shao, L., Weng, X., Hu, Z., Jin, A., Chen, S., Pang, M. and Chen, Z.W. (2005) Variants of the natural resistance-associated macrophage protein 1 gene (NRAMP1) are associated with severe forms of pulmonary tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.*, **40**, 1232-1236.

Table 1. Allele frequencies for the polymorphisms in Xavante and the frequency range of alleles in world populations.

Gene	dbSNP ID	N	Allele	MAF (%)			
				Xavante	Africans	Europeans	Asians
<i>SLC11A1</i>		156	C	41	10-12	21-27	3-17
<i>VDR</i>	rs2228570	485	A	32	17-24	34-44	26-51
<i>SP110</i>	rs3948464	485	T	<1	12-27	8-15	0-1
	rs2114592	409	T	0	14-28	10	15-26
<i>P2X7</i>	rs3751143	484	C	15	7-11	14-17	20-25
<i>PTPN22</i>	rs2476601	477	T	0	0-3	1-21	0-6
<i>IL1B</i>	rs1143629	478	T	30	55	63-83	46-60
<i>IL12RBI</i>	rs11575934	484	G	1	10-24	30-37	34-49
	rs375947	476	C	1	23-26	30-38	27-52
<i>IFNGR1</i>	rs1327474	476	G	6	3-98	34-43	3-6
	rs2234711	479	C	22	41-47	35-55	44-50
<i>TNFR1</i>	rs4149622	486	G	5	60-65	0	10-13
<i>IFNG</i>	rs2430561	436	A	2	68-76	49-73	64-68
<i>IL2</i>	rs2069762	418	G	17	0-6	23-38	24-56
<i>IL10</i>	rs1800872	477	C	32	52-77	45-83	27-77
	rs1800896	475	G	13	31-47	28-67	4-40
<i>IL6</i>	rs1800795	470	C	0	0-9	18-57	0-40
<i>IL4</i>	rs2243250	427	C	16	17-29	83-89	17-89
<i>IL4R</i>	rs1801275	468	G	33	83-90	22-33	7-23

MAF: minor allele frequencies.

Sources of allelic frequencies in world populations (*Supplementary material*): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; Liu et al. (1995); Bellamy et al. (1998); Yang et al. (2000); Delgado et al. (2002); Li et al. (2002); Abe et al. (2003); López-Maderuelo et al. (2003); Scola et al. (2003); Rossouw et al. (2003); Bornman et al. (2004); Remus et al. (2004); Sellick et al. (2004); Uitterlinden et al. (2004); Gomez et al. (2005); Malik et al. (2005); Orozco et al. (2005); Shin et al (2005); van Oene et al. (2005); Zhang et al (2005); Amirzargar et al. (2006); Bulat-Kardum et al. (2006); Etokebe et al. (2006); Henao et al. (2006); Pierer et al. (2006); Shemon et al. (2006); Thye et al. (2006); Tosh et al. (2006); Vidyanani et al. (2006); Zammiti et al. (2006); Prabhu Anand et al. (2007); Babb et al.

(2007); Fernando et al. (2007); Kusuhara et al. (2007); Sahiratmadja et al. (2007); Stein et al. (2007); Amim et al. (2008); Selvaraj et al. (2008); Smith et al. (2008).

Table 2. Association of genotype frequencies with response to PPD.

Gene	dbSNP ID	Genotypes	PPD=0	PPD>0	<i>P</i> value*
<i>SLC11A1</i>	rs3731865	G/G	33	22	0.927
		G/C	40	30	
		C/C	14	11	
<i>VDR</i>	rs2228570	G/G	162	79	0.752
		G/A	117	50	
		A/A	47	19	
<i>SP110</i>	rs3948464	C/C	324	148	0.570
		C/T	2	0	
	rs2114592	C/C	266	133	-
<i>P2X7</i>	rs3751143	C/C	11	5	0.784
		C/A	76	31	
		A/A	237	113	
<i>PTPN22</i>	rs2476601	C/C	319	147	-
<i>IL1B</i>	rs1143629	C/C	160	66	0.458
		C/T	135	71	
		T/T	25	10	
<i>IL12RB1</i>	rs11575934	A/A	320	147	0.705
		A/G	3	1	
		G/G	2	0	
	rs375947	C/C	1	1	0.265
C/T		6	0		
T/T		311	146		
<i>IFNGR1</i>	rs1327474	A/A	284	128	0.756
		A/G	36	18	
	rs2234711	C/C	12	4	0.739
C/T		119	53		
T/T		188	92		
<i>TNFR1</i>	rs4149622	A/A	301	132	0.202
		A/G	23	17	
		G/G	2	0	
<i>IFNG</i>	rs2430561	T/T	277	133	0.059
		T/A	7	9	
<i>IL2</i>	rs2069762	T/T	189	91	0.532
		T/G	76	41	
		G/G	7	6	
<i>IL10</i>	rs1800872	C/C	15	4	0.596
		C/A	177	83	
		A/A	126	61	
	rs1800896	G/G	13	0	0.042
G/A		64	33		
A/A		241	114		
<i>IL6</i>	rs1800795	G/G	312	147	-
<i>IL4</i>	rs2243250	T/T	193	105	0.045
		T/C	73	29	
		C/C	7	10	
<i>IL4R</i>	rs1801275	G/G	33	19	

G/A	137	57	0.586
A/A	143	69	

* χ^2 test. In bold are the P -values lower than 0.25.

Table 3. Prevalence ratios for reaction to PPD.

Gene	dbSNP ID	Genotypes	PPD=0 N(%)	PPD>0 N(%)	Adjusted PR* (95% CI)	P value
<i>TNFR1</i>	rs4149622	A/A	301(92.3)	132(88.6)	0.8 (0.6-1.2)	0.314
		A/G	23(7.1)	17(11.4)		
		G/G	2(0.6)	0(0)		
<i>IFNG</i>	rs2430561	T/A	7(2.5)	9(6.3)	1.9 (1.1-3.1)	0.020
		T/T	277(97.5)	133(93.7)		
<i>IL4</i>	rs2243250	C/C	7(2.6)	10(6.9)	2.0 (1.2-3.3)	0.007
		C/T	73(26.7)	29(20.1)		
		T/T	193(70.7)	105(72.9)		

PR: prevalence ratio.

*Adjusted for age.

Assuming a dominance model: *TNFR1* A/A vs. A/G and A/A genotypes; *IFNG* T/A vs. T/T genotype; *IL4* C/C vs. T/C and T/T genotypes.

Table 4. Prevalence ratios for anergy to PPD.

Gene	dbSNP ID	Genotypes	PPD=0 N(%)	PPD>0 N(%)	Adjusted PR* (95% CI)	P value
<i>IL10</i>	rs1800896	G/G	13(4.1)	0(0)	1.5 (1.2-1.7)	<0.001
		G/A	64(20.1)	33(22.4)		
		A/A	241(75.8)	114(77.6)		

PR: prevalence ratio.

*Adjusted for age.

Assuming a dominance model: *IL10* G/G vs. G/A and A/A genotypes.

Table 5. Polymorphisms investigated in this study.

Gene	Chromosome Location	Polymorphism	dbSNP ID
<i>SLC11A1 (NRAMPI)</i>	2q35	INT4 (496 + 14 G>C)	rs3731865
<i>VDR</i>	12q13.11	<i>Fok I</i> A>G	rs10735810
<i>SP110</i>	2q37.1	exon 11 C>T	rs3948464
		intron 6 C>T	rs2114592
<i>P2X7</i>	12q24	1513 A>C	rs3751143
<i>PTPN22</i>	1p13.3-p13.1	1858 C>T	rs2476601
<i>IL1B</i>	2q14	intron 2 C>T	rs1143629
<i>IL12RB1</i>	19p13.1	641 A>G	rs11575934
		1094 T>C	rs375947
<i>IFNGR1</i>	6q23.3	-611 G>A	rs1327474
		-56 T>C	rs2234711
<i>TNFR1</i>	12p13.2	intron 1 A>G	rs4149622
<i>IFNG</i>	12q14	+874 A>T	rs2430561
<i>IL2</i>	4q26-q27	-330 T>G	rs2069762
<i>IL10</i>	1q31-q32	-592 A>C	rs1800872
		-1082 A>G	rs1800896
<i>IL6</i>	7p21	-174 G>C	rs1800795
<i>IL4</i>	5q31.1	-590 T>C	rs2243250
<i>IL4R</i>	16p12.1-p11.2	1902 A>G	rs1801275

SUPPLEMENTARY MATERIAL

References for Table 1.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

- Abe T., Iinuma Y., Ando M., Yokoyama T., Yamamoto T., Nakashima K., Takagi N., Baba H., Hasegawa Y. and Shimokata K. (2003) NRAMP1 polymorphisms, susceptibility and clinical features of tuberculosis. *J. Infect.*, **46**, 215-220.
- Amim L.H., Pacheco A.G., Fonseca-Costa J., Loredó C.S., Rabahi M.F., Melo M.H., Ribeiro F.C., Mello F.C., Oliveira M.M., Lapa E Silva J.R. *et al.* (2008) Role of IFN- γ +874 T/A single nucleotide polymorphism in the tuberculosis outcome among Brazilians subjects. *Mol. Biol. Rep.*, **35**, 563-566.
- Amirzargar, A., Sadeghi, M., Khosravi, F., Dianat, S., Naroueynejad, M., Nicknam, M.H., Hatmi, N., Ansari-pour, B., Moradi, B. and Nikbin, B. (2006) Th1 and Th2 cytokine gene polymorphisms in two indigenous ethnic groups in Iran. *Int. J. Immunogenet.*, **33**, 429-437.
- Babb C., Keet E.H., van Helden P.D. and Hoal E.G. (2007) SP110 polymorphisms are not associated with pulmonary tuberculosis in a South African population. *Hum. Genet.*, **121**, 521-522.
- Bellamy R., Ruwende C., Corrah T., McAdam K.P., Whittle H.C. and Hill A.V. (1998) Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. *N. Engl. J. Med.*, **338**, 640-644.
- Bornman L., Campbell S.J., Fielding K., Bah B., Sillah J., Gustafson P., Manneh K., Lisse I., Allen A., Sirugo G. *et al.* (2004) Vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in West Africa: a case-control and family study. *J. Infect. Dis.*, **190**, 1631-1641.

- Bulat-Kardum L., Etokebe G.E., Knezevic J., Balen S., Matakovic-Mileusnic N., Zaputovic L., Pavelic J., Beg-Zec Z. and Dembic Z. (2006) Interferon-gamma receptor-1 gene promoter polymorphisms (G-611A; T-56C) and susceptibility to tuberculosis. *Scand. J. Immunol.*, **63**, 142-150.
- Delgado J.C., Baena A., Thim S. and Goldfeld A.E. (2002) Ethnic-specific genetic associations with pulmonary tuberculosis. *J. Infect. Dis.*, **186**, 1463-1468.
- Etokebe G.E, Bulat-Kardum L., Johansen M.S., 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**, 136-141.
- Fernando S.L., Saunders B.M., Sluyter R., Skarratt K.K., Goldberg H., Marks G.B., Wiley J.S. and Britton W.J. (2007) A polymorphism in the P2X7 gene increases susceptibility to extrapulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **175**, 360-366.
- Gomez L.M., Anaya J.M. and Martin J. (2005) Genetic influence of PTPN22 R620W polymorphism in tuberculosis. *Hum. Immunol.*, **66**, 1242-1247.
- Henao M.I., Montes C., Paris S.C. and Garcia L.F. (2006) Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. *Tuberculosis*, **86**, 11-19.
- Kusuhara K., Yamamoto K., Okada K., Mizuno Y. and 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.
- Li C.M., Campbell S.J., Kumararatne D.S., Bellamy R., Ruwende C., McAdam K.P., Hill A.V. and Lammas D.A. (2002) Association of a polymorphism in the P2X7 gene with tuberculosis in a Gambian population. *J. Infect. Dis.*, **186**, 1458-1462.

- Liu J., Fujiwara T.M., Buu N.T., Sánchez F.O., Cellier M., Paradis A.J., Frappier D., Skamene E., Gros P., Morgan K. *et al.* (1995) Identification of polymorphisms and sequence variants in the human homologue of the mouse natural resistance-associated macrophage protein gene. *Am. J. Hum. Genet.*, **56**, 845-853.
- López-Maderuelo, D., Arnalich, F., Serantes, R., González, A., Codoceo, R., Madero, R., Vázquez, J.J. and Montiel, C. (2003) Interferon-gamma and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **167**, 970-975.
- Malik S., Abel L., Tooker H., Poon A., Simkin L., Girard M., Adams G.J., Starke J.R., Smith K.C., Graviss E.A. *et al.* (2005) Alleles of the NRAMP1 gene are risk factors for pediatric tuberculosis disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **102**, 12183-12188.
- Orozco G., Sánchez E., González-Gay M.A., López-Nevot M.A., Torres B., Cáliz R., Ortego-Centeno N., Jiménez-Alonso J., Pascual-Salcedo D., Balsa A. *et al.* (2005) Association of a functional single-nucleotide polymorphism of PTPN22, encoding lymphoid protein phosphatase, with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, **52**, 219-224.
- Pierer, M., Kaltenhäuser, S., Arnold, S., Wahle, M., Baerwald, C., Häntzschel, H. and Wagner, U. (2006) Association of PTPN22 1858 single-nucleotide polymorphism with rheumatoid arthritis in a German cohort: higher frequency of the risk allele in male compared to female patients. *Arthritis Res. Ther.*, **8**, R75.
- Prabhu Anand S., Selvaraj P., Jawahar M.S., Adhilakshmi A.R. and Narayanan P.R. (2007) Interleukin-12B & interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *Indian J. Med. Res.*, **126**, 135-138.
- Remus N., El Baghdadi J., Fieschi C., Feinberg J., Quintin T., Chentoufi M., Schurr E., Benslimane A., Casanova J.L. and Abel L. (2004) Association of IL12RB1

- polymorphisms with pulmonary tuberculosis in adults in Morocco. *J. Infect. Dis.*, **190**, 580-587.
- Rossouw, M., Nel, H.J., Cooke, G.S., van Helden, P.D. and Hoal, E.G. (2003) Association between tuberculosis and a polymorphic NFkappaB binding site in the interferon gamma gene. *Lancet*, **361**, 1871-1872.
- Sahiratmadja E., Baak-Pablo R., de Visser A.W., Alisjahbana B., Adnan I., van Crevel R., Marzuki S., van Dissel J.T., Ottenhoff T.H. and van de Vosse E. (2007) Association of polymorphisms in IL-12/IFN-gamma pathway genes with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Indonesia. *Tuberculosis*, **87**, 303-311.
- Scola L., Crivello A., Marino V., Gioia V., Serauto A., Candore G., Colonna-Romano G., Caruso C. and Lio D. (2003) IL-10 and TNF-alpha polymorphisms in a sample of Sicilian patients affected by tuberculosis: implication for ageing and life span expectancy. *Mech. Ageing Dev.*, **124**, 569-572.
- Sellick G.S., Rudd M., Eve P., Allinson R., Matutes E., Catovsky D. and Houlston R.S. (2004) The P2X7 receptor gene A1513C polymorphism does not contribute to risk of familial or sporadic chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **13**, 1065-1067.
- Selvaraj P., Alagarasu K., Harishankar M., Vidyarani M., Nisha Rajeswari D. and Narayanan P.R. (2008) Cytokine gene polymorphisms and cytokine levels in pulmonary tuberculosis. *Cytokine*, **43**, 26-33.
- Shemon A.N., Sluyter R., Fernando S.L., Clarke A.L., Dao-Ung L.P., Skarratt K.K., Saunders B.M., Tan K.S., Gu B.J., Fuller S.J. *et al.* (2006) A Thr357 to Ser polymorphism in homozygous and compound heterozygous subjects causes absent or reduced P2X7 function and impairs ATP-induced mycobacterial killing by macrophages. *J. Biol. Chem.*, **281**, 2079-2086.

- Shin H.D., Park B.L., Kim Y.H., Cheong H.S., Lee I.H. and Park S.K. (2005) Common interleukin 10 polymorphism associated with decreased risk of tuberculosis. *Exp. Mol. Med.*, **37**, 128-132.
- Smith R.L., Warren R.B., Eyre S., Ke X., Young H.S., Allen M., Strachan D., McArdle W., Gittins M.P., Barker J.N. et al. (2008) Polymorphisms in the PTPN22 region are associated with psoriasis of early onset. *Br. J. Dermatol.*, **158**, 962-968.
- Stein C.M., Zalwango S., Chiunda A.B., Millard C., Leontiev D.V., Horvath A.L., Cartier K.C., Chervenak K., Boom W.H., Elston R.C. 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**, 663-673.
- Thye T., Browne E.N., Chinbuah M.A., Gyapong J., Osei I., Owusu-Dabo E., Niemann S., R \ddot{u} sch-Gerdes S., Horstmann R.D. and Meyer C.G. (2006) No associations of human pulmonary tuberculosis with Sp110 variants. *J. Med. Genet.*, **43**, e32.
- Tosh K., Campbell S.J., 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**, 10364-10368.
- Uitterlinden A.G., Fang Y., Van Meurs J.B., Pols H.A. and Van Leeuwen J.P. (2004) Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*, **338**, 143-156.
- van Oene M., Wintle R.F., Liu X., Yazdanpanah M., Gu X., Newman B., Kwan A., Johnson B., Owen J., Greer W. et al. (2005) Association of the lymphoid tyrosine phosphatase R620W variant with rheumatoid arthritis, but not Crohn's disease, in Canadian populations. *Arthritis Rheum.*, **52**, 1993-1998.

- Vidyarani, M., Selvaraj, P., Prabhu Anand, S., Jawahar, M.S., Adhilakshmi, A.R. and Narayanan, P.R. (2006) Interferon gamma (IFN γ) & interleukin-4 (IL-4) gene variants & cytokine levels in pulmonary tuberculosis. *Indian J. Med. Res.*, **124**, 403-410.
- Yang Y.S., Kim S.J., Kim J.W. and Koh E.M. (2000) NRAMP1 gene polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis in Koreans. *J. Korean Med. Sci.*, **15**, 83-87.
- Zammiti W., Mtiraoui N., Cochery-Nouvellon E., Mahjoub T., Almawi W.Y. and Gris J.C. (2006) Association of -592C/A, -819C/T and -1082A/G interleukin-10 promoter polymorphisms with idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Mol. Hum. Reprod.*, **12**, 771-776.
- Zhang W., Shao L., Weng X., Hu Z., Jin A., Chen S., Pang M. and Chen Z.W. (2005) Variants of the natural resistance-associated macrophage protein 1 gene (NRAMP1) are associated with severe forms of pulmonary tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.*, **40**, 1232-1236.

CAPÍTULO IV

**NO ASSOCIATION BETWEEN GENES RELATED TO IMMUNE
RESPONSE AND SUSCEPTIBILITY TO TUBERCULOSIS IN
XAVANTE INDIANS FROM CENTRAL BRAZIL**

TISSUE ANTIGENS (em preparação)

**NO ASSOCIATION BETWEEN GENES RELATED TO IMMUNE
RESPONSE AND SUSCEPTIBILITY TO TUBERCULOSIS IN
XAVANTE INDIANS FROM CENTRAL BRAZIL**

Verônica M. Zembrzuski¹, Paulo C. Basta², Ricardo V. Santos², Carlos E. A. Coimbra Jr², Francisco M. Salzano¹ and Mara H. Hutz^{1*}

¹Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. ²Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

*To whom correspondence should be addressed:

Prof. Mara H. Hutz
Departamento de Genética
Instituto de Biociências, UFRGS
Caixa Postal 15053
91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil
Phone: 55 51 3308-6720
Fax: 55 51 3343-5850
E-mail: mara.hutz@ufrgs.br

Short Title: Immune response genes and susceptibility to tuberculosis

Abstract

The purpose of this study was to search for genes potentially associated to tuberculosis (TB) susceptibility in Xavante Indians, a native Brazilian population from Central Brazil. We examined 492 individuals and 41 of them were diagnosed with TB scars or active disease through chest X-ray. A total of 13 single nucleotide polymorphisms (SNPs) were genotyped: *SLC11A1* INT4 (496 + 14 G/C), *VDR Fok I* A/G, *P2X7* 1513 A/C, *IL-1B* intron 2 C/T, *IFN γ R1* -611 G/A and -56 T/C, *TNFR1* intron 1 A/G, *IFN- γ* +874 A/T, *IL-2* -330 T/G, *IL-10* -592 A/C and -1082 A/G, *IL-4* -590 T/C, and *IL-4R* 1902 A/G. Our results showed no association between SNPs and TB in the Xavante group.

Key words: Brazilian Indians, genes, susceptibility, tuberculosis.

Tuberculosis (TB), caused by *Mycobacterium tuberculosis*, has reemerged as a leading global health threat, accounting for almost 9 million new cases and 2 million deaths every year (1). The disease remains a major cause of morbidity and mortality among indigenous peoples in Brazil, and a major public health challenge, especially in the Amazon region (2). Susceptibility to TB is known to be strongly influenced by human genetics factors (3) and this genetic predisposition is supported by findings of many different TB susceptibility genes in genome-wide screens, in different ethnic populations (4, 5). There is a higher disease concordance in monozygotic twins than in dizygotic twins (6), and infection rates differ among ethnic groups (7). Several candidate genes have been tested using association studies, and a number of them were associated or linked with susceptibility to TB (8-12). However, the interpretation of the literature on genetic associations with infectious diseases is complicated by apparent inconsistencies between different populations for many associations (13).

The purpose of this study was to search for genes potentially associated to tuberculosis (TB) susceptibility in a native Brazilian population. Knowledge about many aspects of the biology and epidemiology of indigenous Amazonian people in Brazil has been accumulating since the 1960s. It was observed a high mortality after contact with non-indigenous, especially due to infectious disease epidemics (14).

The Xavante Indians of Central Brazil have been a source of interest to outsiders for a long time. As with so many other indigenous populations the mortality from introduced diseases left them a shadow of themselves both biologically and culturally (14). The Pimentel Barbosa Xavante reservation, where this study was performed, is located in northeastern Mato Grosso State, Central Brazil (approximately 13° 20' S, 51° 40' W). Our research on Pimentel Barbosa reservation was carried out at *Etéñitépa* village, which has been continuously occupied since 1972.

TB was probably introduced in the Xavante after contact with Brazilian nationals and spread throughout Xavante villages in the 1960s and mid-1970s. Nowadays, the Xavante Public Health District is listed as having one of the highest TB incidence rates among indigenous peoples in Brazil – approximately 300/100,000 (15, 16). In 2006, when the fieldwork for this study was carried out, the village was composed of 560 individuals. We examined 492 Xavante Indians in order to evaluate the importance of host genetic susceptibility factors to TB in this ethnic group. Data from individuals with TB scars or individuals with active disease in our sample were assessed through chest X-ray. Forty-one individuals were diagnosed with TB scars or active disease. This group comprised 19 males and 22 females (mean age: 33 ± 27 yr), whereas the healthy group (451 individuals) was composed of 212 males and 239 females (mean age: 17 ± 17 yr).

The polymorphisms investigated were chosen due to their importance in relation to immune response, specifically to TB. A total of 13 single nucleotide polymorphisms (SNPs) were genotyped: *SLC11A1* INT4 (496 + 14 G>C), *VDR* *Fok* I A>G, *P2X7* 1513 A>C, *IL1B* intron 2 C>T, *IFNGR1* -611 G>A and -56 T>C, *TNFR1* intron 1 A>G, *IFNG* +874 A>T, *IL2* -330 T>G, *IL10* -592 A>C and -1082 A>G, *IL4* -590 T>C, and *IL4R* 1902 A>G. Genomic DNA was obtained from buccal swabs (BuccalAmp™ DNA Extraction Kit - Epicentre, Madison, USA); genotyping was carried out using TaqMan® SNP Genotyping Assay methods (Applied Biosystems, Foster City, USA), or by PCR-RFLP [*SLC11A1* (17)]. The Brazilian National Committee on Research Ethics approved this study, and a signed informed consent was obtained from the village leaders since most subjects were not literate in Portuguese, but all subjects provided verbal assent to participate. All activities were accompanied by a Xavante health agent.

Table 1 shows allele frequencies for the polymorphisms studied and the results for association between genotypes and TB. No association with the disease was observed.

This investigation is part of a multidisciplinary study about infection by *Mtb* and TB disease in a Xavante population. Moreover this is the first study that searched for TB susceptibility genes in Brazilian Indians. In Brazil, prevalence of disease among indigenous groups is higher than among non-indigenous (18). Within the Yanomami population, a high prevalence of active TB was observed (19); in the Suruí Indians the prevalence rates were higher than in their non-native neighbors (18, 20). Preliminary results strongly indicated previous TB and suggested a continued risk of disease in Xavante population. In the Brazilian National Notifiable Diseases Surveillance System database (*Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN*) it was found records of previous treatment for 37 subjects from Pimentel Barbosa village during the period 1999 to 2004. The mean rate of incidence for this period was 1,289.6 per 100,000 inhabitants. A large majority of the cases (81.1%) occurred in 1999 (Basta et al., unpublished data).

Despite high disease incidence rates, this study suggests a lack of association of genetic polymorphisms with TB in the Xavante. However, many other studies also reported negative associations for all genes studied here. Inconsistency between genetic association studies could be due to ethnic-specific genetic factors greatly influencing host immunity to disease, causing differential susceptibility to disease (21). However, our study should be understood in the context of some limitations. The sample of TB cases is small but almost all the population (87%) has been sampled. Because TB diagnosis was obtained by precarious public health systems we could have missed some TB cases.

TB is a multifactorial condition and its development depends on complex environmental factors and host genetic factors. Prevalence rates among indigenous groups are typically higher than among their non-indigenous neighbors. Native South Americans experience high rates of TB, however little work has been undertaken to investigate factors involved in Native American susceptibility (22). Profound demographic, ecological, and

epidemiological transformations the Xavante have undergone in recent decades and the complex interaction between host genetics, and environmental and cultural factors contribute to high TB rates. More studies with other immune system genes in this and other native Brazilian populations are required to explain why TB rates in this ethnic group are higher than their nonindigenous neighbors.

Acknowledgements

The authors thank the Xavante people, the Fundação Nacional de Saúde and Fundação Nacional do Índio for their support. Funding was provided by the CNPq (420019/2005-7 and 400877/2005-8), PRONEX (0408959) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul. *All authors have no conflict of interests.*

References

1. World Health Organization. The Stop TB Department. WHO Report 2006. Global Tuberculosis Control – surveillance, planning, financing.
2. Coimbra Jr CE, Basta PC. The burden of tuberculosis in indigenous peoples in Amazonia, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007; 101: 635-636.
3. Bellamy R. Genetic susceptibility to tuberculosis. *Clin Chest Med* 2005; 26: 233-246.
4. Bellamy R, Beyers N, McAdam KP et al. Genetic susceptibility to tuberculosis in Africans: a genome-wide scan. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 8005-8009.
5. Cervino AC, Lakiss S, Sow O et al. Fine mapping of a putative tuberculosis-susceptibility locus on chromosome 15q11-13 in African families. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 1599-1603.
6. Kallmann FJ, Reisner D. Twin studies on the significance of genetic factors in tuberculosis. *Am Rev Tuberc* 1942; 16: 593-617.
7. Stead WW, Senner JW, Reddick WT, Lofgren JP. Racial differences in susceptibility to infection by *Mycobacterium tuberculosis*. *N Engl J Med* 1990; 322: 422-427.
8. Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 581-620.
9. Remus N, Alcaïs A, Abel L. Human genetics of common mycobacterial infections. *Immunol Res* 2003; 28: 109-129.
10. Newport MJ, Nejentsev S. Genetics of susceptibility to tuberculosis in humans. *Monaldi Arch Chest Dis* 2004; 61: 102-111.
11. Ottenhoff TH, Verreck FA, Hoeve MA, van de Vosse E. Control of human host immunity to mycobacteria. *Tuberculosis* 2005; 85: 53-64.

12. Fortin A, Abel L, Casanova JL, Gros P. Host genetics of mycobacterial diseases in mice and men: forward genetic studies of BCG-osis and tuberculosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2007; 8: 163-192.
13. Hill AV. The immunogenetics of human infectious diseases. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 593-617.
14. Coimbra C, Flowers NM, Salzano FM, Santos R. The Xavante in transition: health, ecology and bioanthropology in Central Brazil. Ann Arbor: University Michigan Press, 2002.
15. Amarante JM, Costa VLA. A tuberculose nas comunidades indígenas brasileiras na virada do século. *Bol Pneumol Sanit* 2000; 8: 5-12.
16. Garnelo L, Macedo G, Brandão LC. Os povos indígenas e a construção das políticas de saúde no Brasil. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2003.
17. Zhang W, Shao L, Weng X et al. Variants of the natural resistance-associated macrophage protein 1 gene (NRAMP1) are associated with severe forms of pulmonary tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 1232-1236.
18. Basta PC, Coimbra Jr CE, Escobar AL, Santos RV. Aspectos epidemiológicos da tuberculose na população indígena Suruí, Amazônia, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004; 37: 338-342.
19. Sousa AO, Salem JI, Lee FK et al. 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* 1997; 94: 13227-13232.
20. Basta PC, Coimbra Jr CE, Escobar AL, Santos RV, Alves LC, Fonseca L de S. Survey for tuberculosis in an indigenous population of Amazonia: the Suruí of Rondônia, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; 100: 579-585.

21. Prabhu Anand S, Selvaraj P, Jawahar MS, Adhilakshmi AR, Narayanan PR. Interleukin-12B & interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. Indian J Med Res 2007; 126: 135-138.
22. Wilbur AK, Kubatko LS, Hurtado AM, Hill KR, Stone AC. Vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility M. tuberculosis in native Paraguayans. Tuberculosis 2007; 87: 329-337.

Table 1: Polymorphisms investigated and the associations between individuals with scars of TB or active TB and healthy controls.

Gene	Polymorphisms	dbSNP ID	Genotypes	Cases ^a (n)	Controls (n)	<i>P</i> value ^b
<i>SLC11A1</i>	INT4 (496 + 14 G>C)	rs3731865	G/G	52	3	0.455
			G/C	66	9	
			C/C	24	2	
<i>VDR</i>	<i>Fok</i> I A>G	rs2228570	G/G	228	17	0.091
			G/A	152	21	
			A/A	64	3	
<i>P2X7</i>	1513 A>C	rs3751143	C/C	14	2	0.537
			C/A	101	7	
			A/A	328	32	
<i>IL1B</i>	intron 2 C>T	rs1143629	C/C	215	16	0.376
			C/T	191	21	
			T/T	31	4	
<i>IFNGR1</i>	-611 G>A	rs1327474	A/A	385	37	0.807
			A/G	50	4	
			G/G	0	0	
	-56 T>C	rs2234711	C/C	16	1	0.907
			C/T	162	14	
			T/T	260	26	
<i>TNFR1</i>	intron 1 A>G	rs4149622	A/A	405	38	1.000
			A/G	38	3	
			G/G	2	0	
<i>IFNG</i>	+874 A>T	rs2430561	T/T	382	37	1.000
			T/A	16	1	
			A/A	0	0	
<i>IL2</i>	-330 T>G	rs2069762	T/T	254	31	0.351
			T/G	111	9	
			G/G	13	0	
<i>IL10</i>	-592 A>C	rs1800872	C/C	18	2	0.733
			C/A	247	21	
			A/A	171	18	
	-1082 A>G	rs1800896	G/G	12	1	0.601
			G/A	92	6	
			A/A	330	34	
<i>IL4</i>	-590 T>C	rs2243250	T/T	278	27	0.943
			T/C	97	8	
			C/C	16	1	
<i>IL4R</i>	1902 A>G	rs1801275	G/G	54	3	0.638
			G/A	178	19	
			A/A	196	18	

^aIndividuals with scars of TB or active TB.

^b χ^2 test.

CAPÍTULO V

DISCUSSÃO

As discussões específicas referentes aos resultados obtidos no presente trabalho encontram-se nos capítulos anteriores (III e VI).

Grandes esforços são feitos por parte dos governos a fim de se tentar controlar as altas taxas de TB no mundo inteiro. Com o avanço da epidemia da AIDS e do surgimento de cepas de *Mtb* resistentes a múltiplas drogas, as medidas de controle necessitam ser ainda mais eficazes. Além disso, algumas populações específicas são mais suscetíveis à doença, como moradores de ruas, indivíduos confinados em presídios, pessoas imuno-deprimidas e grupos indígenas. Já citada anteriormente, a incidência de TB em ameríndios brasileiros é significativamente mais alta do que em populações não indígenas, inclusive àquelas que co-habitam a mesma região.

A TB é uma doença infecciosa multifatorial e com um forte componente genético, e neste sentido, o objetivo desta tese vem ao encontro dos muitos estudos que visam o melhor entendimento dos complicados mecanismos genéticos envolvidos na efetiva resposta imune à infecção com o bacilo. Para isso, nossos esforços foram direcionados para a busca de genes que poderiam estar influenciando na suscetibilidade à TB, ou a algum fenótipo a ela relacionado, em uma população da etnia Xavante da região Central do Brasil.

Os resultados obtidos nesta tese e o tipo de estudo realizado são inéditos em populações indígenas brasileiras, e fazem parte de um projeto multidisciplinar, envolvendo profissionais de diferentes áreas: antropologia, biologia, epidemiologia, medicina e nutrição.

As limitações para a realização efetiva e completa desse trabalho já foram descritas anteriormente. Entretanto, cabe uma discussão mais ampla sobre algumas das dificuldades

encontradas. Os Xavante de *Etêñitépa* (a aldeia visitada pela equipe), não vivem em completo isolamento geográfico, mas as condições de acesso à aldeia são complicadas, principalmente devido à não-pavimentação da estrada que dá acesso à aldeia. *Etêñitépa* está 40 km distante da BR-158, a cerca de duas horas da cidade mais próxima. No que diz respeito à amostra coletada, para fins estatísticos, essa pode não ter tido poder suficiente para verificar alguma associação genética mais robusta com a doença. Embora o número amostral de indivíduos com diagnóstico de TB possa parecer pequeno (41 indivíduos), não podemos deixar de levar em conta as altas taxas de incidência da doença neste grupo indígena e o grande risco de infecção pelo bacilo a que está sujeita essa população, uma vez que muitos indivíduos mostraram forte reação ao PPD (reação maior que 10 mm), ou seja, são considerados infectados pelo *Mtb*. Além disso, sabe-se que grupos indígenas brasileiros vivem em aldeias com não mais do que 500-600 pessoas, e nosso estudo conseguiu abranger a grande maioria dos indivíduos de *Etêñitépa* (quase 90% da população). A não-totalidade ocorreu devido aos critérios de exclusão (grávidas e crianças recém-nascidas) e aqueles indivíduos que estavam fora da aldeia por motivos não-relacionados à coleta.

Recorrentes aos estudos de associação genética com tuberculose já realizados, o delineamento e replicação dos trabalhos tornam-se grandes problemas. Somado a esse cenário tem-se a complexidade dos fatores genéticos nas doenças infecciosas e o envolvimento de muitos genes na etiologia da tuberculose. Ainda pode-se citar como dificuldades o conhecimento incompleto do sistema imune humano e seus complexos mecanismos de resposta, e a influência de fatores não-genéticos, como idade, estado nutricional do indivíduo, imunodepressão e interações com drogas imunossupressoras.

Discutem-se muito os resultados falso-positivos que podem ser obtidos nos estudos de associação do tipo caso-controle devido à estratificação populacional originada pelas

diferenças genéticas entre os diferentes grupos étnicos. Sabe-se também que diferenças étnicas teriam importante contribuição no desenvolvimento de TB ou da infecção latente (Prabhu Anand e cols., 2007). Um dos pontos positivos deste estudo, portanto, foi a escolha de um grupo étnico com ausência de miscigenação com afro e euro-descendentes. Os Xavante, principalmente o grupo aqui estudado, fazem questão de manter sua origem e organização social tradicionais.

Em relação aos resultados de resposta ao PPD, constata-se um grande número de indivíduos anérgicos em nossa amostra, corroborando outros estudos realizados em grupos indígenas brasileiros de diferentes etnias, como os Suruí e os Yanomami (Sousa e cols., 1997; Revisão em Coimbra e Basta, 2007). Isso pode estar indicando um sistema imune incapaz de desenvolver uma resposta adequada à infecção pelo bacilo. Pacientes com anergia ao PPD normalmente têm a TB nos estágios mais avançados da doença, do que aqueles pacientes com uma reação positiva ao PPD (Balikó e cols., 1998). Somada ao alto risco de infecção, a anergia ao PPD pode trazer algumas conseqüências, como por exemplo, a descoberta de casos de tuberculose somente em estágio avançado de TB. Esses fatores podem gerar uma série de complicadores sociais, como maiores taxas de mortalidade, maior tempo de hospitalização e maior custo e dificuldade de tratamento. Salientam-se ainda riscos maiores de reativação endógena da doença.

O teste do PPD é muito importante, porque seu resultado serve como informação relevante para a utilização da quimioprofilaxia e diagnóstico em áreas endêmicas de TB, principalmente em crianças. Então, o entendimento da anergia, sob os mais variados aspectos, é fundamental. Na literatura científica, há poucos estudos envolvendo genes que poderiam influenciar no fenótipo em questão – anergia. A grande maioria dos estudos publicados enfoca, principalmente, polimorfismos genéticos que modificam os níveis de expressão de algumas moléculas, como as citocinas. Tais estudos têm sugerido que essas

alterações dos níveis de expressão estariam relacionadas ao fenótipo anérgico. Esses trabalhos normalmente são realizados com amostras de pacientes com TB e ao mesmo tempo anérgicos ao PPD, diferenciando-os daqueles indivíduos considerados saudáveis, que têm contato com o bacilo (ou vacinados com o BCG), mas que não desenvolvem uma reação ao teste. A atenção voltada a esse último grupo é de suma importância para se desvendar os mecanismos que estariam atuando na infecção pelo *Mtb*.

Muitos genes estão envolvidos com a anergia ao PPD; um dos objetivos da presente tese foi este: determinar quais variantes genéticas poderiam estar influenciando na reação ao PPD, de maneira que este perfil genético pudesse ser utilizado na predição de fenótipos e no diagnóstico de tuberculose. Nossos resultados mostraram que genes que codificam citocinas do tipo Th2 (*IL4* e *IL10*) teriam um importante papel nos mecanismos imunes que produzem algum tipo de resposta à infecção por *Mtb*, corroborando estudos fisiológicos com essas citocinas (Balikó e cols., 1998; Montiel e cols., 2002).

Também se chama a atenção para a redução ou ausência de variabilidade observada para alguns genes importantes para a resposta imune contra o bacilo. Claramente há a necessidade de replicação do nosso estudo, principalmente em outras populações indígenas, para confirmar os resultados obtidos. Duas hipóteses podem ser mencionadas. Em um primeiro cenário teríamos uma população com um sistema imune restrito como já havia sido descrito para HLA (Black 1975, 1992). Já uma segunda hipótese está relacionada ao perfil Th1/Th2 na resposta imune. Diferentes citocinas induzem rotas que aumentam a expressão de alguns genes, que por sua vez irão determinar a diferenciação das células Th0 em células Th1 ou Th2. Em populações euro-descendentes nas quais a resposta imune foi estudada exaustivamente observou-se que recém-nascidos apresentam predominantemente uma resposta imune do tipo Th2 e esta se modifica para Th1, que passa a ser o tipo predominante em torno dos cinco anos de idade. Sugere-se então que

essa troca de Th2 para Th1 parece não ocorrer na infância em muitas populações não europeias que evoluíram em ambientes tropicais com altos níveis de infestações helmínticas e parasitárias (LeSouef e cols., 2000). Em parte este balanço a favor de uma resposta imune do tipo Th2 se deve a diferenças genéticas entre populações e hospedeiros. Conseqüentemente, ocorre uma redução na resposta imune do tipo Th1 (infeciosa) montada contra patógenos intracelulares, implicando em uma maior suscetibilidade às doenças virais e bacterianas (Hurtado e cols., 2004). Ainda não existe uma base genética forte que permita elucidar essas questões. Portanto, as hipóteses anteriormente mencionadas, juntamente com os resultados obtidos nesta tese e as altas taxas de anergia observadas, faz dos ameríndios brasileiros, e mais especificamente dos Xavante, um grupo único no mundo para este tipo de investigação.

No que diz respeito especificamente a este estudo realizado nos Xavante, algumas questões permanecem em aberto, como o não conhecimento sobre o nível de expressão das citocinas circulantes no plasma sanguíneo que estariam atuando na resposta imune direta contra a tuberculose nessa população. Estes dados poderiam ser associados com muitos polimorfismos genéticos. Entretanto, ocorreriam dificuldades na obtenção de amostras de sangue em indígenas, necessárias para estas análises. Ainda, é sugerida a utilização de outros tipos de antígeno (além do PPD), como antígenos de caxumba e *Candida albicans*, para verificar a hipersensibilidade do tipo tardia, determinando a especificidade da reação (Delgado e cols., 2002b).

Outro ponto importante a ser levantado é a resposta ao tratamento de tuberculose em ameríndios. No entanto, estudos farmacogenéticos com tuberculose em indígenas que vivem longe das cidades são difíceis de realizar, pelo fato da incerteza sobre o rígido seguimento do tratamento para a doença, que é longo e com alguns efeitos adversos importantes. Apesar disso, o conhecimento sobre as freqüências em genes de

metabolização de fármacos específicos para TB em populações indígenas é importante para a correta prescrição de medicamentos.

Além de contribuir para a avaliação do perfil genético do sistema imune, e mais especificamente, da tuberculose, em um grupo indígena brasileiro importante como os Xavante, esta tese chama a atenção para problemas ainda mais amplos, como a atenção básica dispensada a essas populações na área da saúde e a busca por tratamentos preventivos e profiláticos diferenciados para grupos étnicos específicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe T, Iinuma Y, Ando M, Yokoyama T, Yamamoto T, Nakashima K, Takagi N, Baba H, Hasegawa Y, Shimokata K (2003) NRAMP1 polymorphisms, susceptibility and clinical features of tuberculosis. *J Infect* 46:215-220.

Akahoshi M, Nakashima H, Miyake K, Inoue Y, Shimizu S, Tanaka Y, Okada K, Otsuka T, Harada M (2003) Influence of interleukin-12 receptor beta1 polymorphisms on tuberculosis. *Hum Genet* 112:237-243.

Amarante JM, Costa VLA (2000) A tuberculose nas comunidades indígenas brasileiras na virada do século. *Bol Pneumol Sanit* 8: 5-12.

American Thoracic Society (2000) Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 1376-1395.

Amim LH, Pacheco AG, Fonseca-Costa J, Loredó CS, Rabahi MF, Melo MH, Ribeiro FC, Mello FC, Oliveira MM, Lapa e Silva JR, Ottenhoff TH, Kritski AL, Santos AR (2008) Role of IFN-gamma +874 T/A single nucleotide polymorphism in the tuberculosis outcome among Brazilians subjects. *Mol Biol Rep* 35: 563-566.

Ates O, Musellim B, Ongen G, Topal-Sarikaya A (2008) Interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in tuberculosis. *J Clin Immunol* 28:232-236.

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: 521-522.

Balikó Z, Szereday L, Szekeres-Bartho J (1998) Th2 biased immune response in cases with active *Mycobacterium tuberculosis* infection and tuberculin anergy. *FEMS Immunol Med Microbiol* 22: 199-204.

Basta PC, Coimbra CE, Escobar AL, Santos RV (2004) Epidemiologic aspects of tuberculosis in the Suruí Indians, Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop* 37: 338-342.

Basta PC, Coimbra CE, Escobar AL, Santos RV, Alves LC, Fonseca LS (2006) Survey for tuberculosis in an indigenous population of Amazonia: the Suruí of Rondônia, Brazil. *Trans. R Soc Trop Med Hyg* 100: 579-585.

Bellamy R (2003) Susceptibility to mycobacterial infections: the importance of host genetics. *Genes Immun* 4: 4-11.

Bellamy R (2006) Genome-wide approaches to identifying genetic factors in host susceptibility to tuberculosis. *Microbes Infect* 8: 1119-1123.

Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam KP, Whittle HC, Hill AV (1998) Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. *N Engl J Med* 338: 640-644.

Bellamy R, Beyers N, McAdam KP, Ruwende C, Gie R, Samaai P, Bester D, Meyer M, Corrah T, Collin M, Camidge DR, Wilkinson D, Hoal-Van Helden E, Whittle HC, Amos W, van Helden P, Hill AV (2000) Genetic susceptibility to tuberculosis in Africans: a genome-wide scan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8005-8009.

Benévolo-de-Andrade TC, Monteiro-Maia R, Cosgrove C, Castello-Branco LR (2005) BCG Moreau Rio de Janeiro: an oral vaccine against tuberculosis--review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 459-465.

Berrington WR, Hawn TR (2007) *Mycobacterium tuberculosis*, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? *Immunol Rev* 219: 167-186.

Black FL (1975) Infectious diseases in primitive societies. *Science* 187: 515-518.

Black FL (1992) Why did they die? *Science* 258: 1739-1740.

Bornman L, Campbell SJ, Fielding K, Bah B, Sillah J, Gustafson P, Manneh K, Lisse I, Allen A, Sirugo G, Sylla A, Aaby P, McAdam KP, Bah-Sow O, Bennett S, Lienhardt C, Hill AV (2004) Vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in West Africa: a case-control and family study. *J Infect Dis* 190: 1631-1641.

Bottasso O, Bay ML, Besedovsky H, del Rey A (2007) The immuno-endocrine component in the pathogenesis of tuberculosis. *Scand J Immunol* 66: 166-175.

Boussiotis VA, Tsai EY, Yunis EJ, Thim S, Delgado JC, Dascher CC, Berezovskaya A, Rousset D, Reynes JM, Goldfeld AE (2000) IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *J Clin Invest* 105: 1317-1325.

Buchillet D (2000) Tuberculose, cultura e saúde pública. *Série Antropologia* 273, Brasília.

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: 142-150.

Casanova JL, Abel L (2002) Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol* 20: 581-620.

Coimbra CE, Basta PC (2007) The burden of tuberculosis in indigenous peoples in Amazonia, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101: 635-636.

Coimbra CE, Flowers NM, Salzano FM, Santos RV (2002) *The Xavante in Transition: health, ecology, and bioanthropology in Central Brazil*. Ann Arbor: University of Michigan Press.

Cooke GS, Siddiqui MR (2004) Host genetics and the dissection of mycobacterial immunity. *Clin Exp Immunol* 135: 9-11.

Cosma CL, Sherman DR, Ramakrishnan L (2003) The secret lives of the pathogenic mycobacteria. *Annu Rev Microbiol* 57: 641-676.

Delgado JC, Baena A, Thim S, Goldfeld AE (2002a) Ethnic-specific genetic associations with pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 186: 1463-1468.

Delgado JC, Tsai EY, Thim S, Baena A, Boussiotis VA, Reynes JM, Sath S, Grosjean P, Yunis EJ, Goldfeld AE (2002b) Antigen-specific and persistent tuberculin anergy in a cohort of pulmonary tuberculosis patients from rural Cambodia. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 7576-7581.

Escobar AL, Coimbra Jr CEA, Camacho LA, Portela MC (2001) Tuberculose em populações indígenas de Rondônia, Amazônia, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública* 17: 285-298.

Escobar AL, Coimbra CE, Camacho LA, Santos RV (2004) Tuberculin reactivity and tuberculosis epidemiology in the Pakaanóva (Wari') Indians of Rondônia, south-western Brazilian Amazon. *Int J Tuberc Lung Dis* 8: 45-51.

Etokebe GE, Bulat-Kardum L, Johansen MS, Knezevic J, Balen S, Matakovic-Mileusnic N, Matanic D, Flego V, Pavelic J, Beg-Zec Z, Dembic Z (2006) Interferon-gamma gene (T874A and G2109A) polymorphisms are associated with microscopy-positive tuberculosis. *Scand J Immunol* 63: 136-141.

Ferguson RG (1955) *Studies in tuberculosis*, Toronto. Univ Tor Press.

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. *Am J Respir Crit Care Med* 175: 360-366.

Ferraz JC, Melo FB, Albuquerque MF, Montenegro SM, Abath FG (2006) Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. *Braz J Med Biol Res* 39:1387-1397.

Flynn JL (2004) Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis* 84: 93-101.

Fortin A, Abel L, Casanova JL, Gros P (2007) Host genetics of mycobacterial diseases in mice and men: forward genetic studies of BCG-osis and tuberculosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 8: 163-92.

FUNASA (2002) Tuberculose – Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde.

Garnelo L, Macedo G, Brandão LC (2003) Os povos indígenas e a construção das políticas de saúde no Brasil. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde.

Goldfeld AE (2004) Genetic susceptibility to pulmonary tuberculosis in Cambodia. *Tuberculosis* 84: 76-81.

Gomez LM, Anaya JM, Martin J (2005) Genetic influence of PTPN22 R620W polymorphism in tuberculosis. *Hum. Immunol* 66: 1242-1247.

González N, De Cubeddu L, de Waard JH, Fandiño C, Fernández de Larrea C, López D, Maldonado A, Ocaña Y, Hernández E, Ortega R, Convit J, Pujol FH, Castés M, Araujo Z (2003) Study of immune response in Warao children from communities with high tuberculosis prevalence. *Invest Clin* 44: 303-318.

Greenberg JH (1987) *Language in the Americas*. Stanford: Stanford University Press.

Grosset J (2003) *Mycobacterium tuberculosis* in the extracellular compartment: an underestimated adversary. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 833-836.

Henao MI, Montes C, París SC, García LF (2006) Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. *Tuberculosis* 86: 11-19.

Hernandez C, Cetner AS, Jordan JE, Puangsuvan SN, Robinson JK (2008) Tuberculosis in the age of biologic therapy. *J Am Acad Dermatol* 59: 363-380.

Hill AV (2001) The genomics and genetics of human infectious disease susceptibility. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2: 373-400.

Howard AD, Zwillig BS (1999) Reactivation of tuberculosis is associated with a shift from type 1 to type 2 cytokines. *Clin Exp Immunol* 115: 428-434.

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: 134-150.

Hurtado AM, Hurtado I, Hill K (2004) Public health and adaptive immunity among natives of South America. In: Salzano FM & Hurtado AM (Eds.). *Lost Paradises and the Ethics of Research and Publication*. New York: Oxford University Press.

ISA – Instituto Socioambiental <http://www.socioambiental.org>

Kaufmann SH (2002) Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Ann Rheum Dis* 61: 54-58.

Kaufmann SH, Cole ST, Mizrahi V, Rubin E, Nathan C (2005) Mycobacterium tuberculosis and the host response. *J Exp Med* 201: 1693-1697.

Kidd P (2003) Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* 8: 223-246.

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.

Lapa e Silva JR, Boéchat N (2004) O ressurgimento da tuberculose e o impacto do estudo da imunopatogenia pulmonar. *J Bras Pneumol* 30: 478-484.

Le Souëf PN, Goldblatt J, Lynch NR (2000) Evolutionary adaptation of inflammatory immune responses in human beings. *Lancet* 356: 242-244.

Li CM, Campbell SJ, Kumararatne DS, Bellamy R, Ruwende C, McAdam KP, Hill AV, Lammas DA (2002) Association of a polymorphism in the P2X7 gene with tuberculosis in a Gambian population. *J Infect Dis* 186:1458-1462.

Lienhardt C, Azzurri A, Amedei A, Fielding K, Sillah J, Sow OY, Bah B, Benagiano M, Diallo A, Manetti R, Manneh K, Gustafson P, Bennett S, D'Elis MM, McAdam K, Del Prete G (2002) Active tuberculosis in Africa is associated with reduced Th1 and increased Th2 activity in vivo. *Eur J Immunol* 32:1605-1613.

Lio D, Marino V, Serauto A, Gioia V, Scola L, Crivello A, Forte GI, Colonna-Romano G, Candore G, Caruso C (2002) Genotype frequencies of the +874T-->A single nucleotide polymorphism in the first intron of the interferon-gamma gene in a sample of Sicilian patients affected by tuberculosis. *Eur J Immunogenet* 29: 371-374.

Liu J, Fujiwara TM, Buu NT, Sánchez FO, Cellier M, Paradis AJ, Frappier D, Skamene E, Gros P, Morgan K, Schurr E (1995) Identification of polymorphisms and sequence variants in the human homologue of the mouse natural resistance-associated macrophage protein gene. *Am J Hum Genet* 56: 845-853.

López-Maderuelo D, Arnalich F, Serantes R, González A, Codoceo R, Madero R, Vázquez JJ, Montiel C (2003) Interferon-gamma and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 167: 970-975.

Malik S, Abel L, Tooker H, Poon A, Simkin L, Girard M, Adams GJ, Starke JR, Smith KC, Graviss EA, Musser JM, Schurr E (2005) Alleles of the NRAMP1 gene are risk factors for pediatric tuberculosis disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 12183-12188.

MS (1999) Plano Nacional de Controle da Tuberculose. Brasília, Ministério da Saúde.

Montiel M, Rivera S, Hernández R, Hassanhi M, Villalobos C, Vargas F, Núñez J (2002) Immune response and anergy. Study in tuberculosis patients from the University Hospital, Maracaibo, Venezuela. *Acta Cient Venez* 53: 36-43.

Moreno O, González CI, Saaibi DL, Otero W, Badillo R, Martín J, Ramírez G (2007) Polymorphisms in the IL4 and IL4RA genes in Colombian patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 34: 36-42.

Neel JV, Andrade AH, Brown GE, Eveland WE, Goobar J, Sodeman WA, Stollerman GH, Weinstein ED, Wheeler AH (1968) Further studies of the Xavante Indians. IX. Immunologic status with respect to various diseases and organisms. *Am J Trop Med Hyg* 17: 486-498.

Neves JS (1984) A outra história da Companhia de Jesus 1 Vol. Vitória. Es. Santo.

Newport MJ, Nejentsev S (2004) Genetics of susceptibility to tuberculosis in humans. *Monaldi Arch Chest Dis* 61: 102-111.

Nicod LP (2007) Immunology of tuberculosis. *Swiss Med Wkly* 137: 357-362.

OMS (2006) Organização Mundial de Saúde. The Stop TB Department. WHO Report 2006. Global Tuberculosis Control – surveillance, planning, financing.

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: 135-138.

Raja A (2004) Immunology of tuberculosis. Indian J Med Res 120: 213-232.

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: 580-587.

Rodrigues AD (1986) Línguas brasileiras. Para o conhecimento das línguas indígenas. São Paulo: Loiola.

Rook GAW (1982) Importancia para La Union Internacional contra la Tuberculosis de ciertos progressos recientes em nuestra comprension de la inmunidad antimicrobiana mediada por células. Bol Union Int Tuber 58: 62.

Rosemberg J (2001) Mecanismo Imunitário da Tuberculose. Síntese e Atualização. Bol Pneumol Sanit 9: 35.

Rossouw M, Nel HJ, Cooke GS, van Helden PD, Hoal EG (2003) Association between tuberculosis and a polymorphic NFkappaB binding site in the interferon gamma gene. *Lancet* 361: 1871-1872.

Roth DE, Soto G, Arenas F, Bautista CT, Ortiz J, Rodriguez R, Cabrera L, Gilman RH (2004) Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and response to treatment of pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 190:920-927.

Ruffino-Neto A (2002) Tuberculose: A calamidade negligenciada. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 51-58.

Sahiratmadja E, Baak-Pablo R, de Visser AW, Alisjahbana B, Adnan I, van Crevel R, Marzuki S, van Dissel JT, Ottenhoff TH, van de Vosse E (2007) Association of polymorphisms in IL-12/IFN-gamma pathway genes with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Indonesia. *Tuberculosis* 87: 303-311.

Scola L, Crivello A, Marino V, Gioia V, Serauto A, Candore G, Colonna-Romano G, Caruso C, Lio D (2003) IL-10 and TNF-alpha polymorphisms in a sample of Sicilian patients affected by tuberculosis: implication for ageing and life span expectancy. *Mech Ageing Dev* 124: 569-572.

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.

Shin HD, Park BL, Kim YH, Cheong HS, Lee IH, Park SK (2005) Common interleukin 10 polymorphism associated with decreased risk of tuberculosis. *Exp Mol Med* 37: 128-132.

Singh V (2006) TB in developing countries: diagnosis and treatment. *Paediatr Respir Rev* 7: S132-S135.

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 USA* 94: 13227-13232.

Stein CM, Zalwango S, Chiunda AB, Millard C, Leontiev DV, Horvath AL, Cartier KC, Chervenak K, Boom WH, Elston RC, Mugerwa RD, Whalen CC, Iyengar SK (2007) Linkage and association analysis of candidate genes for TB and TNFalpha cytokine expression: evidence for association with IFNGR1, IL-10, and TNF receptor 1 genes. *Hum Genet* 121: 663-673.

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. *J Med Genet* 43: 32.

Tosh K, Campbell SJ, Fielding K, Sillah J, Bah B, Gustafson P, Manneh K, Lisse I, Sirugo G, Bennett S, Aaby P, McAdam KP, Bah-Sow O, Lienhardt C, Kramnik I, Hill AV (2006) Variants in the SP110 gene are associated with genetic susceptibility to tuberculosis in West Africa. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 10364-10368.

van Crevel R, van Doorninck DJ, van Ams JE, Fat HT, Vreden SG, van der Meer JM (2004) Tuberculosis among Trio-Indians in Surinam. *Ned Tijdschr Geneesk* 148: 425-429.

Vidyarani M, Selvaraj P, Prabhu Anand S, Jawahar MS, Adhilakshmi AR, Narayanan PR (2006) Interferon gamma (IFN γ) & interleukin-4 (IL-4) gene variants & cytokine levels in pulmonary tuberculosis. *Indian J Med Res* 124: 403-410.

Wilbur AK, Kubatko LS, Hurtado AM, Hill KR, Stone AC (2007) Vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility *M. tuberculosis* in native Paraguayans. *Tuberculosis* 87: 329-337.

Wilkinson RJ, Llewelyn M, Toossi Z, Patel P, Pasvol G, Lalvani A, Wright D, Latif M, Davidson RN (2000) Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study. *Lancet* 355: 618-621.

Yilmaz M, Bingöl G, Altıntaş D, Kendirli SG (2000) Correlation between atopic diseases and tuberculin responses. *Allergy* 55: 664-667.

Zhang W, Shao L, Weng X, Hu Z, Jin A, Chen S, Pang M, Chen ZW (2005) Variants of the natural resistance-associated macrophage protein 1 gene (NRAMP1) are associated with severe forms of pulmonary tuberculosis. *Clin Infect Dis* 40: 1232-1236.

ANEXO
