UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

ESCUELA DE POSTGRADO

Programa de Doctorado en Ciencias Ambientales

Binomio Quitina-Quitinazas

en poblaciones nativas andino-amazónicas del Perú,

2008-2013

AUTOR: Ms. NICOLA MANNO
ASESOR UNT: Dr. JOSÉ MOSTACERO LEÓN
ASESOR UNIPD: Dr. MARIA LUISA MOSTACCIUOLO

TRUJILLO – PERÚ
2013

Estudio doctoral en co-asesoramiento con la **Scuola di Dottorato in Bioscienze e Biotecnologie de la UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA (UNIPD)** en el marco del convenio vigente entre las Escuelas de Post Lauream de la UNIPD y la Escuela de Postgrado en Ciencias Biologicas y Ciencias Ambientales de la Universidad nacional de Trujillo (UNT).

DATOS PERSONALES

NOMBRE : Nicola Manno

DIRECCIÓN : Via Guardi 39, 35100, Padova, Italia / Calle Crystal, Mz. E, Lt.8, San Isìdro, Trujillo, Perù

TELÉFONO: 0039 - 3491267909 (Italia)

CORREO ELECTRÓNICO: nicolamanno@bio.unipd.it

DEDICATORIA

A Elena, Rocco y a mis más queridos familiares y amigos.

A todos los que se sienten nativos en todo el Mundo
y que quieren que todos puedan preservar lo nativo
de su propio lugar.

A la Naturaleza, la buena y la mala;
la que podemos aprovechar,
y la que no alcanzamos entender.

AGRADECIMIENTOS

A José Mostacero León, Freddy Mejía Coico y a sus familias, Maria L. Mostacciuolo, Maurizio G. Paoletti, Andrea Battisti, Franco H. Falcone, Cesar Jara Campos, Giovanni Vazza, Carlos León Torres, Carlos Quijano Jara, Carolina Espinosa Camus, Fátima Zavala De la Cruz, Federico Rizo-Patrón, José Luis Portocarrero, Cinzia Bertolin, Francesca Boaretto, Marzia De Bortoli, Elisa Gregianin, Giorgia Bergamin, Silvia Fusaro, Federico Gavinelli, Matteo Simonetti e Domenico Cieri.

A los amigos que han compartido su comida y sus… conocimientos ancestrales en las comunidades nativas andino-amazónicas del Perú.

ÍNDICE

Pagina

Resumen

Riassunto (italiano)

Abstract (ingles)

1.0. INTRODUCCION …….…….. **15**

2.0. MATERIAL Y METODOS …….. **19**

Pueblos indígenas

2.1. Estudio etnobiológico ……. **21**

Análisis de Ácidos Grasos

2.2. Estudio parasitológico …… **24**

2.2.1. Análisis copro-parasitológico

2.2.2. Estudio parasitológico comparativo

Análisis Bio-estadística Multivariada

2.3. Estudio de los genes de las Quitinazas ……... **28**

2.3.1. Muestreo de ADN

Asuntos éticos

2.3.2. Análisis Genéticos

2.3.2.1. *Chitotriosidase*

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Primers

Electroforesis

Secuenciamiento

2.3.2.2. *Acidic Mammalian Chitinase*

Variantes funcionales no-sinónimas

Genotipización completa de CHIA

Restricción enzimática

2.3.2.3. Elaboración estadística de los datos genéticos

Equilibrio de Hardy-Weinberg

Comparación Casos-Controles

Base de datos de Genética Poblacional

Índice de Fijación

3.0. RESULTADOS …….…….…….…….…… **37**

3.1. Dieta tradicional

Artrópodos comestibles

Composición en Ácidos Grasos

3.2. Condición entero parasitológica de los nativos 42

3.2.1. Parásitos del sistema gastrointestinal

3.2.2. Distribución y diversidad de parásitos contenientes quitina

3.3. Estudio genético 45

3.3.1. *Chitotriosidase*

3.3.2. *Acidic Mammalian Chitinase*

Variantes funcionales del exón 4

Haplotipos de CHIA

3.3.3. Variabilidad de *CHIA* en el hombre

4.0. DISCUSION

Quitina y dieta

Interacción con parásitos contenientes quitina

Chitotriosidase: elevada frecuencia de la variante inactiva

Acidic Mammalian Chitinase: posible presión selectiva?

5.0. PROPUESTA 59

6.0. CONCLUSIONES 60

7.0. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 61

ANEXOS

RESUMO

El siguiente estudio ha logrado describir, en 5 poblaciones nativas del Perú, la variabilidad de los genes de las Quitinazas en relación a los principales factores de exposición a la quitina: la dieta y las entero-parasitosis. Los nativos consumen alimentos quitinosos y, sobre todo para los Amazónicos, los artrópodos representan la principal fuente de proteínas en la época de lluvia. También la prevalencia de enteroparasitosis ha resultado muy elevada en las comunidades estudiadas (nematodos 35-43%, protozoarios 35-61% e *Hymenolepis nana* 3-29%, único platelminto encontrado). Sin embargo, el análisis de la distribución de parásitos en diferentes contextos mundiales, mediante análisis de similitud y distancia, ha permitido evidenciar que los Amerindios destacan de las demás poblaciones mundiales por tener alta prevalencia de nematodos y por no tener trematodos, *Taenia*, y filarias.

A nivel genético las quitinazas presentan elevadas frecuencias de variantes no funcionales. En el gen *CHIT1*, la duplicación de 24 bp (que codifica una proteína inactiva) tiene la segunda frecuencia mas alta a nivel mundial (47,06%); en *CHIA* se conserva el haplotipo funcional que es el tipo silvestre en los humanos, que se sabe codificar por una enzima poco activa a nivel de estomago y pulmones.

Al mismo tiempo, muchos polimorfismos (promotor, 5'UTR y exonicas) muy variables en los humanos (ENSEMBL), se presentan en estado de fijación en los Amerindios. Destaca la distribución mundial de la variante no-sinónima re2275254 (exon 11), que tiene elevadas frecuencias en las poblaciones de África tropical y en los Amerindios de Perú, y bajas en Europeos y Asiáticos, y parece relacionada a la distribución de los determinantes climático-ambientales de la distribución de parásitos.

En conclusión resulta evidente que las Quitinazas tengan una reducida funcionalidad a nivel catalítico, pero una selección positiva reciente puede haber actuado en el gen *CHIA*. De hecho, en precedentes estudios, las variantes funcionales (exones 10, 11 y 12) han sido asociadas a fenotipos asmáticos, lo que sugeriría ulteriores conexiones entre la co-evolución entre hombre y helmintos, la funcionalidad de *Acidic Mammalian Chitinase* y síndromes atópicas.

RIASSUNTO

La chitina è un polisaccaride-azotato insolubile presente in strutture di patogeni dell'Uomo e in alimenti come artropodi e funghi (Muzzarelli et al., 2011). Gli esseri umani hanno due chitinasi enzimaticamente attive, codificate da due geni paraloghi: Chitotriosidasi (CHIT, gene CHIT1) e *Acidic Mammalian Chitinase* (AMCase, gene CHIA). CHIT ha massima attività enzimatica a pH 6, si esprime nei macrofagi, ed è sovra-espressa durante infezione malarica, pertanto prende parte alla risposta immunitaria innata (Musumeci et al., 2005). È interessante notare che la deficienza enzimatica di CHIT1 (dovuta ad una duplicazione di 24 bp sull'esone 10 di CHIT1) è frequente in molte popolazioni umane, e assente negli altri primati (Gianfrancesco & Musumeci, 2004), suggerendo che la funzione chitinolitica, per questa chitinasi, potrebbe essere ridondante nell'uomo (Piras et al., 2007). AMCase è espressa prevalentemente in cellule epiteliali, e sovra-espressa in macrofagi specializzati attivati durante risposte immunitarie umorali Th2 (T-*helper* di tipo 2) a infezioni da elminti parassiti e durante risposte asmatiche a particelle di chitina, suggerendo che AMCase mantiene la funzione immunologica e prende parte a disturbi del sistema immunitario come atopie ed asma (Reese et al., 2007). AMCase si esprime anche nello stomaco, ma non nel duodeno e nell'intestino (Boot et al, 2005). Infine, esercita attività enzimatica a pH 2 , 4.6 e 7, caratteristici di stomaco, lisosomi e polmoni, rispettivamente (Seibold et al, 2009), difatti le secrezioni gastriche umane esercitano attività chitinolitica dovuta a AMCase (Paoletti et al, 2007; Cozzarini et al, 2009).

Obbiettivi

Studiare il binomio chitina-chitinasi in comunità native dell'Amazonia e Ande del Perú, che vivono in condizioni di elevata esposizione a chitina ambientale, rispetto a un gruppo controllo di popolazione urbanizzata. Descrivere due dei principali fattori di esposizione alla chitina: la dieta e gli elminti. Con un approccio evoluzionistico e il supporto di differenti strumenti bioinformatici, verranno discusse le possibili correlazioni tra la variabilità genetica delle chitinasi e la diffusione di parassiti intestinali e distubi associati alle chitinasi, nelle popolazioni mondiali.

Metodi

Studio etnobiologico descrittivo della dieta tradizionale, soprattutto di insetti e crostacei. Analisi copro-parassitologica per individuazione e determinazione di uova/oocisti/larve in 76 amerindi di origine *Awajun*, *Ashaninka* e *Shipibo*. Analisi statistica di similarità–distanza tra gli Amerindi e casi studio in diverse popolazioni mondiali, in base alla prevalenza di parassiti contenenti chitina (database GIDEON).

Genotipizzazione della duplicazione *CHIT1* mediante sequenziamento e elettroforesi, in 85 Amerindi e 50 controlli urbanizzati. Sequenziamento del promotore e esone 4 di *CHIA* (75 Amerindi, e 39 controlli, rispettivemente). Restrizione enzimatica per genetipizzare la variante nota sull'esone 12, in parte del campione. Studio della variabilitá del gene *CHIA* in 14 popolazioni (database ENSEMBL).

Risultati

I dati etnobiologici hanno confermato, in *Awajún*, *Ashaninka*, *Quechua-Lamas,* una alimentazione basata sulla biodiversità selvatica, tra cui il consumo giornaliero di insetti, crostacei e funghi; gli *Shipibo* che vivono a Lima hanno confermato abitudini alimentari tradizionali e consumo di artropodi prima di migrare; i *Quechua* del Cusco (3000-4000 mslm), consumano saltuariamente larve di coleottero e bruchi. Nelle tre popolazioni interessate dalle analisi parassitologiche (*Awajun, Ashaninka e Shipibo*), è stata accertata un'elevata prevalenza di enteroparassiti: 35-43% per i nematodi, 35-61% per i protozoi e 3-29% per *Hymenolepis nana* (l'unico platyhelminto riscontraro). I parassiti contenenti chitina più frequenti nella popolazione campione erano i protozoi *Giardia lamblia, Entamoeba histolitica*, e i macro-parassiti *Ancylostoma/Necator*, *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Trichiuris trichura* e *Hymenolepis nana*. Diversamente, la popolazione di controllo di peruviani urbanizzati presenta abitudini alimentari occidentalizzate e una bassa prevalenza di elminti intestinali (2-12%).

L'analisi comparativa della distribuzione di enteroparassiti in popolazioni umane ha dimostrato che gli Amerindi sono esposti a una gamma ridotta di elminti contenenti chitina, e che le specie istozoiche più severe (trematodi, *Taenia* e filarie) sono assenti in popolazioni dell'Amazzonia peruviana (Ibanez et al., 2004), e nalla banca dati on-line GIDEON.

La duplicazione 24 bp che causa la deficienza enzimatica in *Chitotriosidasi* risultata altamente conservata, con una frequenza di 47.06% negli Amerindi, e 27,55%

nei peruviani. Questa frequenza è la seconda più alta al mondo, dopo la popolazione cinese Han (Choi et al., 2001). Le frequenze genotipiche rispettano l'Equilibrio di Hardy Weinberg nelle singole popolazioni, nella popolazione totale ($X^2 = 0.006$, $p = 0,939$), escludendo la presenza di pressione selettiva per questo allele. Nel gruppo di controllo è stato riscontrato il maggior discostamento dai valori attesi ($p = 0,091$; significativo con $p < 0,05$).

L'esone 4 di *CHIA* codifica il dominio catalitico: 3 SNP (A290G, G296A, G339T) sono noti per ridurre l'attività enzimatica a differenti pH. L' aplotipo "AGG", wild-type (WT) negli umani, è conservato anche negli Amerindiani peruviani con una frequenza del 96 % e un alto grado di omologia e omozigosi. Dalla sequenza WT negli Amerindi, sono emerse numerose sostituzioni in loci molto variabili nelle popolazioni umane. In base al confronto con l'allele ancestrale, alla distribuzione delle frequenze alleliche e l'Fst per coppie di polazioni, numerosi polimorfismi a livello del promotore e 5'UTR, e tre varianti non-sinonime (rs2275253, esone 10; re2275254, esone 11; rs2256721, esone 12), risultano fissate nelle popolazioni amerindiane.

Discussione

Gli studi etnobiologico e parassitologico hanno accertato uno stile di vita tradizionale, fortemente influenzato da fattori ambientali e, in particolare, da un'elevata prevalenza di macroparassiti contenenti chitina e da un intenso consumo di invertebrati selvatici. Tuttavia gli amerindi non conoscono numerose specie di parassiti istozoici: trematodi (*Schistosoma* e *Fasciola*), *Taenia*, e delle filarie, che non sono enteroparassiti, hanno cicli biologici complessi e possono produrre granulomi e fibrosi in diversi organi (fegato, cervello, sistema linfatico, muscoli) (Jackson et al., 2009; Anthony et al, 2007).

Anche se i dati raccolti non permettono di realizzare analisi di correlazione tra genotipi e infezioni parassitarie, la deficienza enzimatica di Chitotriosidasi è assolutamente elevata e maggiore rispetto alla popolazione peruviana. Possiamo quindi dedurre che gli enteroparassiti riscontrati non esercitino pressione selettiva in favore di una Chitotriosidasi funzionale, nel nostro campione. Possiamo anche escludere che la Chitotriosidasi funzionale (WT freq.: 72,45%) sià più frequente nella popolazione di controllo in risposta agli enteroparassiti, che sono meno frequenti in aree urbane. Più probabilmente, la migrazione di Europei e Africani dopo la conquista può aver determinato alte frequenze del allele WT nei peruviani non-etnici e in altri paesi centro e sud americani come Messico (76%)(Juárez-Rendón et al., 2012) e

Brasile (74%)(Adelino et al., 2010). Questa "mutazione" è assente nei primati e in molte popolazioni africane (Benin: 0%; Burkina Faso: 0,2%) (Piras et al., 2007), mentre mostra le frequenze più alte nelle popolazioni asiatiche: Cinese Han (58%) (Chien et al, 2005); India 40% (Choi et al., 2001), suggerendo che questa variante sia emersa dopo la migrazione dell'uomo dal continente africano (Piras et al., 2007). Consideranto che i primi abitanti del Nuovo Mondo provennero da popolazioni dell'estremo est-asiatico tra 6 e 30 KY anni fa, è plausibile che le alte frequenze della mutazione (>40%) siano dovute all'effetto del fondatore, e potrebbero dunque essere conservate in tutte le popolazioni indigene del Sud America.

Il gene *CHIA* (esoni e promotore 1000 bp dal 5'UTR) presentano un aplotipo specifico, con molti loci che presentano alta frequenza dell'allele derivato (95%), raro negli Africani e negli Europei (<30%), quindi candidati come loci interessati da pressione selettiva. Tali varianti sono localizzate nella regione del promotore e negli ultimi tre esoni (10, 11 e 12), influenzando la funzionalità del sito de legame. E' rilevante notare che le tre varianti non-sinonime sono associate a fenotipi asmatici Th2 in Centroamericani ed Europei, suggerendo ulteriori legami tra la co-evoluzione uomo-elminti, la funzionalità di AMCase e disordini immunologici. Si può pertanto ipotizzare che negli Amerindiani sia avvenuta una riqualificazione funzionale che coinvolge l'espressione genica e il sito di legame. Solo il polimorfismo re2275254 (T1218C, Phe354Ser), esone 11, ha alte frequenze dell'allele ancestrale sia in Africa tropicale che in Sud America, e frequenze più basse nelle regioni temperate di Asia ed Europa, che è un cline rilevante di distribuzione geografica per un allele funzionale (Coop et al., 2009), associato alla variazione latitudinale dei principali fattori ambientali, che influenzano la distribuzione dei parassiti.

ABSTRACT

Chitin is the second most abundant structural biopolymer, present in human pathogens and in human foods, such as arthropods and fungi (Muzzarelli et al., 2012). Humans have two enzymatically active Chitinases, coded by 2 paralogous genes: *Chitotriosidase* (CHIT, gene *CHIT1*) and *Acidic Mammalian Chitinase* (AMCase, gene *CHIA*). CHIT has an optimum pH of 6 and is expressed in macrophages and found prestored in neutrophil granules, and over-expressed during malaria infection, so takes part to innate immunity (Musumeci & Paoletti, 2009). Interestingly, the enzymatic deficiency of CHIT (due to a 24-bp duplication on *CHIT1* exon 10, named Allele H) is frequent in many human populations (Gianfrancesco & Musumeci, 2004), suggesting that chitinolytic function could be redundant for this Chitinase (Piras et al., 2007).

AMCase is expressed mainly in epithelial cells, and over-expressed in alternatively activated macrophages, during Th2 (*T-helper type 2*) humoral responses to helminth parasites and during asthmatic responses to chitin particles, suggesting that AMCase maintains the immunologic function and take part to immune disorders (Reese et al., 2007). AMCase is also expressed in stomach, but not in duodenum and gut (Boot et al., 2005), and showed chitinolytic activity in human gastric secretions (Paoletti et al., 2007). Indeed, this enzyme exerts enzymatic activity at different pH levels: pH 2, 4.6 and 7, characteristic of stomach, lysosomes and lung respectively (Seibold et al., 2009). Three non-synonymous SNPs on *CHIA* exon 4 are known to cause three amino-acidic changes in proximity of the catalytic-domain, so to directly influence the pH specificity of the isoforms (Olland et al., 2009).

This PhD study investigates Chitinase functional variants in 5 Amerindian populations of Peruvian Amazon and Andes, respect to the main environmental factors of chitin exposure: the indigenous diet, specifically the consumption of arthropods, and intestinal parasites.

Methods

Ethnobiological descriptive study of the traditional diet, especially insects and crustaceans. Copro-parasitological analysis, for eggs/oocysts/larvas detection and

determination, of 76 Amerindians from 3 communities of *Awajún*, *Ashaninka* and *Shipibo* peoples. Difference-similarity statistical analysis between Peruvian Amerindians and world-wide human populations, based on the distribution of chitin-containing parasites (GIDEON database).

Genotyping of *CHIT1* duplication by sequencing and electrophoresis, from 85 Amerindians and 50 urbanized controls, see Piras (2007). To sequence *CHIA* gene in 9 Amerindians, and promoter region and exon 4 in a sample of 75 Amerindians and 29-39 controls, respectively. Enzymatic restriction for the detection of the known variant on exon 12. Analysis of human diversity of *CHIA* gene based on 14 populations (ENSEMBL database).

Results

Chitin exposure was assessed in relation to the main environmental factors: arthropods-based diet (species) and high enteroparasites' prevalence. Ethnobiological data confirmed traditional dietary habits: in *Awajún*, *Ashaninka*, *Quechua-Lamas* was observed an alimentation based on wild biodiversity, including daily consumption of insects, crustaceans and fungi. Also *Shipibo* people confirmed inset consumption and other traditional dietary habits before migrating to Lima. In the three populations interested by parasitological analysis was assessed a high prevalence of enteroparasites: 35-43% for nematodes, 35-61% for protozoans and 3-29% for *Hymenolepis nana*. The main chitin-containing parasites found in this sample population were the protozoan *Giardia lamblia, Entamoeba histolitica*; and the macro-parasites *Ancylostoma/Necator*, *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis, Trichiuris trichura* and *Hymenolepis nana*. Differently, westernized food habits and lower parasite prevalence (2-12%) characterize the control population of urbanized Peruvians.

The comparative analysis of enteroparasites' distribution in human populations showed that Amerindians are exposed to a reduced pattern of chitin containing macro-parasites, and the most severe ones (trematodes and filarial nematodes) are absent in rural andean-amazonic Peru, as confirmed in other studies conducted in Peruvian Amazon (Ibanez et al., 2004; GIDEON database).

The 24-bp duplication causing catalytic deficiency resulted highly conserved, with a frequency of 47.06% in the whole Amerindian sample, and 27.55% in Peruvian controls. This frequency rate is the second highest worldwide, after Chinese Han population (Choi et al., 2001; Piras et al., 2007). Genotypic frequencies were consistent with the Hardy Weinberg Equilibrium, within each indigenous population and in

total Amerindians (X^2= 0.006; p = 0.939), excluding the presence of selective pressure on this allele. Peruvian control population has the highest, even not significant, deviation from expected values (p = 0.091).

CHIA exon 4 encodes for the catalytic domain of Acidic Mammalian Chitinase, and 3 SNPs (A290G, G296A, G339T) are known to determine pH optimum of enzymatic activity. The "AGG" haplotype, wild-type in Humans, is conserved in Peruvian Amerindians, with a frequency of 96% and a high degree of homology and homozygosis within and among the five populations. Is known that this isoform maintains the enzymatic activity at lysosomes' pH of 4.6, but at stomach pH (2), and lung pH (7), it is respectively reduced and ablated (Seibold et al., 2009).

From the analysis of the entire gene sequence, by considering the allelic frequency distribution and Fst between pairs of populations, emerged several relevant polymorphisms, rare in humans and fixed in Amerindians. Variants rs12023321, rs35042265, rs4554721, rs4442363, rs11102235, rs34698010, rs12026825, rs2275253 (exon 10), rs2256721 (exon 12), presenting high frequencies of the derived allele (93-95%), and rs12033184, rs4546919, re2275254 (exon 11), presenting the ancestral allele.

Discussion

Both ethnobiological and parasitological studies gave evidences of a conserved traditional lifestyle, strongly influenced by environmental factors and, specifically, by high exposure to chitin-containing parasites (especially helminths) and unconventional foods, including chitinous invertebrates. However parasite diversity showed that Amerindians do not suffer parasitoses from histozoic species like trematods (*Schistosoma* and *Fasciola*), *Taenia* sp., and filarial nematodes, that have complex lifecycles inducing granulomas and fibrosis in different human organs (liver, brain, lymphatic system etc.) (Jackson et al., 2009; Anthony et al., 2007).

Even if no correlation analysis between Chitinases' genotype and parasite infection is possible with present data, Chitotriosidase inactive variant is absolutely high and higher respect to controls, thus we can deduce that the reduced pattern of chitin-containing enteroparasites isn't acting any selective pressure for the functional Chitotriosidase, in our sample. We can also exclude that the functional variant is conserved in control population (WT freq: 73%) because of enteroparasites' pressure, which are scarce in urban areas. Rather, mixing with Europeans and Africans during last centuries may have determined high WT frequencies in non-ethnic Peruvians. The inactive variant is absent in non-human primates, and in most African populations,

and Asiatic populations - Chinese Han (58%) (Chien et al., 2005) y India (40%) (Choi et al., 2001) – have the highest frequencies, suggesting that this "mutation" occurred after human migration out of Africa (Piras et al., 2007). Considering that first inhabitants of New World descend from eastern-Asia populations, is it plausible that the duplication is highly conserved for a founder effect in all South American Amerindians.

The *CHIA* coding sequence and promoter present a specific haplotype, with many *loci* with high frequency of the derived allele (93-96%), most rare in Africans and Europeans (<30%), so candidates for positive selection. Such variants are localized in promoter region and in the last three exons (10, 11 and 12), coding for the chitin-binding domain, therefore a functional reorganization involving gene expression and chitin-binding site is probable in South Amerindians. Intriguingly, these three non-synonymous variants are associated with Th2 asthmatic phenotypes in Central Americans and Europeans, suggesting further links between man-helminths co-evolution, AMCase functionality and immunologic disorders (Anthony et al., 2007). Only the polymorphism re2275254 (T1218C, Phe354Ser), on exon 11, presented high frequencies of the ancestral allele in tropical Africa and South America, and lower frequencies in temperate regions of Asia and Europe. This is a relevant feature of geographic distribution for functional alleles (Coop et al., 2009), evidently associated to the latitudinal variation of parasites' distribution.

1.0. INTRODUCCION

Quitina y Quitinazas humanas

La quitina es el biopolímero más abundante en el planeta después de la celulosa. Por ser insoluble en agua, desempeña una función estructural en artrópodos y hongos comestibles, y en muchos organismos eucariotas patógenos para el Hombre (Muzzarelli et al, 2011.). Se encuentra en la pared de quistes de protozoarios intestinales, en huevos o piezas bucales de parásitos pluricelulares muy comunes (*Necator americanus*, *Ascaris* y *Taenia*) y en la pared de hongos patógenos (Boot et al., 2001). Al mismo tiempo, es el componente principal del exoesqueleto de los artrópodos, que son consumidos cotidianamente por muchas poblaciones del planeta. De hecho son más de 2000 las especies de insectos comestibles (FAO, 2013), especialmente en culturas locales de regiones tropicales como la Amazonía (Posey, 1984; Bennett et al., 2002; Paoletti, 2005). Sin embargo partículas de quitina inaladas o ingerida como parte de alimentos pueden producir reacciones alérgicas (Burton y Zaccone, 2007).

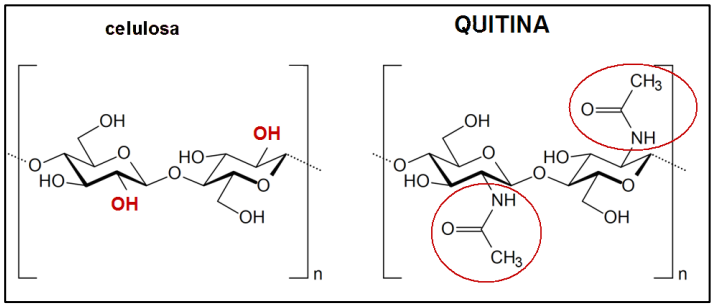


Figura 1. Estructura del polímero de celulosa y de quitina, evidenciado el grupo acetilico.

La presencia de enzimas con actividad quitinolítica en el ser humano se conoce desde poco más de una década, y se ha observado en la saliva (Van Steijn et al., 1999), en los jugos gástricos (Boot et al., 2001) y en la sangre (Fusetti et al., 2002). Las quitinazas activas enzimáticamente son dos, codificadas por dos genes paralogos localizados en el cromosoma 1: *Chitotriosidase* (*CHIT1*) y *Acidic Mammalian Chitinase* (Quitinaza Acida de Mamíferos) (*AMCase*/*CHIA*).

La enzima *Chitotriosidase* (CHIT) tiene un pH óptimo de 6, es activa en los macrófagos y sobre-expresado durante infecciones agudas de malaria; por lo tanto participa en la respuesta inmunitaria innata (Musumeci y Paoletti, 2009). Notablemente, la deficiencia enzimática de CHIT (debida a una duplicación de 24 bp en el exón 10, denominada Alelo H), es frecuente en muchas poblaciones humanas

excepto en los Africanos (Piras et al., 2007), por lo cual fue hipotetizado que la función quitinolítica de este quitinaza pueda ser redundante en las poblaciones que han migrado a regiones temperadas y se han adaptado a menor exposición a quitina por la dieta y los parásitos (Musumeci y Paoletti, 2009).

El gen *CHIA* (o *AMCase*) se expresa en los órganos directamente expuestos a contaminación ambiental directa: el estomago, el epitelio pulmonar y los ojos, pero ni en el duodeno ni en el intestino ha sido detectada su presencia (Boot et al., 2005.). Notablemente, AMCase es expresada por los "macrófagos activados alterativos" durante respuestas inmunitarias humorales de tipo *T-helper type 2* (Th2) contra helmintos (Nair et al., 2005, 2006), y durante respuestas inflamatorias inducidas por partículas de quitina y por otras alérgenas (Reese et al., 2007).

Las secreciones gástricas humanas mostran actividad quitinolítica debida al AMCase (Paoletti et al, 2007; Cozzarini et al, 2009). Por eso fue hipotetizado que la capacidad de digerir este polisacárido de nitrógeno podría tener una función adaptativa estratégica en muchas poblaciones humanas que consuman insectos, como los nativos amazónicos (Paoletti y Dufour, 2005). Especificadamente, AMCase ejerce actividad catalítica a pH 2, pH 4,6 y pH 7, en el estómago, lisosomas y pulmones, respectivamente (Seibold et al., 2009.). Diferentes publicaciones han identificado en el exón 4, que codifica el dominio catalítico, tres variantes genéticas funcionales que causan tres cambios de amino-ácidos determinando el pH óptimo de la actividad enzimática (Olland et al., 2009; Seibold et al., 2009). Cabe destacar, que el haplotipo "AGG" de baja funcionalidad representa el tipo silvestre (*wild-type*) en la mayoría de las poblaciones humanas (Seibold et al., 2009). Contrariamente, el haplotipo ancestral "GAT" por los mismos *loci*, codifica una isoforma con mayor actividad enzimática a pH 2, que es parcialmente conservada casi exclusivamente en los Africanos (≈ 30%) y muestra baja frecuencia (< 12,5 %) en los Centro Americanos (Seibold et al., 2009).

Área de estudio

La Amazonía peruana es una de las áreas de mayor biodiversidad del planeta y también la diversidad cultural humana sigue siendo preservada en muchas áreas de la Amazonía occidental (Mostacero et al., 2002). Muchas especies de artrópodos son consumidas por diferentes grupos étnicos; por ejemplo, los *Awajún* que habitan la Ceja de Selva, Bosque montano pluvial, consuman frecuentemente: larvas de

coleóptero *"suri"* (*Rhynchophorus palmarum*), hormiga *"mamaco"* (*Atta cephalotes*), camarones (*Macrobrachium* sp.) y cangrejos (*Hypolobocera* sp.) (Guallart 1964; Berlin et al., 1977,1979a,1979b; Carbonell y D'Arrigo, 1997; Roche et al., 2007). Estos recursos constituyen un 6% de las proteínas consumidas en muchas comunidades rurales de la selva peruana (Dourojeanni, 1986), y el *suri* representa la principal fuente animal de hierro para los niños *Awajún* (Huaman-Espino, 2006; Roche *et al.*, 2007). Además de ser una valiosa fuente de proteínas, ácidos grasos poliinsaturadas y minerales, los artrópodos están constituidos por una parte significativa de quitina, principalmente en el exoesqueleto (Musumeci & Paoletti, 2009).

De igual manera, la prevalencia de parásitos intestinales de la población nativa de la Amazonía peruana es muy elevada: el 72,4% de la población infantil *Awajún* del Departamento de Amazonas tiene parásitos: *Entamoeba coli* (68%), *Blastocystis hominis* (28,4%), *Ancylostoma/Necator* (30,4%) (Ibáñez et al., 2004; 2008). La exposición a helmintos intestinales causa una exposición prolongada a quitina debida a las infecciones crónicas en el tracto gastrointestinal y en otros órganos, en presencia de larvas migrantes (Anthony et al., 2007; Jackson et al., 2009).

Muchos estudios genéticos del tipo caso-control en áreas rurales han permitido de entender más el papel y la evolución de estos genes en los humanos, como también estudios en poblaciones aisladas ha llamado el interés de científicos hacia las poblaciones Amazónicas (Hurtado et al., 2003).

Objetivo general

Estudiar el binomio quitina-quitinazas en comunidades nativas de la Amazonía y Sierra de Perú que viven en condiciones de elevada exposición a quitina natural, y en controles urbanizados. Describir y cuantificar dos de los principales factores de exposición a la quitina: la dieta y las enteroparasitosis, y determinar posibles correlaciones entre los la variabilidad genética de las quitinazas y la difusión de parasitosis o de enfermedades causadas por la quitina. Por medio de un enfoque evolucionista y diferentes instrumentos bioinformáticas, se realizará comparaciones a nivel poblacional mundial.

Objetivos específicos

- Describir el consumo alimentar de artrópodos, especialmente insectos y crustáceos y caracterizar la composición de Ácidos Grasos de los insectos más relevantes en la dieta de los Amerindios peruanos.
- Evaluar la prevalencia de enteroparasitosis en las poblaciones peruanas y comparar la distribución de los entero-parásitos, especialmente helmintos, contenientes quitina en las poblaciones mundiales.
- Estudiar los genes de las quitinazas y, de particular manera, la presencia de los polimorfismos funcionales de *CHIT1* y *AMCase*.
- Individuar las correlaciones entre la variabilidad genética de las Quitinazas (y la funcionalidad deducida de los polimorfismos funcionales genotipizados), la distribución de enteroparasitosis y enfermedades relacionadas a la quitina.

2.0. MATERIAL Y METODOS

Pueblos nativos

De acuerdo a la bibliografía específica disponible sobre el tema (Carbonell, 2007; Huaman-Espino, 2006; Roche et al., 2007) y comunicaciones personales de funcionarios de Instituto Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Andinos Amazónicos y Afroperuanos (INDEPA) y el Instituto del Bien Común (IBC) se individualizarán los grupos étnicos más activos en el consumo de artrópodos. La ubicación geográfica de los grupos está indicada en el Mapa Etnolingüístico de Perú 2010 - INDEPA (INEI) (ANEXO 1).

Las poblaciones indígenas estudiadas han son las siguientes

- ***Awajún***, familia Lingüística Jíbaro, Río Marañon: CCNN Tzuntsuntsa, Yamayacat y Putuìm, Dto. Amazonas, visitadas entre agosto 2010 y marzo 2012 con el Prof. José Mostacero León, Prof. Freddy Mejia Coico, Prof. Maria L. Mostacciuolo;
- ***Ashaninka***, familia Lingüística Arawak: CN San Juan del Río Pichis, Dto. Cerro de Pasco, y CN Puerto Ocopa y Pangà, del Río Perené, Dto. Junín; visitadas entre diciembre 2010 y marzo 2012 con el Dr. Federico Rizo-Patrón;
- ***Shipibo-Conibo***, familia lingüística Pano, originarios de diferentes CCNN del Río Ucayali, desde el 2001 residentes en Cantagallo, Lima; visitadas entre setiembre 2010 y Marzo 2012;
- ***Quechua-Lamas***, familia lingüística Quechua, de la CN Lamas, Dto. San Martín; visitadas en octubre 2008 con el Prof. José Mostacero León, Prof. Freddy Mejía Coico y Prof. Jorge Torres Delgado;
- ***Quechua-Cusco***, familia lingüística Quechua, de la CN de Huilloq, y otros casos índices de otras comunidades del Dto. Cusco; visitadas en febrero 2013 con la Prof. Maria Luisa Mostacciuolo y la Prof. Carolina Espinosa Camus.

	Quechua-Cusco	Ashaninka	Shipibo (*)	Quechua-Lamas
Awajún	2,419	1,835	1,247	**610**
Quechua-Lamas	2,289	1,702	**1,117**	
Shipibo (*)	1,172	**585**		
Ashaninka	**587**			

Promedio: 1.356 km

Tabla 1. Distancia geográfica entre las comunidades. En el caso de los sujetos Shipibo residentes en Cantagallo, Lima, se consideró la ubicación de sus Comunidades Nativas de Origen. Evidenciadas las distancias reciprocas menores.

Las misiones de investigación a las comunidades fueron evaluadas en base a la consulta de mapas, y en relación a las oportunidades de movilización fluvial y terrestre, muy instables en época de lluvia. La investigación realizada en la Reserva de Biósfera UNESCO, San Matías y San Carlos, Cerro de Pasco, ha sido coordinada con el dr. Federico Rizo-Patrón, biologo, jefe de proyectos del Instituto del Bien Común ONG, en esa área indígena bien preservada.

Las comunidades visitadas preservan muchos aspectos fundamentales de su sistema de vida ancestral: la construcción habitaciones tradicionales con vegetales, la caza, la pesca y la recollecta de biodiversidad selvática y la agricultura itinerante corta-y-quema (*slash and burn*), de yuca (*Manihot esculenta*) y otros tubérculos. También la ausencia de electricidad, de sistemas de desagüe y de presidios de salud mantienen las condiciones ambientales naturales, escasa salubridad ambiental y falta de infraestructuras publicas (INS, 2000).

Figura 2. Ubicación indicativa de las comunidades nativas visitadas en mapa satelital de Perú.

Diferentemente, la población de control es constituida por peruvianos urbanizados residentes en la costa (Trujillo, Moche, Lima). Estos individuos de habla castellano, no presentan rasgos étnicos y presentan un estilo de vida moderno, también en la dieta. Las parasitosis intestinales descritas en precedentes estudios, con sus respectivas prevalencias, fueron: *Blastocystis* sp., 66,8%; *Giardia lamblia*, 48,7%; *Entamoeba coli*, 43,4%; *Endolimax nana* (20,3%); *Iodamoeba butschlii* (16,5%). (Sánchez-Robles y Jara, 2010), *Enterobius vermicularis* (34,4%), *Hymenolepis nana* (10,8%) y *Trichuris trichiura* (0,6%) (Sánchez-Robles y Jara, 2011).

Asuntos éticos

Las finalidades de la investigación han sido presentadas públicamente, frente a la comunidad y/o a sus autoridades: *Apu*/jefe de la comunidad, representantes de organizaciones indígenas. De cada uno de los voluntarios fue recolectado el consentimiento informado (Anexo 2) firmado por los mismos voluntarios o, cuando menores de edad, por los padres. Muestras biológicas de saliva fueron tomadas de forma no invasiva y segura, en respecto de los protocolos aprobados por la Comisión Ética de la Università di Padova (2008).

Todas las informaciones obtenidas en las investigaciones, como su análisis critica y su sistematización científica han sido realizadas conforme a los derechos de propiedad intelectual de las poblaciones indígenas, en acuerdo a la Ley N° 28216 del 1 de mayo de 2004 y a Ley N° 26839 del 20 de junio de 2001, referida al Convenio sobre la Diversidad Biológica, aprobado por Resolución Legislativa N° 26181. Además los informes parasitológicos y etnobiológicos han sido entregados a las autoridades de las respectivas comunidades.

Por los grupos *Awajún*, *Ashaninka* hemos obtenido la aprobación por las organizaciones indígenas OCCAAM (Organización Central de las Comunidades Awajún del Alto Marañon), ANAP (Asociación Nacional Ashaninka del Río Pichis), respectivamente. La investigación realizada en la Comunidad *Shipibo* residente en Cantagallo, Lima, ha sido auspiciada y facilitada por el Prof. José Luis Portocarrero, Antropólogo del MINDES (Ministerio del Desarrollo Social), y, en la CN *Ashaninka* de San Juan del Río Pichis, por la IBC (Instituto del Bien Común, ONG).

2.1. Estudio Etnobiológico

Este estudio se realizó principalmente en temporada de lluvia (noviembre-marzo 2008, 2010, 2011, 2012), la época en que los Amerindios basan más en la recollecta de recursos silvestres la obtención de proteínas (Hill et al., 1984; Dufour, 1987; Carbonell F. y M. D'arrigo, 1997).

Las finalidades de este estudio han sido las siguientes:

- describir el consumo de insectos y crustáceos comestibles en comunidades nativas de la Amazonía y de la Sierra peruana
- caracterizar el contenido de Ácidos Grasos en los principales insectos
- evaluar la variabilidad estacional del consumo de artrópodos la percepción de los nativos reguardo a este elemento de su dieta.

A través de excursiones acompañadas por los expertos nativos ha sido posible describir detalladamente y documentar a nivel visual (foto y Video) las prácticas tradicionales inherentes la entomofagia y el uso de otros alimentos quitinosos silvestres (caracoles, crustáceos y hongos).

Esta fase permitió de establecer las principales categorías de alimentos que resultaron: yuca/plátano, maíz, arroz, tubérculos/pijuaio, carne de monte, pece, aves de corral, huevo, crustáceos, insectos, caracoles, hongos y ranas. Para los insectos las categorías corresponden a categorías taxonómicas diferentes (de Especie à Clase) y son: "*suri*" (*Rhynchophorus*), "*suri chico*" (*Metamasius*), "*kuruinsi*" (*Atta*), "escarabajo gigante" (*Dynastes*), "escarabajos" (varios Cerambicidae), "gusanos" (varios Castnidae, *Brassolis*), "avispas", "hormigas" y "otros insectos".

Para recoger los datos etnobiológicos sobre el uso alimentario de la biodiversidad selvática, especialmente de artrópodos, como fuente proteica, en todas las CCNN visitadas se ha realizado entrevistas semi-estructuradas a los nativos. Se entrevistó un total de 169 sujetos nativos (82 *Awj*, 66 *Ash* y 21 *QuL*) y 70 Peruanos urbanizados, utilizando un cuestionario (Anexo 3). Se ha tenido especial cuidado de tomar las siguientes informaciones: nombre nativo, estadio biológico consumido, variación estacional del recurso, apreciación de la quitina y presencia de eventuales disturbos causados por estos alimentos.

En una muestra reducida de sujetos *Awajún* y *Ashaninka* se realizo entrevistas detalladas sobre la frecuencia semanal del consumo de los alimentos y en 2 núcleos familiares (1 *Awajún* y 1 *Ashaninka*), se realizó un estudio detallado de la dieta. Por un total de 3 días y medio por cada familia fueron pesados los alimentos consumidos excusa la fruta y el *masato*. En la mayoria de los casos los alimentos eran pesados cocidos antes de ser consumidos. En los casos en que los nativos consumían diferentes alimentos mezclados esos fueron pesados separadamente antes de la cocción, y cuando los alimentos eran consumidos crudos justo despues la recollecta (como *snacks* durante el trabajo al monte) fue posible pesarlos en unos pocos casos y por eso se tomó el valor medio de las pesadas realizadas ≈15 g.

Figura 3. Midiendo el peso de los insectos comestibles, en esto caso *Dynastes hercules*.

Determinación Taxonómica

Las especies de invertebrados comestibles han sido recolectadas y debidamente conservadas en solución hidro-alcohólica al 60%, han sido trasladadas a los laboratorios de Zoología y Entomología de la UNT, y luego al Laboratorio de Etnobiología de la UNIPD, y revisados por el Prof. M.G. Paoletti.

La determinación taxonómica se realizó por medio de claves taxonómicas actualizadas bajo la supervisión del Prof. Alfredo Gómez Quezada y del Dr. Cesar Medina Tafur, Zoólogos de UNT. Los ejemplares de difícil determinación fueron determinados por taxónomos especialistas, especificadamente: Curculionidos por el Dr. Charles W. O'Brien (Green Valley, Arizona), los Formicidae por el Dr. John Lattke (Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela), y las avispas por el Dr. James M. Carpenter (American Museum of Natural History, New York).

Análisis de Ácidos Grasos

Con el fin de evaluar el valor nutricional de los principales invertebrados comestibles 2-3 ejemplares fueron secados a la braza justo después de la recolecta. Este sistema puede deteriorar y quemar las muestras, pero representa exactamente los alimentos como son preparados antes de ser consumidos por los nativos.

Los análisis químicos nutricionales fueron realizados en el Instituto de Tecnología Química de Materiales Orgánicos de la Universidad Johannes Kepler de Linz, Austria, por el Prof. Clemens Schwarzinger y el suscrito. Las muestras fueron secadas a 60°C por 2 horas, a continuación, homogeneizadas por *cryomilling* (SPEX Freezer/Mill 6770), y el polvo resultante se utilizó para el análisis de los ácidos grasos. Se realizó por *Pirólisis-GC/MS* (cromatografía de gas, y Masa espectrometría) con el siguiente protocolo: se puso 4-10 μg de cada muestra seca en un tubo de cuarzo y se añadió 4,5 μl de una solución diluida, acuosa de hidróxido de tetrametilamonio. Las muestras fueron posteriormente tratadas con pirólisis a 450°C durante 10 s con una CDS 5250 pirólisis *auto sampler* (muestreador automático) conectada a un sistema Thermo Trace GC Ultra/MD 800 para cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS).

La interfaz de pirólisis se mantuvo a 300°C, la interfase GC/MS a 280°C; el GC se programó desde 100°C (1 min) a 230°C (5 min) a una velocidad de $10°C \cdot min^{-1}$. El espectrómetro de masas se hizo funcionar en modo EI (70 eV) a una temperatura de 200°C (Campana-Nowotny, 2012).

Los productos volátiles se separaron en una columna Supelco SP 2330 (30 m, ID 0,32 mm, 0,2 μm de espesor de la película) con helio como gas portador 4,6 (2 ml · min^{-1}) y se identificaron por comparación con compuestos de referencia así como a través la interpretación de sus espectros de masas EI y la comparación con informaciones presentes en NIST 2002, Wiley y bibliotecas electrónicas NBS.

Considerado que no se pudo obtener una pesada definitiva de las muestras no ha sido posible calcular la abundancia absoluta de AGs, y los valores son expresados como distribución relativa porcentual.

2.2. Estudio parasitológico

2.2.1. Análisis copro-parasitológico

Para la determinación de los parásitos se realizó análisis cualitativos generales, aplicando los protocolos establecidos por el Instituto Nacional de Salud (INS, 2003). Este análisis se realizó en el Laboratorio de Helmintología Parasitaria de la Universidad de Trujillo, bajo la supervisión del Prof. Cesar Jara Campos.

	Hombres	Mujeres	Niños	Total
Awajún	5	1	28	34
Ashaninka	3	4	14	21
Shipibo	4	1	16	21
Total	12	6	58	76

Tabla 2. Muestreo realizado dividido por etnias y por categoría social (hombres, mujeres, niños < 16 años).

El muestreo de de heces se realizo durante las primeras visitas a las comunidades de manera que se pudo verificar la conservación de una condición parasitológicas característica de la zona, necesaria para seguir con el estudio genético. El muestreo interesó 76 sujetos de los cuales 58 son niños (< 16 años), como reportado en la tabla a lado. El muestreo no resulta adecuadamente distribuido entre las tres categorías sociales (hombres, mujeres y niños), a causa de las prioridades expresadas por los mismos comuneros que indicaron los niños como faja vulnerable mas afectada por los parásitos.

Las muestras de heces se recogieron en las habitaciones de los nativos, o en la casa comunitaria, en la mañana, en recipientes de plástico donde fue adicionada una solución de formol (5-6%), y transportados al laboratorio dentro de unos pocos días de la recogida. Se aplicaron diferentes métodos de análisis, como el método directo en que las heces, blandamente diluidas, son adicionadas de Lugol (1-2%), son analizadas directamente mediante un microscopio binocular. Otros métodos utilizados son:

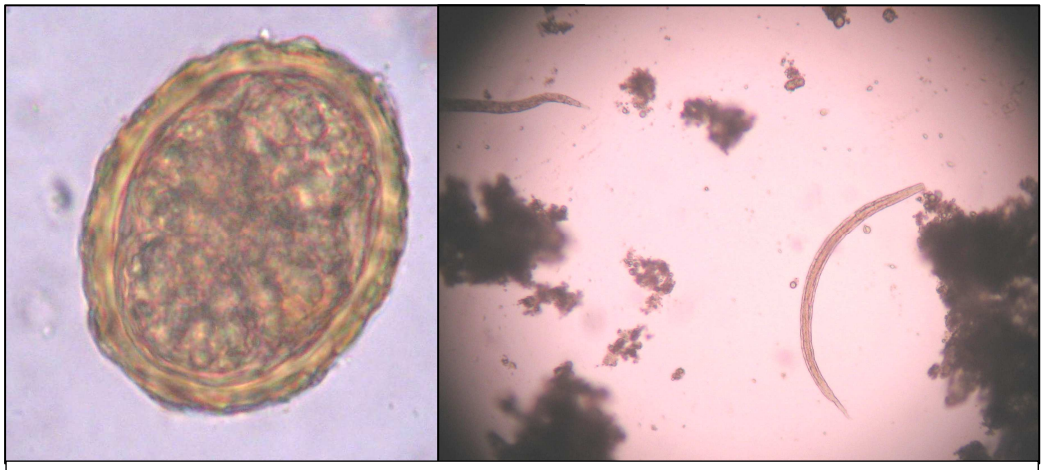


Figura 4. Huevo de *Ascaris l.* (lado izquierdo) y larva rabditoides de *Strongyloides stercoralis* (lado derecho).

Sheather Sugar: método de concentración por flotación con centrifugación en una solución de azúcar. Se basa en la flotación de quistes, ooquistes y huevos de parásitos en una solución de azúcar que posee mayor densidad que ellos. Esta técnica es útil para la concentración de quistes y ooquistes de protozoos y huevos de helmintos (INS, 2003).

Método de Ritchie o de sedimentación por centrifugación y flotación. Se basa en la concentración de los quistes y huevos por sedimentación mediante la centrifugación, con la ayuda de formol y éter para separar y visualizar los elementos parasitarios.

Se utilizó una solución acuosa de yodo de Lugol (1-2%) para la preparación húmeda de montaje. Un frotis de materia fecal fresca en un vidrio portaobjetos se preparó con el fin de realizar el análisis por microscopía directa de: quistes *Entamoeba histolytica* y *E. coli*, huevos de *Ancylostoma/Necator, Enterobius, Ascaris lumbricoides*, quistes de, *Giardia lamblia* (o *intestinalis*), huevos de *Hymenolepis nana* y *H. diminuta*, larvas rabditoides de *S. stercoralis* (figura 4), larvas y huevos de *T. trichiura*. El resto de la muestra fue utilizado para la preparación de diapositivas frescas para uso didáctico.

2.2.2. Estudio comparativo

Para realizar un estudio sobre la distribución de enteroparásitos conteniente quitina se utilizaron datos procedentes por estudios parasitológicos realizadas en poblaciones mundiales presentes en el database GIDEON (Anexo 4). Por lo tanto se

utilizó estudios relativos a los siguientes contextos: Selva de Perú (Ibáñez et al., 2004), Etiopia rural (Legesse et al., 2004), Grecia urbana (Papazahariadou et al., 2004), Pakistán urbano/costa (Mumtaz et al., 2009), Kenya rural y Kenia urbano (Ngonjo et al., 2012), Nigeria (Kenneth et al., 2012), India rural (Kang et al., 1998). Los datos sobre prevalencias de parásitos fueron reordenados e informatizados en formato Excel (Microsoft) para los siguientes análisis estadísticas. Aùn los estudios copro-parasicológicos puedan detectar los huevos de Trematodos no son los màs adecuados para la detección de estos parasitos, y las publicaciones listadas arriba no presentan datos sobre *Schistosoma*, por eso fueron integradas con otros datos publicados relativos a *Schistosoma mansoni* y *Schistosoma haematobium* (Shur et al. 2011a, 2011b). De esta forma fue posible producir una librería de datos (Tabla 4) sobre la distribución de parásitos en los contextos mundiales listados arriba.

Las especies que contienen quitinas han sido elegidas en base a la literatura científica mas actualizada.

Giardia, Blastocystis, Entamoeba	pared de quistes	Ward et al., 1997; Harrington, 2008
Nematodos intestinales	huevos, faringe	Zhang et al., 2005; Wimmer et al., 1998
Filarias, nematodos	huevos, cuticula larva	Brydon et al., 1987; Wu et al., 2003
Cestodos	huevos, cisticercas	Sato et al., 2006
Trematodos	huevos, quistes	Stephen y Allen, 2010

Tabla 3: principales taxa de parasitos que contienen quitina, estructura y referencia.

Análisis Bio-estadística Multivariada

Para hacer una comparación estadística de las condiciones parasitológicas en las comunidades estudiadas respecto a otras poblaciones suramericanas y mundiales, se aplicó un enfoque bioestadístico muy utilizado en la ecología, especialmente en el estudio de comunidades vegetales y zoológicas. Este sistema permite de evaluar el grado de similitud entre diferentes sitios de muestreo en que se haya relevado los datos relativos a la diversidad de especies biológicas (presencia o abundancia). El método de *Non-Metric Multidimensional Scaling* (NMDS), es un método de ordenación que se puede emplear con datos que no se distribuyen normalmente y cumple bien con datos con varios ceros (ausencia de le especie), como es el caso de los datos sobre parasitosis. El NMDS organiza los unidades de la muestra en una serie continua de tal manera que los puntos que están próximos entre sí corresponden a los sitios que son similares en composición de especies, y los puntos que están muy alejados son diferentes (McCune y Grace 2002). NMDS también proporciona un parámetro de estrés, que indica cuanto las distancias en el diagrama de ordenación corresponden a

los valores de disimilitud, valores de tensión más cerca de cero se consideran el mejor ajuste, valores menores de 0,14 indican una elevada probabilidad que los resultados respecto a la matriz usada (McCune y Grace, 2002).

Los análisis de similitud utilizadas son Cluster Analysis y Neighbour-joining análisis, que otorgan una representación à árbol de la distancia entre los diferentes casos de estudio. Para estos análisis ha sido utilizado el programa de libre acceso utilizado PAST.

	Entamoeba coli	*Entamoeba histolytica*	*Blastocystis hominis*	*Giardia lamblia*	*Ancylostoma /Necator*	*Ascaris l.*
Awajun_2	0,680	0,129	0,284	0,214	0,304	0,289
Ethiopia_ Rural	0	0,127	0	0,062	0,602	0,062
Grecia_ Urbana	0,004	0	0,053	0,023	0	0
Pakistan_ urbano/costa	0	0,193	0	0,253	0,074	0,123
Kenya_ Rural	0,211	0,222	0	0,067	0,2	0,267
Kenya_ Urbano	0,161	0,011	0	0,069	0,069	0,149
Nigeria	0	0,024	0	0,027	0,417	0,242
India_ Rural	0	0,218	0	0,538	0,615	0,064

	Enterobius vermicularis	*Strongyloides Stercoralis*	*Trichuris trichiura*	*Taenia sp.*	*Hymenole pis_nana*	*Schistosoma mansoni*	*Schistosoma haematobium*
Awajun_2	0,036	0,008	0,166	0,002	0,035	0	0
Ethiopia_ Rural	0	0,058	0,147	0,139	0	0,212	0,181
Grecia_ Urbana	0,011	0,004	0	0,004	0	0	0
Pakistan_ urbano/costa	0,026	0	0	0	0,019	0	0
Kenya_ Rural	0,011	0	0,044	0	0,067	0,353	0,154
Kenya_ Urbano	0,011	0	0,057	0	0,057	0	0
Nigeria	0	0	0,047	0	0	0,055	0,383
India_ Rural	0,128	0,154	0,013	0	0,256	0	0

Tabla 4: librería de datos basada en los casos de estudio listados arriba, relativos a parasitosis por protozoarios y helmintos contenientes quitina.

2.3. Estudio de los genes de las Quitinazas

2.3.1. Muestreo para estudio genético

En este estudio han sido involucrados individuos de los 5 grupos nativos: *Awajún* (Awj), *Ashaninka* (Ash), *Shipibo-Conibo* (Shp), *Quechua-Lamas* (QuL), *Quechua-Cusco* (QuC); más individuos mestizos procedentes de diferentes áreas urbanizadas del país, principalmente de Trujillo (45), 4 de Lima y 5 de Tarapoto.

Poblaciones	Total muestras	ADN analizados	ADN baja cualidad
Total Amerindios	119	**85**	34
Awajún	27	**26**	1
Ashaninka	18	**12**	6
Shipibo-Conibo	24	**22**	2
Quechua-Lamas	21	**16**	5
Quechua-Cusco	29	**9**	20
no-étnicos	54	**50**	4

Tabla 5. Individuos que donaron su muestra de saliva para el presente estudio.

Aprovechando del equipo especifico *Oragene DNA Self-Collection Kit* (Anexo 5) y de tampones orales, se ha tomado muestras de saliva a 193 personas. De cada individuo han sido recolectadas, mediante entrevistas estandardizadas (ver Anexo 3), diferentes informaciones personales: nombre, apellido, edad, lugar de nacimiento, grupo étnico de pertenecía, costumbres alimentarios, historia parasitológica (cuando disponible), y las informaciones sobre parentesco con los demás sujetos de la localidad involucrados en el muestreo.

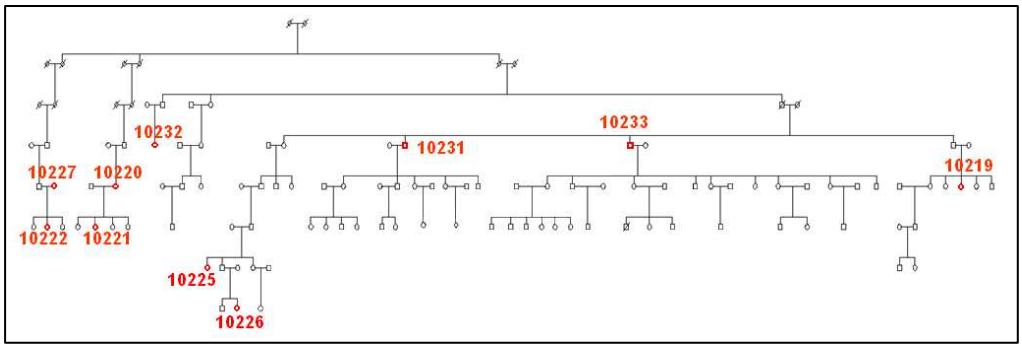


Figura 5. Árbol genealógico de la familia de la comunidad nativa de *Tzuntsuntsa*, etnia *Awajún*: es evidente el elevado grado de parentesco entre los habitantes de la comunidad.

Considerado que las comunidades nativas (CCNN) tienen un elevado grado de consanguinidad (figura 5), las informaciones sobre las relaciones de familiaridad dieron dos relevantes ventajas a la investigación: durante el muestreo, de involucrar un buen numero de individuos aislados, permitiendo de aumentar la representatividad de la muestra, y también, durante la elaboración de los datos

genéticos, de normalizar los resultados en relación al grado de parentesco entre los individuos.

2.3.2. Análisis Genéticos

Los análisis genéticos moleculares interesaron los dos genes codificantes de los dos enzimas que aún conservan la actividad quitinolítica: *Chitotriosidase* y *Acidic Mammalian Chitinase*. Estos genes (*CHIT1* y *CHIA*) han sido estudiados en muchas poblaciones mundiales, prevalentemente en estudios caso-control en correlación a fenotipos asmáticos, o a la distribución de parásitos. Por lo tanto, en la fase preliminar, fue revisada le literatura científica sobre Quitinazas humanas para definir los polimorfismos mas informativos sobre la funcionalidad enzimática.

Los análisis han sido realizados entre Junio 2011 a Abril 2013 en el Laboratorio de Genética Humana de la Universitá di Padova, coordinado por la Prof. M.L. Mostacciuolo y los reactivos han sido adquiridos a través recursos propios del mismo laboratorio y del Proyecto de Investigación *InterArea* sobre Quitinazas humanas (2011-2013), coordinado por el Prof. A. Battisti, UNIPD.

2.3.2.1. *Chitotriosidase (CHIT1)*

En el gen *Chitotriosidase* es bien conocidoa una variante muy común, llamada Alele H, que consiste en una duplicación de 24 pares de bases en el exón 10. Esta duplicación causa un fenómeno de *splicing* alternativo que causa la perdida de 87 bases durante la transcripción del ADN en ARN mensajero, resultante en una isoforma completamente privada de su dominio catalítico, por lo tanto inactiva (Piras et al., 2007; Hall et al., 2007). Entonces, de enste gen se analizó solamente la duplicación de 24 pares de bases, en 85 amerindios y 50 controles no étnicos.

Se utilizó una metodología utilizada en muchos trabajos científicos que interesaron este gen (Piras et al., 2007; Hall et al. 2007): amplificación de la región conteniente la duplicación (*CHIT1*, Exón 10), y luego separación de bandas con diferentes pesos moleculares por corsa electroforética, o secuenciamiento.

***Polymerase Chain Reaction* (PCR)**

Para realiza la reacción a cadena de la polimerasa (PCR) y amplificar nuestra región de interés del ADN este tiene que ser diluido a la concentración de 50 ng/μl,

para luego realizar la reacción en el termociclador. Las PCR se llevaron a cabo en 15µl, consistentes en el siguiente Mix de reacción:

- 0,05 µl de Taq FastStart (Roche),
- 1,5 µl de Buffer $MgCl_2$ 10x
- 0,2 µl *Forward Primer* 5'CCTGTCCAGAAGAGGTAGCC'3 [concentración final 250 nM]
- 0,2 µl de *Reverse Primer* 5'CCTCCAAATTCCACCACTG'3 [250 nM]
- 2 µl dNTPs
- 1 µl de muestra de ADN genómico.
- 9,05 µl, agua libre de nucleasa.

El programa de PCR utilizado fue el siguiente:

→ Activación: 94° C durante 4 minutos

→ 10 ciclos x [94°C durante 40" (denaturación) + 70°C-1°C durante 40" (*annealing*) + 72°C durante 40" (extensión)]

→ 33 ciclos x [94°C durante 40", 60°C durante 40", 72°C durante 40"]

→ Extensión final: 72°C durante 7 minutos.

→ *block* de la reacción: 15°C por 2 minutos

La detección de la duplicación de 24 pares de bases en los productos de PCR fue realizada por separación de bandas por electroforesis o por secuenciamiento.

Electroforesis

Los productos amplificados resultantes de la PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa (3-4%). Se realizó la distinción entre genotipos homocigotos de tipo silvestre, heterocigotos y homocigotos mutantes, en base al peso molecular y número de los fragmentos resultantes (Figura 6).

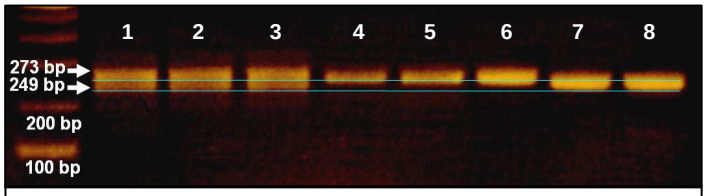


Figura 6. Separación de bandas en 8 individuos: heterocigotos: 1,2,3; homocigotos duplicados: 4,5,6, y homocigotos no

La forma *wild-type* de esta secuencia es constituida por 249 pb, y por 273 pb en presencia de la duplicación. Entonces ha sido posible separar el producto de PCR por electroforesis en gel de agarosa 3-4%, en paralelo con un control positivo (homocigoto duplicado) y uno negativo (homocigoto no duplicado), y de un marcador de peso molecular. De esta manera ha sido posible

visualizar directamente la duplicación a través de la lectura del gel mediante transiluminador.

Secuenciamiento de ADN

El producto de PCR, fue diluido a 1 ng/ml, y el secuenciamiento, basado en el método Sanger, ha sido realizado por el laboratorio privado *BMRgenomics* (*spin-off* de la UNIPD).

El método utilizado por BMRgenomics es la secuenciación por dideoxinucleótidos, mejor conocido como el método Sanger. Este método de secuenciación se basa en el proceso biológico de la replicación del ADN. El producto de PCR, purificado enzimáticamente con enzimas EXO y SAP para la eliminación de primers y dNTPs no incorporados, se desnaturaliza y se emplea una sola hebra para la secuenciación. El empleo de dideoxinucleótidos trifosfatos (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP), permiten de ser detectàdos para la reconstrucción de la secuencia genética original.

Esta será reconstruida por la sobreposición de los 4 espectros y será visualizada por el programa SeqMan2, en forma de secuencia (Fig. 7).

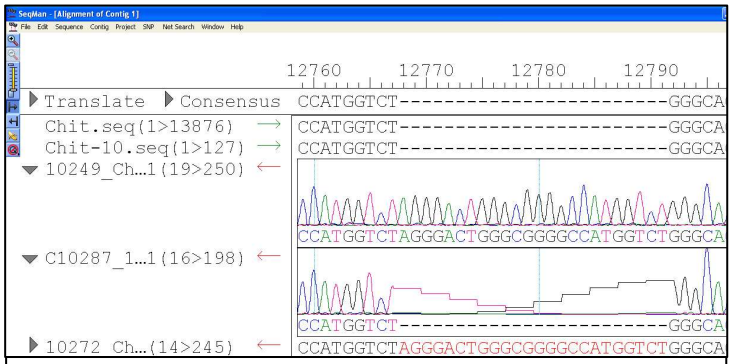


Figura 7: Alineamiento de secuencias: arriba hay el individuo homocigoto duplicado, abajo el homocigoto WT.

2.3.2.2. *Acidic Mammalian Chitinase (CHIA)*

***Variantes no-sinónimas* del exon 4**

En el caso de *CHIA*, el exón 4, codificante por el dominio catalítico, resulta muy informativo respecto a la funcionalidad del enzima, especialmente tres SNP no-sinónimos:

- rs41282492; A290G; Asn45Asp,
- rs41282494; G296A; Asp47Asn,
- rs41282496; G339T; Arg61Met.

Entonces se genotopizó el exón 4, en 75 sujetos amerindios y 39 controles. A través el utilizo de primers específicos se obtuvo la amplificación de las secuencias deseadas, para luego realizar el secuenciamiento (ver siguiente parágrafo) (ver Anexo 6).

Análisis del gen CHIA

En 9 individuos ancianos (Awj: 2, Ash: 2, Shp: 2, Lam: 2, QuC: 1) fue analizada la parte codificante de todo el gen *AMCase*, mas el promotor, ≈ 1000 bases antes del 5'UTR. Los primers fueron calculados para la amplificación de 12 amplicones contenientes el promotor (1000 bp antes de 5'UTR) y los 12 exones que componen el gen *CHIA*, veer próximo párrafo.

En la fase final se ha genotipado polimorfismos muy variables en los humanos (ver análisis de genética poblacional, siguiente parágrafo), localizadas en las regiones extremas del gen:

- primero amplicon del promotor (chr1:111832527 – chr1:1111833042),
- exón 12, rs2256721 (G1452T, Gly432Val).

El primero amplicón del promotor presenta 5 *loci* variables, por lo tanto se procedió con la amplificación (PCR) y el secuenciamiento en 75 individuos Amerindios y 29 controles. El exón 12 (ultimo exón del gen) presenta solamente la sustitución G1452T no-sinónima (Gly432Val), entonces se ha utilizado enzimas de restricción para analizar 21 nativos y 16 no-étnicos.

Región del gen	**SNP**	**Tipo**	**WT**	**Analisis**	**sustitución amino-acidica**	sujetos analizados						
						Awj	Ash	Shp	Lam	QuC	**Amerindios**	**no-etnicos**
Promotor	rs12023321 rs12033184 rs35042265	SNP	T A C	PCR, secuenciamiento	/ / /	19	13	21	13	9	**75**	**29**
Exón 4	rs41282492 rs41282494 rs41282496	SNP, no sinonimos	A290G G296A G339T	PCR, secuenciamiento	Asp45Asn Asp47Asn Met61Arg	19	13	21	13	9	**75**	**39**
Exón 12	rs2256721	SNP, no sinonimo	G1452T	PCR, restricion enzimatica	Gly432Val	2	5	7	5	2	**21**	**16**

Tabla 6. Análisis realizados relativamente ala gen *CHIA*, descripción de las variantes, numero de individuos analizados en cada etnia y por grupos mayores.

Primers

Los *primers* utilizados en las PCR designados especificadamente para las regiones de interés. Los primers miden entre 19 y 25 bases azotadas (Anexo 6) fueron calculados a través del programa *Primer-3* (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus.cgi) verificando las probabilidades de *self-annealing*, y las

temperaturas de *annealing* fueron elegidas entre los 56 y los 61°C. Los primers han sido producidos por la empresa INVITROGEN.

Enzima de restricción

Mediante el programa NEBcutter V2.0 (http://tools.neb.com/NEBcutter2/) ha sido posible analizar la secuencia virtual del amplicon e individuar el enzima Hpy188I que reconoce "TCNGA" de esta secuencia, que incluye la variante T. A 37°C corta la secuencia en dos segmentos de diferente peso molecular (299 y 201 bp), separables por electroforesis en gel de agarosa 2,5%. La genotipización de la variante rs2256721 fue realizada por medio del enzima de restricción Hpy188I producido por NewEngland BioLabs.

A seguir es reportada la secuencia amplificada, extrapolada de GenomeBrowser por in silico PCR, que ha sido analizada por el programa on-line (http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?command=start).

---

cccacagttctcttcacctctaggtgaagcttagagcctctcccaagcccactagtctgctct
tactgctgtatgtttcag**GTTGCACGGCTCCAGCTCAGCCCATTGAGCCAATAACTGCTGCTC**
CCAGTGGCAGCGGGAACGGGAGCGGGAGTAGCAGCTCTGGAGGCAGCTCGGGAGGCAGTGGAT
TCTGTGCTGG/TCAGAGCCAACGGCCTCTACCCCGTGGCAAATAACAGAAATGCCTTCTGGCA
CTGCGTGAATGGAGTCACGTACCAGCAGAACTGCCAGGCCGGGCTTGTCTTCGACACCAGCTG
TGATTGCTGCAACTGGGCATAAACCTGACCTGGTCTATATTCCCTAGAGTTCCAGTCTCTTTT
GCTTAGGACATGTTGCCCCTACCTAAAGTCCTGCAATAAAATCAGCAGTCAAAACatgactgt
ccttgcttttaagtgatttgggtggaaacctcttccagatatgaaaatagggctatgcat

Descripción: en color gris el sitio de apareamiento de los primers; en amarillo la sustitución, subrayada la secuencia reconocida por la enzima Hpy188I, en rojo la tripleta final del gen *CHIA*.

2.3.2.3. Elaboración estadística de los datos genéticos

Equilibrio de Hardy-Weinberg

Este análisis se aplica cuando hay dos alelos de un gen, en nuestro caso el WT y el Alelo H del gen *CHIT1*, y permite di evaluar si hay selección contra o a favor de los 3 genotipos (WT/WT, WT/aH, aH/aH).

Fue utilizado un programa on-line que calcula en base a las frecuencias alélicas observadas en la población, el número esperado de personas por cada genotipo, o sea lo que habría si la población se encontrara en perfecto equilibrio de Hardy-Weinberg, y automáticamente realiza la prueba del Chi-cuadrado entre los genotipos observados y esperados.

El método no resulta adecuado si los individuos de cada grupo genotípico son < 5. Si el valor P < 0,05 la frecuencia de los genotipos no respecta el *Hardy-Weinberg Equilibrium*, y se puede suponer presencia de presión selectiva.

Comparación Casos-Controles

El programa *Case-Control QuasiLikehood score test* (CC-QLS test) es ampliamente utilizado para realizar comparaciones de hasta 3 valientes entre pares de poblaciones distinguidos por un especifico aspecto patológico, epidemiológico o ambiental. Este programa calcula el grado de de cuasi-verosimilitud entre Casos y Controles y la prueba de *Corrected Case-Control Chi2 test* (corr-chi2), desarrollado por Bourgain et al. (2003). Estas dos pruebas son adecuadas para el análisis de casos y controles en cualquier muestra con personas con relaciones de consanguinidad, incluyendo genealogías complejas, siempre que se conozca su relación. De hecho es incluido el programa "KinInbcoef", que permite de calcular los coeficientes de parentesco (*kinship*) y los coeficientes de endogamia en el pedigrí general, que son necesarios para el cálculo del CC-QLS test y la prueba de corr-chi2.

El CC-QLS test se realizó por la duplicación de *CHIT1* y por las variantes asociadas del exón 4 y del promotor de *CHIA*.

Las subpoblaciones han sido agrupadas según le etnicidad:

- Étnicos VS. no-étnicos;

y según la dieta:

- Etnicos amazónicos + Quechua-Lamas VS. Quechua Cusco + no-étnicos.

Base de datos de Genética de Población

Las secuencias exonicas resultante del secuenciamiento de los 9 ancianos fueron analizadas a través del programa *SeqMan2*, creado para visualizar y alinear secuencias de nucleótidos. Las secuencias fueron entonces comparadas entre si y con la secuencia de modelo, disponible en UCSC-GenomeBrowser (http://genome.ucsc.edu/). De esta forma ha sido posible detectar las variantes del gen que difieren entre los nativos, o respecto a la secuencia modelo. (UCSC-GenomeBrowser) Se utilizó también la función "Human Genome Diversity Project" (UCSC-GenomeBrowser), que permite de visualizar la variabilidad geográfica de las frecuencias alélicas en un mapa mundial.

Para evaluar el grado de conservación del gen *CHIA* fue realizada, por todas las variantes genotipizadas, la comparación con las frecuencias alélicas en otras poblaciones humanas, y con el alelo ancestral (alelo conservado en el chimpancé reportado en ENSEMBL, UCSC-GenomeBrowser, dbSNP). Ambas metodologías son útiles para la individuación de *loci* candidatos por ser sujetos a presión selectiva (Rockman et al., 2003, 2005).

Tabla 7. Poblaciones descritas en ENSEMBL, y su proveniencia.

Continente	Población	Abreviación
África (AFR)	Afroameric. USA	ASW
	Luhya, Kenya	LWK
	Yoruba	YRI
Europa (EUR)	Norte Americanos	CEU
	Finlandés	FIN
	Gran Bretaña	GBR
	Ibéricos, España	IBS
	Toscanos, Italia	TSI
Asia (ASN)	Han, Cina	CHB
	Chinos, Taiwán	CHS
	Japoneses	JPT
Américas (AMR)	Mexicanos, USA	CLM
	Mexicanos, MEX	MXL
	Puertorriqueños	PUR

Por lo tanto fue necesario realizar una librería de datos (*Excel, Microsoft*) de las frecuencias alélicas vía consultación del database on-line ENSEMBL GenomeBrowser que provee las informaciones sobre las frecuencias alélicas de 14 poblaciones humanas representativas de África, Asia, Europa y America (Anexo 7).

Entonces fue calculada la variancia de la frecuencia alélica en las 14 poblaciones y los polimorfismos que presentan una desviación estándar de la frecuencia alélica ≤ 0,10 (variancia ≤ 0,01%), fueron considerados poco variables y excluidos de los siguientes análisis y de la discusión.

Índice de Fijación

De los SNPs rs35042265, rs2256721, del gen *CHIA*, que presentan elevada variabilidad entre las poblaciones humanas, fue calculado el Índice de Fijación por pares de poblaciones (Fst) entre las 14 poblaciones de ENSEMBL y los Amerindios de Perú. De acuerdo a la Estadística de Wright (1922), el Fst otorga una medida de la

divergencia genética entre pares de poblaciones (o en una población total compuesta por diferentes subpoblaciones), pero no permite de distinguir si la causa es la estructura de la población (deriva o efecto fundador) o la selección natural.

El Fst por pares de populaciones ha sido calculado a través la siguiente formula:

$$F_{ST}(i,j) = \frac{(P_i - P_j)^2}{(P_i + P_j) \times (2 - (P_i + P_j))} \quad .$$

Donde P es la frecuencia de un dato alelo en dos poblaciones "i" y "j". Los valores de Fst varia entre 0 y 1, y el valor de entre dos poblaciones con el grado mas elevado de diversidad (homocigotos por dos diferente aleles), es 1.

3.0. RESULTADOS

3.1. Dieta nativa

Las informaciones etnobiológicas confirmaron los hábitos alimentarios tradicionales en toda la muestra amerindia, especialmente en los *Awajún*, *Ashaninka*, *Quechua-Lamas*.Los *Shipibo* confirman estas costumbres antes de migrar a Lima. La dieta de los nativos es todavía caracterizada por un elevado consumo de yuca y plátano, y por la ausencia de animales domesticados, rumiantes y cerdos, y las únicas crías encontradas son las gallinas, patos, y suidos amazónicos como el *sajino* (*Tayassu pecari*) e invertebrados silvestres, como insectos, crustáceos y hongos (Anexo 8).

La dieta nativa es muy rica en carbohidratos amiláceos (0,7-1 Kg/día), constituidos por la yuca (*Manihot esculenta*), el plátano (*Musa acuminata*) y los tubérculos en las comunidades amazónicas y por la papa, otro tubérculos y maíz en área andina. El plátano, *pituca* (*Colocasia esculenta*) y *taro* (*Xantosoma* sp.) son especies introducidas abundantemente consumidas por los *Awajún* y *Ashaninka*.

De hecho, la alimentación tiene un papel importante en la trasmisión de parásitos, no solamente debido a la contaminación de la comida, si no por las zoonosis, causadas por parásitos presentes en mamíferos o artrópodos consumidos por el hombre. En nuestro estudio hemos podido confirmar la ausencia de criado vacuno, huésped intermedio de la *Fasciola*, y del cerdo, huésped de la *Taenia*. A demás, a pesar de que los *Awajún* y los *Ashaninka* consumen abundantemente el

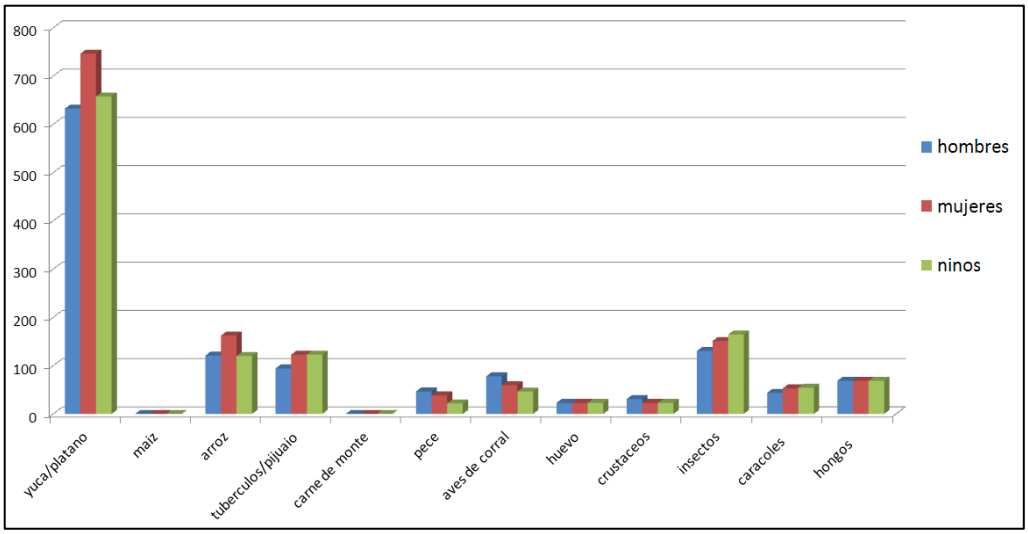


Fig. 8. Dieta de una familia *Awajún* de 1 día (promedio de 3,5 días) en el mes de marzo 2012.

cangrejo *Hipolobocera* cocido, que es el huésped del trematodo parassito *Paragonimus peruvianus*.

Se observó también un uso cotidiano de artrópodos y se confirmó que, en epoda de lluvia, la fuente principal de proteínas es constituida por crustáceos e insectos, en las comunidades amazonicas. Ningún nativo declaró alguna enfermedad debida a la ingestión de quitina, ni enfermedades de tipo atópicos. Contrariamente, la población control de peruanos urbanizados presenta hábitos alimenticios occidentales y declaran de comer de vez en cundo crustáceos, eliminando buena parte de su exoesqueleto de quitina. Solamente 15 individuos (14 no-étnicos y 1 *Shipibo* residente en Lima) tenían diagnosticadas enfermedades atópicas (asma, dermatitis).

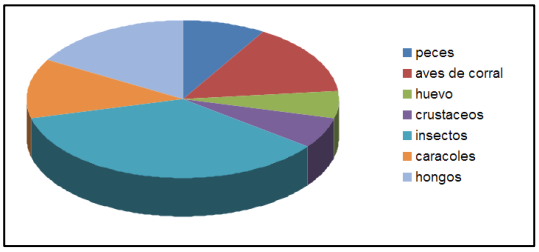


Fig. 9. Distribución de las diferentes fuentes proteicas en una familia *Awajún*. Es evidente la relevancia de los insectos y de los invertebrados en general.

3.1.1. Artrópodos comestibles

Los invertebrados comestibles observados resultaros ser más de 30 (Anexo 8), de las cuales 22 han sido determinadas hasta el nivel de especie: los artrópodos resultaron ser 19, de los cuales 16 son insectos y 3 crustáceos de río. Los Órdenes de insectos más consumidos son los Coleópteros con 7 especies y los Himenópteros con 5 especies. Los Lepidópteros determinados son 4, y por lo meno otras 4 especies de gusanos son consumidas por los nativos *Ashaninka* en otras estaciones del año, por lo tanto no ha sido posible recolectarlas y determinarlas. Han sido determinadas también 3 especies de gasterópodos de tierra y 4 especies de hongos.

Los insectos son mayormente consumidos en su estadio larval, y las formas de preparación más utilizadas resultan la cocción a la braza y la *patarashca*, una forma típicamente amazónica de cocinar que consiste en juntar diferentes alimentos en una hoja de *Heliconia* sp. que, aún echada en las brazas permite de cocinar los alimentos sin quemarlos (figura 11,A).

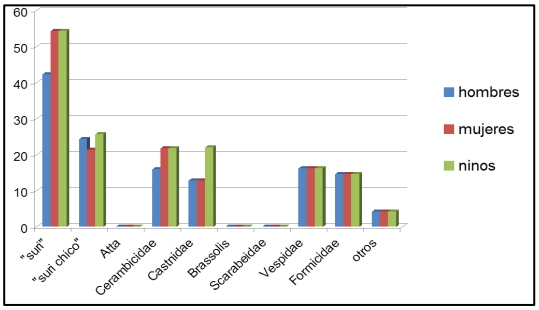


Fig. 10. Artrópodos y otros alimentos contenientes quitina, consumidos por los *Awajún* (g/día, promedio de 3,5 días).

Figura 11: invertebrados comestibles. (A) *patarasca* con *suri*, langostinos de río, caracoles; (B) hormigas *mamaco* del genero *Atta*, en el mercado de Tarapoto, San Martín, Perú; (C) *suri*, *Rhynchophorus palmarum*; (D'- D") escarabajo gigante, *Dynastes hercules*. En la siguiente hoja, Figura: (E') gusano de mariposa *Brassolis sophorae*, y sistema de recollecta en palmeras (E"); (F) caracol del genere *Pomacea*; (G) varios productos silvestres recolectados en la selva; (H') nido de avispas *Polybia furnaria*, y sistema de recollecta (H").

E'

E"

F

G

H'

H"

Según la percepción de la población entrevistada, la fuerte variabilidad de las condiciones climáticas estacionales produce fases de relevante escasez de cazado y pescado, contrariamente los insectos, crustáceos y gasterópodos son consumidos frecuentemente (2-5 veces por semana) (Figura 12). Los nativos alto-andinos, *Quechua-Cusco,* declararon de utilizar insectos raramente, 2-3 veces al mes, y fue observado el consumo de larvas de *Platycoelia lutescens*, que viven bajo el suelo en las chacras.

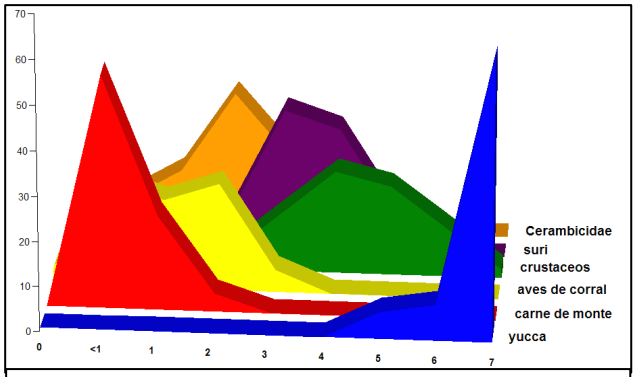


Figura 12. Frecuencia del consumo semanal de diferentes alimentos en época de lluvia, basada el la percepción de 72 nativos entrevistados.

Sin embargo, las observaciones cualitativas de las preparaciones tradicionales individuaron diferentes comportamientos finalizados a reducir la ingestión de quitina: predilección de larvas respecto a adultos, eliminación de las cabezas de las larvas, eliminación del carpaza de langostino (*Macrobrachium*), y de cangrejo (*Hypolobocera*).

Composición en Ácidos Grasos

La composición relativa de Ácidos Grasos Acido Palmitoleico (16:1 n7); Acido Oleico (18:1 n9) Acido Gamma-linolenico (18:3 n6) muestra que las Ácidos Grasos poliinsaturadas cubren más que la mitad del total.

Las especies de Coleópteros mas consumidas, la composición en AGs poliinsaturados más elevada. Especialmente las larvas de *Rhynchophorus* y *Metamasius* tienen valores muy elevados de Acido Palmitoleico (16:1 n7), Acido Oleico (18:1 n9), Acido Gamma-linolenico (18:3 n6). De hecho, en la costumbre nativa *Awajún* y *Ashaninka* es muy apreciada la sustancia grasa de estos gusanos, y se puede afirmar que los nativos elijen estos insectos por su excelente composición de AGs, que definen como su "vitamina".

3.2. Condición entero-parasitológica de los nativos

3.2.1. Parásitos del sistema gastrointestinal

La prevalencia general de parásitos intestinales en las comunidades resultó muy elevada: 53/76 (69,7%). En las tres poblaciones interesadas por el análisis copro-parasitológico se encontró una elevada prevalencia de enteroparásitos: 35-43% para los nematodos ("*nampich*" en *Awajún*), 35-61% para los protozoos y 3-29% para *Hymenolepis nana*. Los parásitos más frecuentes resultaron ser los protozoarios *Giardia lamblia*, *Blastocystis hominis*, *Entamoeba coli*, los nematodos *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma/Necator*, y el platelminto cestodo *Hymenolepis*.

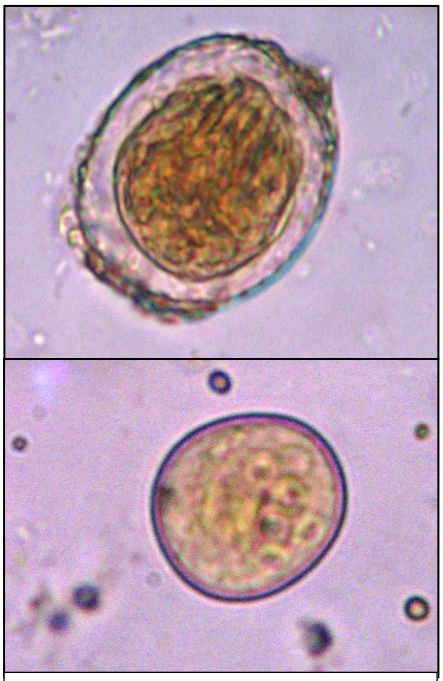


Fig 14. Huevo de *Hymenolepis n.* (arriba,) y quiste de *Entamoeba* (abajo).

La diversidad de parásitos resultó muy parecida entre los *Awajún* y *Ashaninka*, contrariamente los *Shipibo* residentes en Lima presentaron una menor numero de especies, una muy elevada frecuencia de *Hymenolepis* y una baja frecuencia de nematodos (figura 15). El bibaratismo en la muestra total es de 25%, y el tetraparasitismo es de 7,9%.

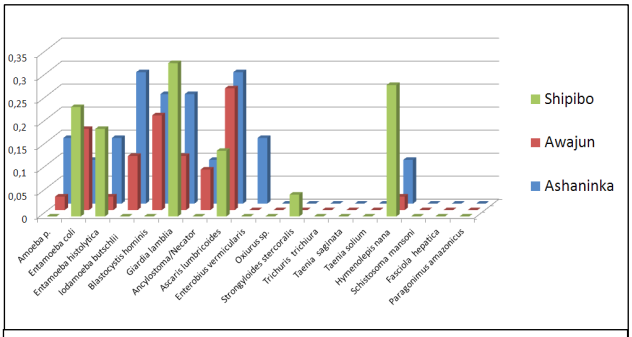


Fig 15. Prevalencias de enteroparásitos en las 3 comunidades.

A través el análisis de las heces son detectables también los trematodos *Schistosoma*, *Fasciola* y *Paragonimus* (parásitos no-intestinales que difunden sus huevos a través las heces), (Malek et al., 1985) en nuestro estudio no resultaron estas tres especies.

Contrariamente las informaciones recolectadas en el hospital Belem de Trujillo, y en la Posta Medica Alto Trujillo (Dr. Teodulo Santos) indican una prevalencia de parásitos intestinales muy baja (2-12%) en la costa urbanizada, menor respecto a lo encontrado en estudios científicos en otras esta área (Sánchez-Robles y Jara, 2010, 2011).

	Entamoeba coli	*Entamoeba histolytica*	*Blastocystis hominis*	*Giardia lamblia*	*Ancylostoma /Necator*
Ashaninka	0,095	0,142	0,238	0,238	0,095
Awajun	0,176	0,029	0,205	0,117	0,088
Shipibo, Lima	0,238	0,190	0	0,333	0

	Enterobius vermicularis	*Strongyloides stercoralis*	*Trichuris trichiura*	*Taenia sp.*	*Hymenolepis_nana*	*Schistosoma /Fasciola/Paragonimus*
Ashaninka	0,142	0	0	0	0,095	0
Awajun	0	0	0	0	0,0294	0
Shipibo, Lima	0	0,0478	0	0	0,285	0

Tabla 8. Prevalencias de parásitos contenientes quitina en las 3 comunidades.

3.2.2. Distribución y diversidad de parásitos contenientes quitina

Los nematodos resultan endémicos en las mayorías de los países mundiales, diferentemente las filarias y los trematodos resultan muy escasos (o ausentes) en la Amazonía peruana y, en general, en Sur America (Anexo 4). Las especies que contienen quitina son los protozoos *Giardia, Entamoeba histolytica*, y los macro-parásitos *Ancylostoma/Necator, Ascaris, Enterobius, Strogyloides, Trichiuris* e *Hymenolepis*.

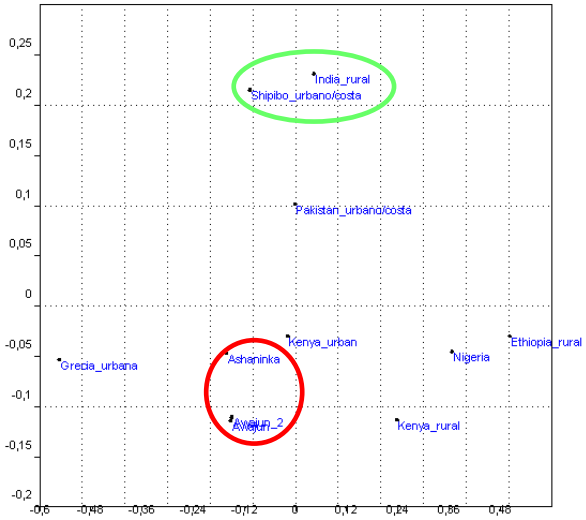


Figura 16. *Non-parametric Multidimensional scaling* relativo a las prevalencias de parásitos contenientes quitina. Matriz de similitud Rho. Stress: 0,1191.

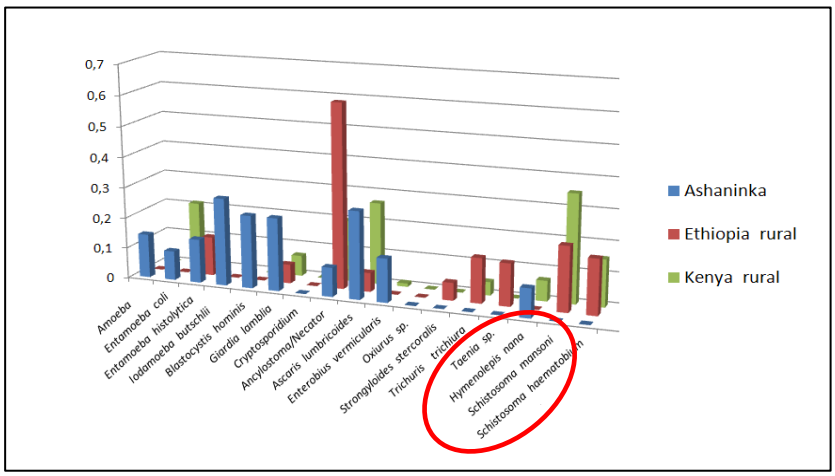


Figura 17. Prevalencia de parásitos en *los Ashaninka*, Etiopia y Kenya Rural. En rojo los platelmintos, ausentes o raros en los Amerindios.

El Neighbour-joining clustering y Cluster análisis muestra que la condición parasitológica descrita en los *Awajún* y los *Ashaninka* es similar a la encontrada en el estudio realizado por Ibáñez et al. (2004) en una amplia muestra de población *Awajún* del Dpto. de Amazonas (en figuras 16, 18, 19: "Awajún_2"). Contrariamente, los *Shipibo* se encuentran muy cerca de otras poblaciones urbanas o rurales de los trópicos, que tienen evidentemente menores prevalencias de enteroparásitos. Otro aspecto relevante es la muy baja prevalencia (o ausencia) de trematodos y filarias en las poblaciones Amerindias (Figura 17).

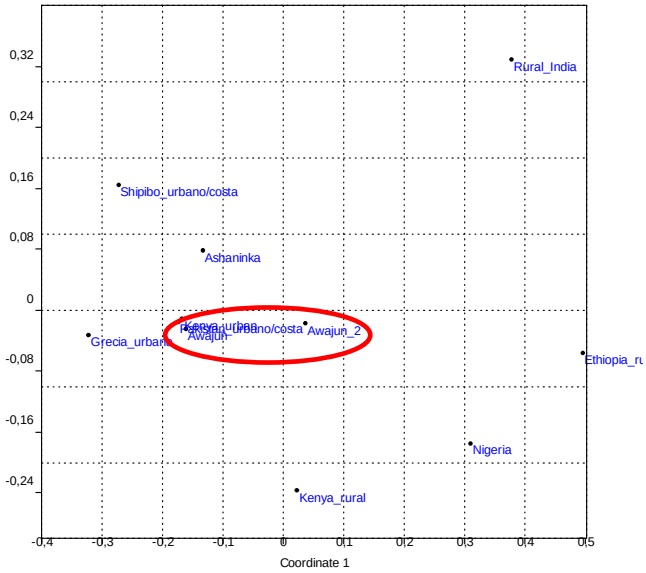
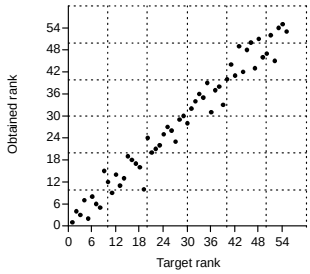
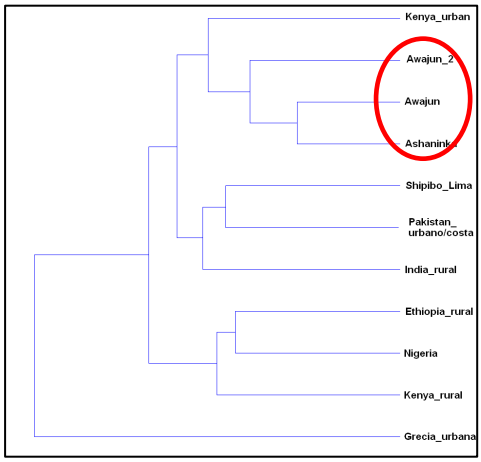


Fig. 18. Non-parametric Multidimensional scaling con relativo a la prevalencia de helmintos. Matriz de similitud Euclidean. Stress: 0,08102. En rojo están marcados los pueblos *Awajún* y *Ashaninka*.





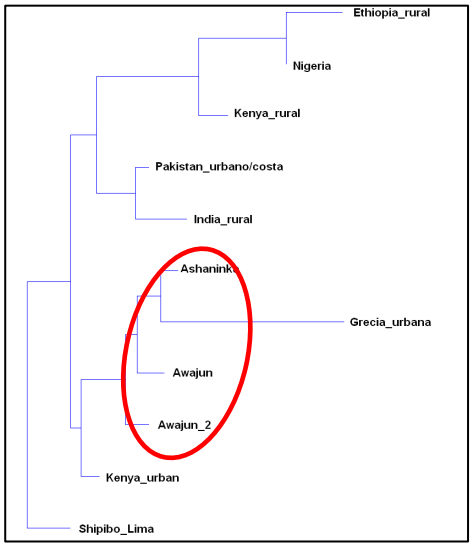


Fig. 19. Análisis de similitud basada en las prevalencias de parásitos (protozoarios y helmintos) contenientes quitina. Lado izquierdo: Cluster análisis, matriz de similitud: Bray-Curtis. Lado derecho: Neighbour-joining clustering, matrix de similitud: Rho.

Las informaciones presentes en GIDEON (Figura 24, pag. 54) han confirmado la ausencia de *Schistosoma*, *Fasciola* y *Taenia.* Las infecciones causadas por estos parásitos son llamadas zoonosis: su ciclo de vida depende uno o dos organismos huéspedes intermedios (gasterópodo de agua dulce, gasterópodo-rumiante y cerdo/rumiante, respectivamente). La ausencia de animales domesticados en contextos indígenas amazónicos ha limitado, hasta el día de hoy la presencia de estos parásitos en el Perú amazónico, que han sido descritos en raros casos (Ibáñez et al., 2004, 2008). La ausencia de filariasis (nematodos parásitos de diferentes tejidos) es claramente documentada en GIDEON.

3.3. Estudio genético

Las comunidades nativas visitadas se presentaron bastante variables en dimensión y dispersión del poblado, las más grandes llegan a los 300 habitantes y las menores tienen menos de 50 individuos. Asentamientos de este ultimo tipo, constituidos esencialmente por familias alargadas, o clan familiares, han representado la forma organizativa principal entre los *Awajún*, hacia los años '70. Los presidios médicos resultan ausentes, en las escuelas hay profesores nativos bilingües, y también peruanos de idioma castellano. Muchos niños, y los más ancianos, no hablan el castellano. Los casamientos entre nativos residentes en diferentes comunidades de la misma etnia resultaron frecuentes, y los casamientos con colonos andinos muy raros.

3.3.1. *Chitotriosidase*

Los resultados sobre el alelo H (Ha), que causa la deficiencia enzimática de *Chitotriosidase*, son reportados en la siguiente tabla y muestran una frecuencia muy elevada de la variante inactiva en los Amerindios: 0,47, la segunda a nivel mundial después de la población Chinese *Han* (0.58), y más alta que en los Europeos (ej. Sicilia: 27%; Holanda: 23%) (Piras et al., 2007). Los *Shipibo* presentaron la frecuencia mas elevada (0,61), seguidos por los *Ashaninka* (0,58) y los *Quechua-Cusco* (0,50).

Este dato es muy relevante considerando nuestras premisas en que se planteó la hipótesis de una elevada funcionalidad de las Quitinazas en los Amerindios, y

sobretodo en los Amazónicos, donde fue verificado un estilo de vida tradicional y una elevada prevalencia de parásitos intestinales. Además, las frecuencias de los tres genotipos (Ha/Ha, Ha/WT, WT/WT) resultaron respectar el equilibrio de Hardy y Weinberg, excluyendo la presencia de selección natural contra el fenotipo enzimáticamente inactivo ni contra el fenotipo activo.

Población	Subjs.	H alelo Frec.	H alelo Frec. (%)	WT/WT	WT/Ha	Ha/Ha	H-W X^2	HWE valor *P*
Awajún	26	19/52	36.54	11	11	4	0.200	0.655
Ashaninka	12	14/24	58.33	2	6	4	0.010	0.921
Shipibo	22	27/44	61.36	3	11	8	0.065	0.798
Quechua-Lamas	16	11/32	34.37	6	9	1	0.974	0.324
Quechua-Cusco	9	9/18	50.00	2	5	2	0.111	0.739
Total Amazonicos	60	60/120	50.00	16	28	16	0.267	0.606
Total Quechua	25	20/50	40.00	8	14	3	0.694	0.405
Amerindios de Perú	85	80/170	47.06	24	42	19	0.006	0.939
Controles	50	27/100	27.00	29	15	6	2.855	0.091

Tabla 9. Resultados relativos a la duplicación de 24 bp, frec. Alélica, frec. De los genotipos y frec. Esperadas por el equilibrio de Hardy y Weinberg (HWE).

La población peruana presenta la mayor desviación, aún no significativa (p = 0,091), de los valores esperados por el equilibrio de Hardy y Weinberg. De hecho la comparación entre casos y controles, normalizada en base al grado de parentesco, resultó significativa en ambas comparaciones: por dieta (p = 0.013785) y etnicidad (p = 0.003298). Pero, la frecuencia mas elevada del alelo WT en los controles puede ser causada por el mestizaje genético que interesó la población de la costa peruana en los últimos siglos, y recientemente probado también a nivel genético (Galader et al., 2012).

3.3.2. *Acidic Mammalian Chitinase*

El gen *CHIA* se presenta muy homogéneo, con un elevado grado de homocigosidad en las 5 poblaciones amerindias analizadas, los controles presentaron mas variabilidad y mayor numero de individuos heterocigotos en los *loci* variables genotipizados.

Variantes funcionales del exón 4

El genotipo encontrado a nivel del exón 4 resultó ser "AGG", el *wild-type* en todas poblaciones humanas, conservado en los Amerindios y en los controles (96%). Especificadamente, el exón 4 codifica el dominio catalítico del gen y el haplotipo "AGG" causa tres sustituciones amino-acídicas que causan pérdida de funcionalidad enzimática respecto al haplotipo raro "GAT" (Olland et al 2009). En nuestra muestra resulto el genotipo "GAT", muy raro en los Amerindios como también en el grupo control (5%). Notablemente, la isoforma codificada por el genotipo "AGG" mantiene el optimo de actividad catalítica a nivel de pH 4,6 (típico de los lisosomas), pero se reduce a pH 2, y se pierde a pH 7, afectando la actividad quitinolítica a nivel de estómago y pulmones, respectivamente (Seibold et al. 2009).

Tabla 10. Análisis realizadas para el gen *CHIA*, regiones de interés, variantes, alelos, función conocida, frecuencias en las poblaciones de Perú.

Region del gen	SNP	Alelo ancestral	WT Humanos	WT Amerindios	Funcion	Fecuencia Alelo derivado						
						Awj	Ash	Shp	QuL	QuC	Amerindios	no-etnicos
Promotor	rs12023321 rs12033184 rs35042265	G C T	T A C	G A T	expresión del gen, efecto no determinado	38/38	25/26	38/42	24/26	18/18	143/150 (95%)	41/58 (70,1%)
Exón 4	rs41282492 rs41282494 rs41282496	G A T	A G G	A G G	dominio catalítico, reducida actividad a pH 2 y 7	38/38	25/26	39/42	24/26	18/18	144/150 (96%)	75/78 (96%)
Exón 12	rs2256721	G	G	T	sitio de enlace ala quitina, efecto no determinado	4/4	10/10	12/14	7/10	4/4	37/42 (93%)	23/32 (65,5%)

3.3.2.1 Haplotipos de CHIA

De los 9 individuos en que fue analizado todo el gen, 8 resultaron idénticos por la región codificante, 7 de los cuales resultaron idénticos también a nivel del promotor. Un individuo de origen *Shipibo* presentó las variantes del promotor en heterocigosis, y uno *Lamas* se presentó en estado de heterocigosidad por 13 *loci* variables.

Como ya descrito, la variante no-sinónima "AGG", del exón 4 presenta el alelo WT de los humanos en los Amerindios y en los Peruanos (96%). Contrariamente, los polimorfismos del promotor presentan las variantes raras en estado de elevada homocigosidad, y en neta asociación con las variantes del exón 4, solamente el los Amerindios (95%).

De hecho, en la población control, el promotor resulta más variable con 9 individuos de los 29 analizados por el promotor resultaron heterocigotos, y 4 homocigotos por el haplotipo WT. La frecuencia del haplotipo amerindio resulto más baja en los controles (69,5%). De igual manera, la sustitución G1452T (rs2256721) del exón 12 es confirmada en una muestra de reducida de Amerindios (93%) y controles (65,5%).

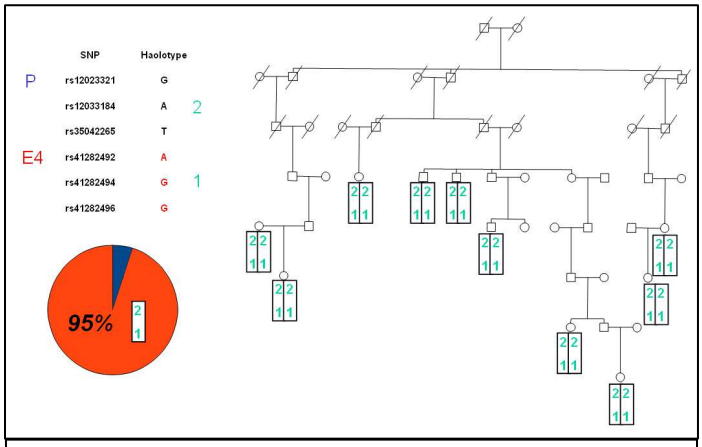


Figura 20. Familia de origen *Awajún* con elevada conservación del haplotipo amerindio relativo al promotor y al exon 4.

En el anciano *Lamas* (10299) fue encontrada una neta heterocigosidad por diferentes variantes a lo largo de todo el gen, confirmada a nivel de promotor y exón 4 en 3 sujetos *Shipibo* menores de 10 años, nacidos en Lima (figura 21). Esto sugiere que estos individuos lleven un complemento cromosómico Amerindio con el haplotipo "GAT-AGG", y otro de origen muy diferente que lleva el haplotipo raro "TAC-GAT" (respectivamente 2-1 y 1-2 en figura 21). En la población control se encuentra también a diferentes haplotipos relativos al promotor-exón4: TAC-AGG (1-1) y GAT-GAT (2-2). Considerando que el primero haplotipo resulta ser el más frecuente en la mayoría de las poblaciones humanas, excepto que en los Amerindios, y el segundo es presente principalmente en poblaciones africanas, estas combinaciones pueden ser fruto de cruzamientos genéticos recientes con individuos de diferentes orígenes. En la población amerindia fue encontrado en un solo caso un haplotipo 1-1, en un sujeto *Shipibo*.

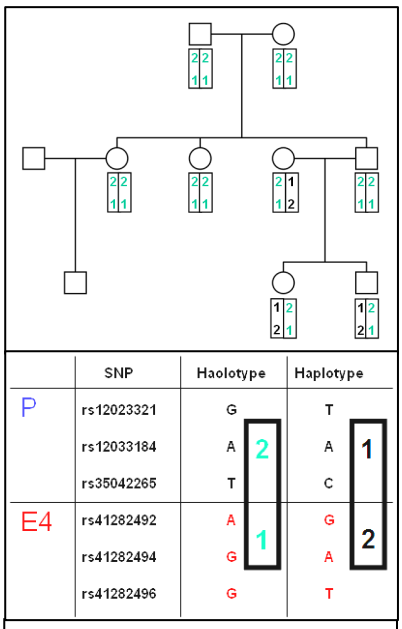


Figura 21. Familia *Shipibo* que presenta el haplotipo raro promotor (P) exón 4 (E4) en sujetos de las ultimas generaciones.

El CC-QLS test ha detectado una diferencia significativa para el promotor en las comparaciones por etnicidad (étnicos VS no-étnicos, p = 0.000020), o por dieta

(Amazónicos + Lamas VS. controles + Quechua-Cusco; p = 0.001513) solamente por el haplotipo del promotor (Anexo 9: marcador 2: rs12033184).

3.3.2.2. Variabilidad de *CHIA* en el Hombre

El gen *CHIA* presenta 21 *loci* variables: 11 en la región codificante, y 10 en el promotor. Nueve de estas variantes (8 en la región exónica y 1 en el promotor) presentan, en las diferentes poblaciones humanas consideradas, una baja variancia de la frecuencia alélica ($v \leq 0{,}01$; $\sigma \leq 0{,}10$) y frecuencias del alelo raro ≤ 0,10. Por ejemplo, 2 SNP no-sinónimos del exón 4 (rs41282492, rs41282496) presentan el alelo derivado fijado en todas las poblaciones humanas, siendo esencialmente una ganancia evolutiva de la especie humana. De hecho estas variantes tienen frecuencias cuasi idénticas en los Amerindios y en los controles (≈ 95%). Estas fueron excluidas de los siguientes análisis resultando esencialmente conservados en los Humanos.

region del gen	Variante	Alelo ancestral	AFR			EUR					ASN			AMR			Perù
			ASW	LWK	YRI	CEU	FIN	GBR	IBS	TSI	CHB	CHS	JPT	CLM	MXL	PUR	Amerindios
Promotor	rs12023321	**G**	0,27	0,17	0,23	0,43	0,44	0,51	0,39	0,46	0,69	0,76	0,63	0,53	0,69	0,57	**0,95**
Promotor	rs12033184	**C**	0,73	0,83	0,77	0.57	0,56	0,49	0,61	0,54	0,31	0,25	0,37	0,48	0,31	0,43	**0,05**
Promotor	rs35042265	**T**	0,27	0,17	0,23	0,43	0,44	0,51	0,39	0,46	0,69	0,76	0,63	0,53	0,69	0,57	**0,95**
Promotor	rs4546919	**T**	0,70	0,82	0,76	0.57	0,56	0,49	0,61	0,54	0,31	0,25	0,37	0,48	0,31	0,43	**0,05**
Promotor	rs4554721	**G**	0,70	0,82	0,76	0.57	0,56	0,49	0,61	0,54	0,31	0,25	0,37	0,48	0,31	0,43	**0,05**
Promotor	rs4442363	**C**	0,70	0,82	0,76	0.57	0,56	0,49	0,61	0,54	0,31	0,25	0,37	0,48	0,31	0,43	**0,05**
Promotor	rs11102235	**G**	0,73	0,83	0,77	0.57	0,56	0,49	0,61	0,54	0,31	0,25	0,37	0,48	0,31	0,43	**0,05**
5'UTR	rs34698010	**--**	0,70	0,82	0,76	0.57	0,56	0,49	0,61	0,54	0,31	0,25	0,37	0,48	0,31	0,43	**0,05**
5'UTR	rs12026825	**G**	0,70	0,82	0,76	0.57	0,56	0,49	0,61	0,54	0,31	0,25	0,37	0,48	0,31	0,43	**0,05**
Exón 10	rs2275253	**G**	0,80	0,75	0,79	0,77	0,67	0,65	0,79	0,77	0,37	0,44	0,47	0,58	0,41	0,53	**0,06** *
Exón 11	rs2275254	**T**	0,66	0,79	0,72	0,34	0,42	0,46	0,29	0,33	0,76	0,66	0,60	0,59	0,69	0,58	**0,94** *
Exón 12	rs2256721	**G**	0,79	0,75	0,78	0,77	0,67	0,65	0,79	0,77	0,37	0,44	0,48	0,58	0,41	0,52	**0,07**

Tabla 11: Son representados los polimorfismos con elevada variabilidad en los Humanos ($\sigma > 0{,}10$). Las frecuencias reportadas son relativas al alelo ancestral. En rojo las 3 variantes exonicas non-sinónimas, de las cuales, dos (*) presentan las frecuencias encontradas en los 9 ancianos nativos (complementos: 17/18; frec. 94%).

Contrariamente, 12 *SNPs* (de los cuales 3 exónicos no-sinónimos, 2 en el 5'UTR y 7 en el promotor) presentaron frecuencias muy variadas (σ = 0,16-0,17), con las mas evidentes diferencias entres las poblaciones africanas y las poblaciones asiáticas/centro americanas (ver Tabla 11). Por ejemplo, el la sustitución G1452T (rs2256721, figura 22,A), presenta una elevada variabilidad de la frecuencia alélica en las poblaciones humanas mundiales, y en los Amerindios resulta ser fijado el alelo derivado "T".

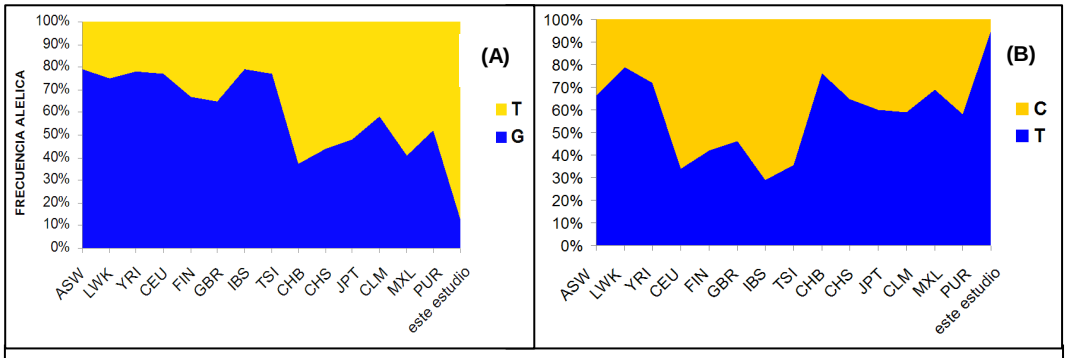


Figura 22. Son representadas la variabilidad de las frecuencias alélicas en las poblaciones humanas de Ensembl database. A) variación del polimorfismo non-sinónimo rs2256721 (exón 12, G1452T, Gly432Val): donde "G" es el alelo ancestral, que es muy raro en los Amerindios (12%). B) variación del polimorfismo re2275254 (del exón 11, T1218C, Phe354Ser), que resulta muy frecuente en los Centroafricanos y en los Amerindios, y raro en los Europeos.

Notablemente, el SNP rs35042265, localizado en el promotor, presenta una elevada variabilidad de la frecuencia alélica en las poblaciones humanas mundiales, y en los Amerindios resulta ser conservado el alelo ancestral. Notablemente, en los Amerindios de Perú, resulta conservado el alelo ancestral por 3 de estos *loci* variables (1 en el exón 11 y 2 en el promotor), y fijado el alelo derivado por las restantes 9 (2 exónicas, 2 al 5'UTR y 5 en el promotor). Solamente un SNP missense: rs2275254 (T1218C, Phe354Ser, figura 22, B), en el exón 11, presenta valores elevados del alelo ancestral en los Africanos y Amerindios, y del alelo derivado en las poblaciones europeas y asiáticas.

Poblaciones			AFRICANOS			EUROPEOS					ASIATICOS			AMERICANOS			
			ASW	LWK	YRI	CEU	FIN	GBR	IBS	TSI	CHB	CHS	JPT	CLM	MXL	PUR	Perù Amerindios
AFR	ASW	0,27															
	LWK	0,17	0,01														
	YRI	0,23	0,00	0,00													
EUR	CEU	0,43	0,03	0,08	0,05												
	FIN	0,44	0,03	0,09	0,05	0,00											
	GBR	0,51	0,06	0,13	0,08	0,00	0,00										
	IBS	0,39	0,02	0,06	0,03	0,00	0,00	0,01									
	TSI	0,46	0,04	0,10	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00								
ASN	CHB	0,69	0,18	**0,27**	**0,21**	0,07	0,06	0,03	0,09	0,05							
	CHS	0,76	**0,24**	**0,35**	**0,28**	0,11	0,11	0,07	0,14	0,09	0,00						
	JPT	0,63	0,13	**0,22**	0,16	0,04	0,04	0,01	0,06	0,03	0,00	0,00					
AMR	CLM	0,53	0,07	0,14	0,09	0,01	0,01	0,00	0,02	0,00	0,03	0,06	0,01				
	MXL	0,69	0,18	**0,27**	**0,21**	0,07	0,06	0,03	0,09	0,05	0,01	0,00	0,00	0,03			
	PUR	0,57	0,09	0,17	0,12	0,02	0,02	0,00	0,03	0,01	0,01	0,05	0,00	0,00	0,01		
	Perù Amerindios	0,95	**0,49**	**0,62**	**0,54**	**0,32**	**0,31**	**0,25**	**0,35**	**0,30**	0,11	0,07	0,15	**0,23**	0,11	**0,20**	
frec. Alelo ancestral ↑→ de rs12023321, rs35042265, rs11102235			0,27	0,17	0,2	0,43	0,44	0,51	0,39	0,46	0,69	0,76	0,63	0,53	0,69	0,57	0,95

Tabla 12. Fst por pares de poblaciones entre los Amerindios y las 14 poblaciones de ENSEMBL de los polimorfismos rs12023321, rs35042265, rs11102235, localizados en el promotor.

El Fst por pares de poblaciones resulta ser elevado por las 12 variantes, especialmente para los polimorfismos rs12023321, rs35042265, rs11102235 del promotor (Tabla 12), donde el alelo ancestral es todavía el más frecuente en la mayoría de las poblaciones y solamente en los Amerindios de Perú se ha fijado el alelo derivado. Las variantes asociadas rs35042265, rs12023321, presenta frecuencias idénticas a estas, pero del alelo ancestral, o sea el derivado es el mas frecuente en los Africanos, y el ancestral es mayormente conservado en los Asiáticos y en los Amerindios de Perú.

4.0. DISCUSION

Quitina y dieta

Este estudio permitió de evaluar la relevancia estratégica y nutricional para los nativos de un recurso neglecto como son los artrópodos. Como sostienen diferentes autores (Hill et al., 1984; Dufour, 1987; Carbonell F. y M. D'arrigo, 1997), en la época de lluvia la pesca y la caza resultan improductivas y los Amerindios Amazónicos basan en insectos y crustáceos parte relevante de su dieta. Nuevas especies nunca reportadas como alimentos en poblaciones humanas son los himenópteros *Crematogaster stollii*, *Polybia platycephala y Polybia furnaria*.

Las características ecológicas de estos recursos son obviamente muy variables, algunas especies tienen una marcada estacionalidad, pero, la mayoria son muy accesibles todo el ano y presentes en proximidad de las comunidades. También han sido relevadas formas de manejo sostenible de estos recursos, como es el caso del *suri* y del caracol de río (en *Awajún*: "*tzuntsu*"). Los insectos más consumidos son los que contienen menor cantidad de quitina, como las larvas, que parecen ser elegidos por su tenor en grasas. A demás, muchos sujetos eliminan las partes mas coriáces (quitinosas) de los artrópodos, indicando un bajo interés por esta componente.

La cantidad de quitina ingerida por los nativos puede ser estimada entre 5-10 g/día, considerando un concentración de quitina entre 5-10% en los artrópodos consumidos (80-130g/día) (Bukkens, 2004). A pesar que la ingestión de quitina sea muy elevada respecto al costumbre moderno, el *Acidic Mammalian Chitinase* en los Amerindios presenta el haplotipo WT en los humanos, que presenta baja funcionalidad a nivel de estomago (pH 2). Por lo tanto, este genotipo de *CHIA*, no parece llevar ninguna predisposición a disturbos alimentares debidos a la quitina.

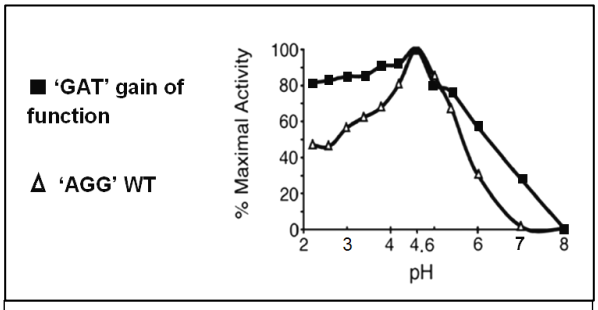


Figura 23. Actividad enzimática de los dos haplotipos, "AGG" y "GAT", según el estudio de Seibold et al. (2009).

Sin embargo, la ingestión de quitina resulta mas elevada respecto a poblaciones europeas y, en lugar de una adaptación genética, los Amerindios pueden haber desarrollado una flora intestinal especializada en metabolizar la quitina (Šimůnek et al., 2002). Como demostrado en poblaciones rurales de Burkina Faso

(DeFilippo et al., 2010) y de la Amazonía (Contreras et al., 2010), dietas ricas en fibras caracterizan profundamente la diversidad taxonómica y funcional de los microbios simbiontes. Estudios sobre la meta-genómica (genómica de los microorganismos) ya describieron patrones de microorganismos intestinales muy específicos en mamíferos insectívoros (Koropatkin et al., 2012). Es reconocido que el efecto de la quitina y de la flora microbiana relacionada, es desinflamante para las mucosas intestinales, y la dieta amazónica puede favorecer esta condición en los nativos.

Interacción con parásitos contenientes quitina

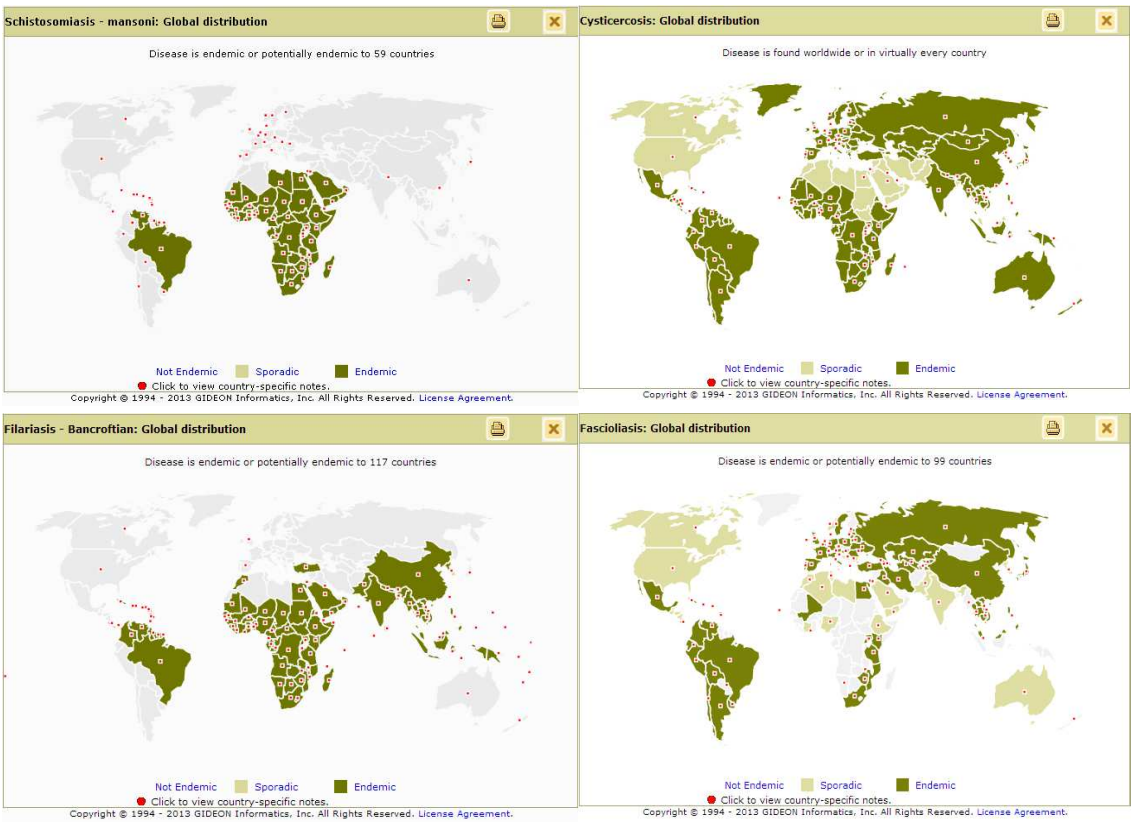
Los helmintos encontrados en el presente estudio abundan en las regiones tropicales del planeta, sobretodo en áreas rurales de países tropicales. *Ancylostoma duodenale, Necator americanus, Ascaris lumbricoides* y *Trichuris trichiura* infectan el intestino del huésped, y de allí pasan los huevos al exterior en las heces. Larvas *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus* por la piel del huésped, y cumplen una migración a través de los pulmones antes de llegar al intestino. *Ascaris lumbricoides* y *T. trichiura* se transmiten por vía oral, luego cumplen una migración rapida a través de los pulmones y el último desarrollo es enteramente en una la mucosa intestinal. La infección por estos helmintos es crónica y asintomática, con vidas máximas individuales de meses o de años. De hecho, las patologías mediadas por estos helmintos son relativamente limitadas: síntomas manifiestos son por lo general poco frecuentes, todavía, en los niños pueden causar crecimiento o desarrollo cognitivo reducido. En las comunidades visitadas, según la percepción de los nativos, las consecuencias dañinas de las enteroparasitosis, son la diarrea (en *Awajún*: "*ijag*"), y la diarrea mucoso-sangrienta ("*shiip*"), probablemente asociadas a casos de poliparasitismo. Hay también que considerar que los helmintos intestinales inducen niveles de IgE muy elevados en poblaciones amerindias, que no serian tolerados en poblaciones europeas, sugierendo que hay un elevado grado de co-evolución con estos paraitos, que deben estimular una fuerte componente regulativa en los Amerindios (Blakwell et al., 2011).

La presencia de *Ascaris, Enterobius, Necator* ha sido relevada en copro-lítos de los primeros colonizadores de las Américas, y de Sur America y resultan ser marcadores de población útiles a la reconstrucción de las migraciones humanas en las Américas (Araújo et al., 2008; Carvalho et al., 2008). Estos autores también proponen que el pasaje del Hombre por Bering y la permanencia en áreas temperadas-frías hayan condicionado la trasmisión de helmintos parásitos (Araujo et al., 2008), y que

algunos nematodos deben haber llegado a las Américas en migraciones humanas relativamente recientes, realizadas por barco à latitudes menores. Es también probable que se hayan conseguido trasmitirse las especies que utilizan la infección directa oral-fecal, reduciendo o perdiendo su fase libre, y que hayan evolucionado hacia una relación asintomática y durable con el huésped, reduciendo la severidad de las infecciones. Esta condición de elevada co-evolución puede haber actuado por 5-30 mil años y haber producido una relación de comensalismo entre los nematodos intestinales y los nativos peruanos.

Una dimensión muy importante en las infecciones por helmintos es la activación del la reacción inmunitaria humoral Th2, que, bajo la influencia de interleuquinas (IL-4, IL-13 e IL-21) induce la diferenciación de un particular fenotipo de macrófagos: los macrófagos activados alternos (Kreider et al., 2007; Rodriguez-Sosa et al., 2002). Estos macrófagos son reclutados al sitio de infección (Taylor et al., 2006) y actúan fuertes propiedades anti-inflamatorias y sobre expresas particulares genes como *Arginase-1*, *Ym1* (proteína *Chitin-binding*), *FIZZ1* y *CHIA* (Nair et al., 2005; Anthony et al., 2007), que son implicados en la reparación de las matrices

Figura 24. Distribución mundial de helmintos *Schistosoma, Taenia,* filarias, y *Fasciola* según el base de datos GIDEON. Cisticercosis causadas por *Taenia solium* o fascioliasis resultan presentes solamente en áreas rurales de costa y sierra, donde hay presencia de cerdos y rumiantes.



extracelulares, la cicatrización de heridas y fibrosis. Las especies que habitan en los tejidos (histozoicas) como *Schistosoma* (Hoffmann et al., 2002) y las filaria (Rachel et al., 2001) causan respuestas fibróticas Th2-dependientes: granulomas cubren los huevos de *Schistosoma* sp. (Pearce and MacDonald, 2002), fibrosis debidas a la infección de *Onchocerca* pueden estar asociadas con migraciones microfiláricas, y en todas las infecciones por *Onchocerca* se producen nódulos que encierran los adultos (Okulicz et al., 2004). A demás, Trematodos y Cestodos causan infecciones más severas y crónicas respecto a los nematodos encontrados en las comunidades, sobretodo *Schistosoma* y *Fasciola*, y la misma *Taenia solium* (cisticercosis), pueden enquistarse produciendo estructuras de proteinas y quitina, en órganos vitales como el cerebro y el hígado, que supuestamente requieren Quitinazas enzimáticamente activas para ser erradicadas. Especialmente el papel de *CHIA* es de evidente relevancia en la interacción con estos parásitos (Anthony et al., 2007; Allen y Maizels, 2011), que, pero, resultan raros o ausentes en la Amazonía de Perú (Ibáñez et al., 2004).

***Chitotriosidase*: elevada frecuencia de la variante inactiva**

Los datos parasitológicos disponibles no permiten realzar análisis de correlación entre el genotipo de *CHIT1* y las parasitoses en la muestra, sin embargo la deficiencia de *Chitotriosidase* es absolutamente alta y superior respecto a los controles, por lo tanto se puede deducir que los enteroparásitos contenientes quitina encontrados no están actuando presión selectiva hacia una *Chitotriosidase* funcional (53%) en los Amerindios. También podemos descartar que en la población peruana de control conserve una *Chitotriosidase* funcional (WT frecuencia: 73%) en respuesta a la presión de los enteroparásitos, que son escasos en las zonas urbanas. Más bien, el mestizaje con los Europeos y los Africanos puede haber originado elevadas frecuencias del alelo WT en los Peruanos no-étnicos. Las frecuencias observadas soncomparables con los valores espectados por el equilibrio de Hardy-Weinberg, de igual manera los controles, sugiriendo una falta de selección para la variante activa.

Como representado en el mapa arriba (figura 25), la frecuencia de la duplicación de 24 pb en nuestro estudio es parecida a las frecuencias encontradas en las populaciones más cercanas, los Asiáticos, sugierendo que la deficiencia enzimática es conservada en los Amerindios peruanos por efecto del fundador. La frecuencia de los homocigotos por la duplicación de 24 pb entre los nativos peruanos es mayor que la frecuencia encontrada previamente entre las poblaciones africanas que presentan tasas elevadas

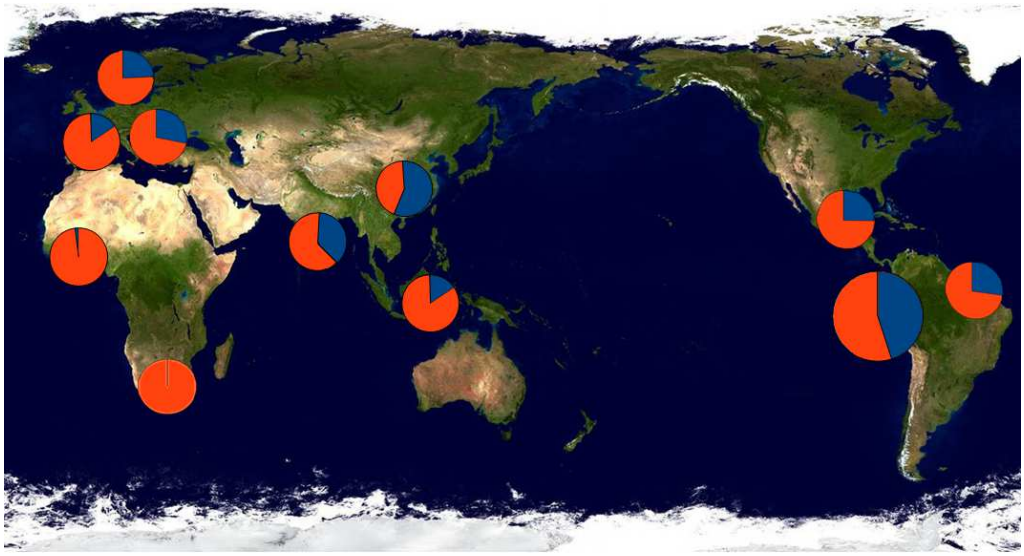


Figura 25. Distribución mundial de la duplicación de *CHIT1* (en color azul la mutación, en rojo el WT). Las frecuencias reportados se refieren a los siguientes países: Burkina Faso (WT freq.: 98%)(Malaguarnera et al., 2003), South Africa (100%)(Arndt et al., 2013), Paìs Bascos (88%)(Piras et al., 2007), Holland (77%)(Boot et al., 1998), Sicily (73%)(Piras et al. 2007), India (60%)(Choi et al., 2001), Papua Nueva Gunea (88%)(Hise et al., 2003), Chinese Han, Taiwan (42%)(Chien et al., 2005), Mexico (76%)(Juárez-Rendón et al., 2012), Brasil (74%)(Adelino et al., 2010) y Amerindios de Perù (52,45%).

de infecciones intestinales. Teniendo en cuenta que los primeros habitantes del Nuevo Mundo descienden de poblaciones del este de Asia entre 6 y 30 KY antes del presente, es plausible que la duplicación (> 40%) esté conservada en todas las poblaciones Amerindias de Sur America. Esta condición podría también sugerir que *Chitotriosidase* aún mantenga una función quitinolítica contra algún parásito, por ejemplo fungi (Hall et al., 2008), conservando la forma activa en aproximadamente el 50% de la población.

***Acidic Mammalian Chitinase*: presencia de presión selectiva?**

Los Amerindios poseen el haplotipo WT del exón 4 en los Humanos, que reduce la actividad enzimática a nivel de estomago (pH 2), y la anula a nivel de pulmones (pH 7). Todavía, otras regiones del gen presentaron en estado de fijación muchas sustituciones con frecuencias < de 60% en las demás poblaciones mundiales.

El genotipo encontrado en la parte exonica (representado por el haplotipo de 8 SNPs no-sinónimos) ha sido descrito a nivel genético y funcional, y resulta ser el WT en los Mexicanos (63,9%) y Puertorriqueños (44,1%) (Seibold et al., 2009) (Figura, 26). Notablemente, algunas de las variantes del haplotipo descrito en Seibold et al. (2009) resultan descritas en las poblaciones amazónicas Surui y Karitiana, donde

resultan en estado de fijación casi completa (frecuencia 98-100%) (UCSC-GenomeBrowser Human Genome Diversity Project) (Figura 27).

El particular patrón de diversidad genotípica descrito por rs2275254 (T1218C), que presenta valores elevados del alelo ancestral en los Africanos y Amerindios, y del alelo derivado en las poblaciones europeas (figura 27, lado derecho), ha sido precedentemente descrito por alelos exonicos funcionales (Coop et al., 2009). De hecho esta distribución coincide con la distribución latitudinal de los principales determinantes ambientales de la distribución de enteroparásitos (temperatura, humedad, condiciones higiénicas), y se encuentra con buena probabilidad bajo presión selectiva.

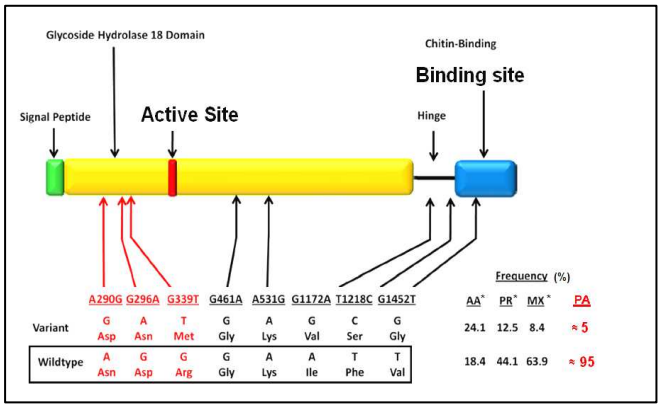


Figura 26. Modelo del gen *CHIA* (modificado de Seibold et al. 2009) y del haplotipo de 8 *SNPs missense*: son representados el WT y la variante *gain-of function* descritos en Centro Americanos; en rojo los 3 SNPs funcionales localizados en el exón 4. Abreviaciones: AA por Afro Americanos, MX por Mexicanos, PR por Puertorriqueños, y PA por Amerindios peruanos del presente estudio.

Notablemente, hay muchas sustituciones raras en los Africanos, que presentan frecuencias elevadas en los Asiáticos y completan su proceso de fijación en los Amerindios (93-95%). A demás, hay que notar que la duplicación del gen *CHIT1* no llegó a fijarse en los pueblos indígenas, diferentemente a las variantes del gen

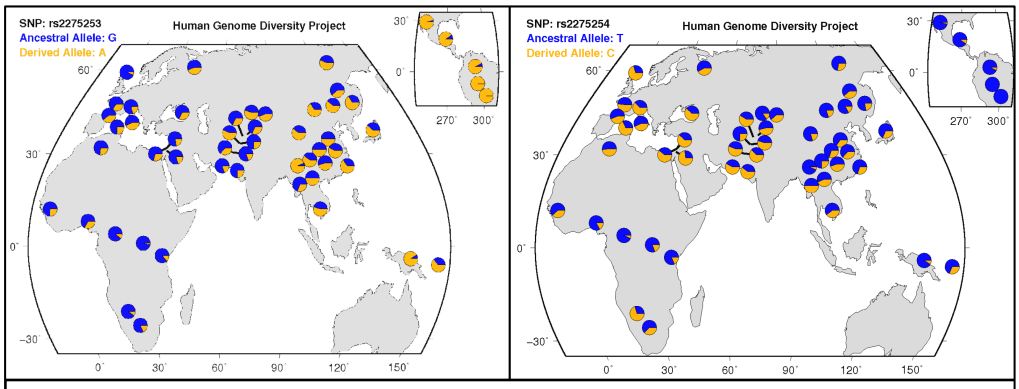


Figura 27. Variabilidad en el hombre de las frecuencias alélicas en las poblaciones humanas de Ensembl, representada en forma de mapa, generada por UCSC-GenomeBrowser, Human Genome Diversity Project. Al lado izquierdo se encuentra el polimorfismo non-sinónimo rs2275253 (G1172A, Val339Ile, exón 10) donde "G" es el alelo ancestral. Al lado derecho el polimorfismo re2275254 T1218C, Phe354Ser, del exón 11, que resulta muy frecuente en los Centroafricanos y en los Amerindios, y raro en los Europeos.

CHIA (ej. rs2275253 del exón 10) que resultan casi completamente fijadas en los Amerindios peruanos.

Al mismo tiempo, hay que considerar que los polimorfismos no-sinónimos (rs2275253, rs2275254, rs2256721), y los localizados en el promotor (rs35042265, rs12023321 y rs4442363), presentan un grado muy elevado de fijación (Fst) entre pares de poblaciones, y no se puede excluir que un factor de selección natural esté en acto, acelerando el proceso de fijación de estos alelos, respecto a la duplicación de *CHIT1* (Fig. 28).

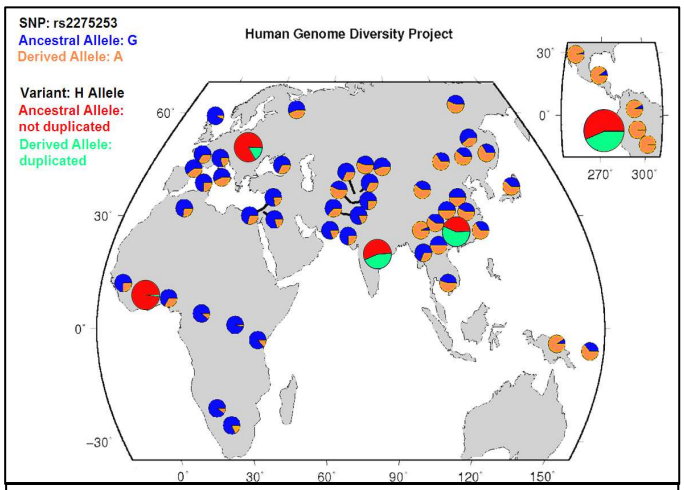


Figura 28. Mapa de GenomBrowser modificado. Representa la distribución del polimorfismo non-sinónimo rs2275253 (G1172A, Val339Ile, exón 10) donde "G" es el alelo ancestral; y en verde y rojo estan representadas la frecuencia de la duplicación de *CHIT1* y el WT, respectivamente.

Aún la función de estos polimorfismos resulte desconocida, en recientes estudios los polimorfismos no-sinónimos rs2275253, rs2275254, rs2256721, son asociadas a fenotipos asmáticos en Centro Americanos y Europeos (Seibold et al. 2009, Heinzmann et al., 2010). Notablemente, estos polimorfismos presentan una relevante correlación con variantes genéticas de citokinas (IL-4 y IL-13), demostrando un papel relevante en la respuesta inmunitaria humoral Th2 (Heinzmann et al., 2010). En los Amerindios es probable que estas variantes puedan tomar parte a la resistencia/tolerancia con macroparásitos intestinales.

Estas consideraciones aparentemente paradoxales toman fuerte sentido bajo el modelo de la "Hipótesis de la Higiene", que sostiene que la reducida exposición a parásitos en condiciones de vida moderna pueda causar disfunciones inmunológicas como alergias, asma y síndromes autoinmunes (Yazdanbakhsh et al., 2002). Más especificadamente, la Hipótesis de los Helmintos propone que sujetos fuertemente adaptados a helmintos intestinales son innatamente polarizadas hacia una respuesta inmunitaria Th2 modificada, que depende de la modulación actuada por helmintos intestinales, que estimula una componente regulativa (Anthony et al., 2007; Allen y Maizels, 2011).

5.0. PROPUESTA

En los Amerindios de Perú, las Quitinazas resultan tener un patrón genético muy específico y variantes asociadas a baja funcionalidad, por lo tanto se recomienda seguir investigando estos genes y su función en estas poblaciones. Estudios de correlación entre la variante inactiva de *Chitotriosidase* (duplicación de *CHIT1*) y fenómenos patológicos agudos causados, por ejemplo, por Cestodos (*Taenia*, cisticercosis), deberían ser desarrollados en colaboración entre el Laboratorio de Helmintología Parasitaria de la Universidad Nacional de Trujillo y el Laboratorio de Genética Humana de la Universidad de Padua. A demás, seria oportuno analizar otros marcadores inmunológicos (IgE, IgG) relacionados a parasitosis crónicas en nativos amazónicos.

El uso de instrumentos bioinformáticas y base de datos genéticos (ENSEMBL, GenomeBrowser, dbSNP) puede sostener estudios sobre la variabilidad genética humana en general, y sobre la distribución de variantes genéticas funcionales asociadas a fenotipos atópicos/asmáticos en las poblaciones de Sur America, donde estas patologías son en rápido aumento (Ellwood et al., 2005).

Finalmente, la homogeneidad del patrón genotípico en los Amerindios sugiere que las muestras genéticas obtenidas representen material genético nuevo, y potencialmente relevante para otros estudios. Estudios basados en microsatélites y loci neutrales pueden ser realizados en la muestra de población amerindia obtenida en este estudio, para medir la distancia genética y reconstruir unas etapas de la etnohistoria reciente (1000-2000 años) de estas poblaciones.

6.0. CONCLUSIONES

El presente estudio ha permitido describir y evaluar, a través una metodología interdisciplinaria han sido investigadas diferentes determinantes ambientales de la interacción *Quitina-Quitinazas* en un contexto extremo, nunca investigado bajo este aspecto. El uso de diferentes herramientas bioinformáticas ha permitido hacer relevantes comparaciones adentro de la variabilidad humana mundial, bajo un enfoque evolucionista.

Una de las principales conclusiones es que los artrópodos y los gasterópodos representan la principal fuente de proteínas animales en las comunidades Amazónicas, durante la época de lluvia. El genotipo de *CHIA* (AMCase) más activo a pH del estomago resulta escaso (5%), sugierendo que la digestión de la quitina contenida en los alimentos no tenga un papel estratégico para los nativos. Todo modo, los nativos comen cotidianamente y saludablemente quitina, sin declarar ningún síntoma de tipo alérgico a estos alimentos.

El patrón de diversidad parasitológica entre los Amerindios es caracterizado por una elevada prevalencia de nematodos, y la ausencia de diferentes grupos de helmintos difundidos en áreas rurales de África sub-Sahariana y Asia monzónica. La peculiar condición de aislamiento geográfico y genético de las poblaciones Amerindias estudiadas han tenido hasta el siglo pasado, y la adaptación biológica a una reducida gama de nematodos contenientes quitina puede haber creado las condiciones parasitológicas en que se hayan tolerado nuevas mutaciones, y la co-evolución con estos nematodos puede haber seleccionado nuevas variantes raras en otras poblaciones humanas.

Las frecuencias elevadas de la variante inactiva de *CHIT1* no resultaron causar susceptibilidad a parásitos en diferentes estudios, igualmente podrían representar un factor de debilidad frente a helmintos que están llegando en la costa peruana y en áreas rurales tanto de la costa como andinas y amazónicas, donde recién se ha desarrollado el sector ganadero (ej. *Fasciola*).

Aún una efecto protectivo de la quitina como alimento, y de los enteroparásitos no es acertada en e las poblaciones amerindias, hay relevantes factores que sugieren que la interacción entre quitina ambiental y quitinazas desempeñe un papel relevante en la regulación del sistema inmunitario.

7.0. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Adelino T.E., Martins G.G., Gomes A.A., Torres A.A., Silva D.A., et al. 2013. *Biochemical and Molecular Chitotriosidase Profiles in Patients with Gaucher Disease Type 1 in Minas Gerais, Brazil: New Mutation in CHIT1 Gene*. JIMD reports, 9:85-91.

Allen J.E., y Maizels R.M. 2011. *Diversity and dialogue in immunity to helminths.* Nature Reviews Immunology, 11, 375-388

Anthony R. M., Rutitzky L.I., Urban J.F.Jr, Stadecker M.J. y W.C. Gause. 2007. *Protective immune mechanisms in helminth infection.* Nature Reviews Immunology, 7, 975-987

Araújo A., Reinhard K.J.; Ferreira L.F. y Gardner, S.L. 2008. *Parasites as Probes for Prehistoric Human Migrations?* Trends in Parasitology, vol. 24,3

Arndt, A. H., I. Sinclaire, A.B. Lane, 2013. *Chitotriosidase Deficiency: A Mutation Update in an African Population* 10: 11–16.

Bennett, B.C., M.A. Baker, P.G. Andrade, 2002. *Ethnobotany of the Shuar of eastern Ecuador*. Advances in Economic Botany, 14.299 pp.

Berlin, E.A. & Markell, E.K. 1977. *An Assessment of the nutritional and health status of an Awajún Jívaro community, Amazonas, Peru*. Ecology of Food and Nutrition, 6: 69–81.

Berlin B. & E.A. Berlin. 1979a. *Etnobiología subsistencia y nutrición en una sociedad de la selva tropical: los Aguaruna,* Centro de Investigación y Promoción Amazónica, Perú, pp. 13-49.

Berlin B. & E.A. Berlin. 1979b. *Aspectos de la etnobiología Aguaruna-Huambisa, segunda expedición etnobiológica al río Alto Marañón*. Amazonas-Perú, Universidad de California, Berkeley.

Blackwell A.D., Gurven M.D. et al., 2011. *Evidence for a Peak Shift in a Humoral Response to Helminths: Age Profiles of IgE in the Shuar of Ecuador, the Tsimane of Bolivia, and the U.S. NHANES.* PLoS Negl Trop Dis 5(6): e1218

Boot R.G., Blommaart E.F.C., Swart E., van der Vlugt K.G., Bijl N., Moe C., Place A., Aerts J.M.F.G. 2001. *Identification of a novel Acid Mammalian Chitinase distinct from Chitotriosidase.* J. Biol. Chem., 276:6770-6778

Boot, R.G., Bussink, A.P., Verhoek, M., de Boer, P. A., Moorman, A.F., Aerts, J.M. 2005. *Marked differences in tissue-specific expression of chitinases in mouse and man.* Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 53, 1283–92

Bourgain, Hoffjan, Nicolae, Newman, Steiner, Walker, Reynolds, Ober and McPeek, 2003. *Novel Case-Control Test in a Founder Population Identifies P-selectin as an Atopy Susceptibility Locus, American Journal of Human Genetics 73*:612-626

Brydon L.J., Gooday G.W., Chappell L.H. y King T.P.. 1987. *Chitin in egg shells of Onchocerca gibsoni and Onchocerca vnlvulus.* Mol. Biochem. Parasitol. 25, 267-272

Bukkens S.G.F. 2004. *Insects in the human diet: nutritional aspect*s. In: Paoletti, M. G. (Ed.) *Ecological implications of mini-livestock. Potential of insects, rodents, frog and snails*. Science Publ. Inc. Enfield (NH), USA. pp.545.

Burton O.T. Y Zaccone P. 2007. *The potential role of chitin in allergic reactions.* Trends in Immunology, 28, 10: 419-22

Carbonell F. y M. D'arrigo. 1997. *Insectos utilizados como alimento por algunas comunidades nativas del Perú*. *Informe final.* CONCYTEC. Lima. 54 pp.

Carbonell F. y Comunidades indígenas: Shipetiari, Matsiguengas, Yaguas, Shipibas, Comandancia, Nazareth, Aquarunas, Amarakaeris Shintuya, 2007. *Insectos utilizados como alimento por algunas comunidades indígenas de la Amazonia Peruana*. *Informe final.* CONCYTEC, Lima. 55 pp.

Carter R. y K.N. Mendis Clin. 2002. *Evolutionary and Historical Aspects of the Burden of Malaria.* Microbiol. Rev. 15(4):564-594

Carvalho Gonçalves M.L., Araújo A., Ferreira L.F. 2003. *Human Intestinal Parasites in the Past: New Findings and a Review* Mem Inst Oswaldo Cruz, 98(I):103-118

Cavalli Sforza L.L., Menozzi P., Piazza A. 2000. *Storia e geografia dei geni umani*. Editore Adelphi. XXII-792 p., 2° ed.

Chien, Y. H., Chen, J. H. & Hwu, W. L. 2005. *Plasma chitotriosidase activity and malaria*. Clinica Chimica Acta, 353, 215.

Choi, E. H., Zimmerman, P. A., Foster, C. B., Zhu, S., Kumaraswami, V., Nutman, T. B., et al. 2001. *Genetic polymorphisms in molecules of innate immunity and susceptibility to infection with Wuchereria bancrofti in South India.* Genes and Immunity, 2, 248–253

Chung, Y.; Y. Su, C. Chen, G. Jia, H. Wang, J. Wu y J. Lin. 2004. *Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall.* Acta Pharmacologica Sinica 25:932-936.

Contreras, M., Costello, E.K., Hidalgo, G., Magris, M., Knight, R., Dominguez-Bello, M.G.. 2010. *The bacterial microbiota in the oral mucosa of rural Amerindians*. Microbiology, 156, 3282–7

Cozzarini E., Bellin M., Norberto L., Polese L., Musumeci S., Lanfranchi G., Paoletti M.G. 2009. *CHIT1 and AMCase expression in human gastric mucosa: correlation with inflammation and Helicobacter pylori infection*. Eur J. Gastroent. Hepatol. 21(10):1119.

Coop G., Pickrell J.K., Novembre J., Kudaravalli S., Li J., Cavalli-Sforza L.L., et al. 2009. *The Role of Geography in Human Adaptation*. PLoS Genet 5(6):e1000500.

De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J.B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., Lionetti, P. 2010. *Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa*. National Academy of Science USA, 107(33), 14691-6

DeFoliart, 1992. *Insect as human food*. Crop Protection, 11: 395-399

Dourojeanni M. 1986. *Entomología y Recursos Naturales*. Rev. Per. Ent. 29: 1-6

Dufour Darna L.. 1987. *Insects as Food: A Case Study from the Northwest Amazon*. American Anthropologist.

Ellwood P, Asher MI, Beasley R, Clayton TO, Stewart AW; ISAAC Steering Committee. 2005. *The international study of asthma and allergies in childhood (ISAAC): phase three rationale and methods.* Int J Tuberc Lung Dis. 89,2: 383-397.

FAO., 1995. *Non-wood forest products for rural income and sustainable forestry*. Non-wood forest products 7. FAO, Rome.

F.A.O., 2013. *Edible insects: future prospects for food and feed security.* (van Huis A., Van Itterbeeck J., Klunder H., Mertens E., Halloran A., Muir G., Vantomme J.) Forestry Paper 171. F.A.O./OMS eds. Rome, 2013 (http://www.fao.org/docrep/018/i3253e/i3253e.pdf)

Fuhrman J.A., Lane W.S., Smith R. F., Piessens W. F. e Perler F. B., 1992. *Transmission-blocking antibodies recognize microfilarial chitinase in brugian lymphatic filariasis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 1548-1552

Furuhashi T., Beran A., Blazso, M., Czegeny Z., Schwarzinger C., Steiner G.. 2009. *Pyrolysis GC/MS and IR Spectroscopy in chitin analysis of molluscan shells*. Biosci Biotechnol Biochem. 73(1), 93–103

Galanter J.M., Fernandez-Lopez J.C., Gignoux C.R., Barnholtz-Sloan J., Fernandez-Rozadilla C., et al. 2012. *Development of a Panel of Genome-Wide Ancestry Informative Markers to Study Admixture Throughout the Americas*. PLoS Genet 8(3)

Gianfrancesco F. & Musumeci S.. 2004. *The evolutionary conservation of the human chitotriosidase gene in rodents and primates*. Cytogenetic and Genome Research, 105, 54–56.

Goodman, W. G. 1989. *Chitin: A magic bullet.* The Food Insects Newsletter 2(1):6-7.

Gething PW, Elyazar IRF, Moyes CL, et al. 2010. *A Long Neglected World Malaria Map: Plasmodium vivax Endemicity in 2010*. PLOS Neglected Tropical Diseases (ePub)

Guallart, J.M. 1964. *Los Jivaros del Alto Marañón.* America Indigena, 24: 315–331.

Hall, A. J., Morroll, S., Tighe, P., Götz, F., and Falcone, F.H. 2008. *Human chitotriosidase is expressed in the eye and tear gland and has an antimicrobial spectrum different from lysozyme*. Microbes and Infections, 10, 69-78.

Hall A.J., Quinnell R.J., Raikoc A., Lagog M., Siba P., Morroll S. y Falcone F.H. 2007. *Chitotriosidase deficiency is not associated with human hookworm infection in a Papua New Guinean population.* Infect Genet Evol. 7(6): 743-747.

Harrington B.J. 2008. *Microscopy of 4 Pathogenic Enteric Protozoan Parasites: A Review*. Lab Medicine 39(4):231-238

Heinzmann A., Brugger M., Bierbaum S., Mailaparambil B., Kopp M.V., Strauch K.. 2010. *Joint influences of Acidic-Mammalian-Chitinase with Interleukin-4 and Toll-like receptor-10 with Interleukin-13 in the genetics of asthma.* Pediatr Allergy Immunol. 21, 4(2):e679-86.

Hill K., Hawkes K., Hurtado M. Y Kaplan H. 1984. *Seasonal variance in the diet of Ache hunter-gatherers in Eastern Paraguay.* Human Ecology, (12)2: 101-135

Hoffmann K.F., Wynn T.A., Dunne D.W.. 2002. *Cytokine-mediated host responses during Schistosome infections; walking the fine line between immunological control and immunopathology*. Adv Parasitol; 52:265–307.

Hood-Nowotny R, Schwarzinger B, Schwarzinger C, Soliban S, Madakacherry O, et al. 2012. *An Analysis of Diet Quality, How It Controls Fatty Acid Profiles, Isotope Signatures and Stoichiometry in the Malaria Mosquito Anopheles arabiensis.* PLoS ONE. 7(10):e45222

Huaman-Espino L., Vallarades E.C. 2006. *Estado nutricional y características delconsumo alimentario de la población Aguaruna, Amazonas, Perú, 2004*. Rev Peru Med Exp Salud Publica 23(1)

Hurtado A.M., Lambourne C.A., James P., Hill K., Cheman K. y Baca K. 2003. *Human Rights, Biomedical Science, and Infectious Diseases Among South American Indigenous Groups*. Annu. Rev. Anthropol. 34:639–65

Ibáñez N.H., Jara C.A., Antenor G.M, Diaz E.L.. 2004. *Prevalencia del enteroparasitismo en escolares de comunidades nativas del Alto Marañon, Amazonas Perù.* Rev Peru Med Exp. Salud Publica. 21 (3)

Ibáñez N.H., Martin S.E., Llerna V.C.. 2008. *Parasitosis intestinal en escolares aguarunas de la comunidad nativa Awajun Bichanak, Bagua, Amazonas, Perù*. Acta Med. O.H.R. 8(3)

INS, 2000. *Diagnóstico Socio Situacional de Salud de Siete Comunidades Awajun de los Ríos Comaina. Cenepa y Marañón*. Instituto Nacional de Salud, Ministerio de Salud, Lima, Peru

INS, 2003. *Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnostico de los paràsitos intestinales del hombre.* Serie de Normas Técnicas N° 37. Instituto Nacional de Salud, Ministerio de Salud, Lima, Peru.

Jackson J.A, M. Friberg, S. Little y J.E. Bradley. 2009. *Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: Immunity against helminths and immunological phenomena in modern human populations: coevolutionary legacies?* Immunology. 126(1): 18–27.

Juárez-Rendón K.J., Lara-Aguilar R.A. y García-Ortiz J.E. 2012. *24-bp duplication on CHIT1 gene in Mexican population*. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2012 Jul-Aug; 50(4): 375-377.

Koropatkin, N.M., Cameron, E.A., Martens, E.C. 2012. *How glycan metabolism shapes the human gut microbiota*. Nature Review of Microbiology, 5:323–35

Kang G., Mathew M.S., Rajan D.P., Daniel J.D., Mathan M.M., Mathan V.I., Muliyil J.P. 1998. *Prevalence of intestinal parasites in rural Southern Indians.* Trop Med Int Health. 3(1):70-5.

Kenneth N.O., N.I. Udoidung, D.C. Opara, Okpok E. Okon, E.U. Edosomwan, A.J. Udoh. 2012. *The Impact of Intestinal Parasitic Infections on the Nutritional Status of Rural and Urban School-Aged Children in Nigeria.* Int.J. of MCH and AIDS

Kreider T., Anthony R.M., Urban J.F. Jr., Gause W.C.. 2007. *Alternatively activated macrophages in helminth infections*. Curr Opin Immunol, 19:448–53

Legesse M, Berhanu E. *Prevalence of intestinal parasites among schoolchildren in a rural area close to the southeast of Lake Langano, Ethiopia engistu*. Ethiop J Health Dev. 2004; 18:116-21.

Lezana V., Arancibia J.C., *Consideraciones epidemiológicas del asma en Latinoamérica Neumología Pediátrica*. (http://www.neumologia-pediatrica.cl)

Malaguarnera L, Simporè J, Prodi DA, Angius A, Sassu A, Persico I, Barone R and Musumeci SA. *24-bp duplication in exón 10 of human chitotriosidase gene from the sub-Saharan to the Mediterranean area: role of parasitic diseases and environmental conditions.* Genes Immun. 2003 Dec; 4(8): 570-574

Malek EA, Ibanez N, Guerra A. 1985. *Description of redia and cercaria of Paragonimus peruvianus from experimentally infected Aroapyrgus colombiensis of Condebamba Valley, Peru*. J Parasitol;71(2):253-6.

Mallol J., 2004. *Satellite symposium: Asthma in the World. Asthma among children in LatinAmerica*. Allergol. Immunopathol., 323:100-3.

MINSA/OGE. 2003. *Análisis de la situación de los pueblos indígenas de la Amazonia Peruana*, pp. 13–21. Ministerio de Salud, Oficina General de Epidemiología, Lima, Peru

Mostacero Leon, J., F. Mejia Coico, O. Gamarra Torres. Taxonomia de las fanerogamas utiles del Perù. Editoria Normas Legales S.A.C. Trujillo, 2002.

Musumeci M., Malaguarnera L., Simporè J., Barone R., Whalen M., Musumeci S., 2005. *Chitotriosidase activity in colostrum from African and Caucasian women,* Clin. Chem. Lab. Med. 43: 198-201

Musumeci S. and Paoletti M.G., 2009. *Chitin-Chitinasis Binomium.* Recent Issues. Nova Biomedical Books. New York.

Musumeci M., Giansanti A. e Musumeci S., 2009. *Chitinase in Plasmodium, Anopheles and human interaction*. In: Chitin-Chitinas Binomium. Recent Issues. Nova Biomedical Books. New York.

Mumtaz S, Siddiqui H, Ashfaq T. 2009. *Frequency and risk factors for intestinal parasitic infection in children under five years age at a tertiary care hospital in Karachi*. J. Pak. Med. Assoc. 59(4):216-9.

Muzzarelli, R.A.A., Boudrant, J., Meyer, D., Manno, N., DeMarchis, M., Paoletti, M.G. 2012. *Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial*. Carbohydrate Polymers, 87, 995–1012

Nair M.G., Guild K.G., Artis D.. 2006. *Novel effector molecules in type 2 inflammation: lessons drawn from helminth infection and allergy*. Journal of Immunology. 177:1393-1399.

Nair M.G., Gallagher I.J., Taylor M.D., Loke P., Coulson P.S., Wilson R.A., Maizels R.M., Allen J.E.. 2005. *Chitinase and Fizz family members are a generalized feature of nematode infection with selective upregulation of Ym1 and Fizz1 by antigen-presenting cells.* Infect Immun; 73:385–94.

Neyrinck A.M., Possemiers S., Verstraete W., De Backer F., Cani P.D., Delzenne N.M. (2011). *Dietary modulation of clostridial cluster XIVa gut bacteria (Roseburia spp.) by chitin–glucan fiber improves host metabolic alterations induced by high-fat diet in mice.* Journal of Nutritional Biochemistry, 23, 51–59.

Ngonjo T.W., Kihara J.H., Gicheru M., Wanzala P., Njenga S.M., Mwandawiro C. S. 2012. *Prevalence and Intensity of Intestinal Parasites in School age Children in Thika District, Kenya.* Vol.21 2:(40)

Okulicz J.F., Stibich A.S., Elston D.M., Schwartz R.A.. 2004. *Cutaneous onchocercoma.* Int J Dermatol; 43:170–2.

Olland A.M., Strand J., Presman E., Czerwinski R., Joseph-McCarthy D., Krykbaev, R., Schlingmann G., Chopra R., Lin L., Fleming M., Kriz R., Stahl M., Somers W., Fitz L., et al. 2009. *Triad of polar residues implicated in pH specificity of acidic mammalian chitinase*. Protein Science, 18, 569–578.

Palma-Guerrero J.; H. B. Jansson, J. Salinas, y L.V. Lopez Llorca, 2008. *Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi*. Journal of Applied Microbiology. 104: 541-553.

Papazahariadou M.G., Papadopoulos E.G., Frydas S.E., Mavrovouniotis C., Constantinidis T.C., Antoniadou-Sotiriadou K., et al. *Prevalence of gastrointestinal parasites in the Greek population: local people and refugees.* Annals of Gastroenterology. 2004;17:194–8.

Paoletti M.G., Dufour D.L., Cerda H., Torres F., Pizzoferrato L. y Pimentel, D. 2000. *The importance of leaf- and litter-feeding invertebrates as sources of animal protein for the Amazonian Amerindians*. Proceedings of the Royal Society London B. 267, 2247-2252.

Paoletti, M.G. y D. Dufour. 2005. *Edible invertebrates among Amazonian Indians: a critical review of disappearing knowledge*. In: *Ecological implications of mini-livestock. Potential of insects, rodents, frog and snails*. Science Publ. Inc. Enfield (NH), USA. pp.293-342.

Paoletti, M. G. (Ed.) (2005). *Ecological implications of mini-livestock. Potential of insects, rodents, frog and snails*. Science Publishers, Enfield. N.H., USA 648 pp.

Paoletti M.G., Norberto L., Damini R., Musumeci S., 2007. *Human gastric juice contains Chitinase that can degrade Chitin. Annuals of Nutrition and Metabolism*, 51: 244-251

Pearce E.J., MacDonald A.S.. 2002. *The immunobiology of schistosomiasis.* Nat Rev Immunol, 2:499–511.

Piras, I., Melis, A., Ghiani, M. E. et al.. 2007. *Human CHIT1 gene distribution: New data from Mediterranean and European populations*. Journal of Human Genetics, 52, 110–116.

Posey D.A. 1984. *A preliminary report on diversified management of tropical forest by the Kayapo Indians of the Brazilian Amazon.* Advances in Econ. Bot. 11: 112-126

Rachel A., Lawrence E.D. 2001. *Lymphatic filariasis: parallels between the immunology of infection in humans and mice*. Parasite Immunol, 23:353–61.

Ramos J. 1982. *Los insectos como fuente de proteína en el futuro*. Ed. Limusa. México. 144pp

Reese T.A., Liang H.E., Tager A.M. et al. 2007. *Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy*. Nature; 447:92–6.

Roche M.L., Creed-Kanashiro H.M., Tuesta I. Kuhnlein H.V., 2007. *Traditional food diversity predicts dietary quality for the Awajún in the Peruvian Amazon* Public Health Nutrition: 11(5):457-465

Roche M., Creed-Kanashiro H., Tuesta I. y Kuhnlein H.V. 2007. *Traditional food system provides dietary quality for the Awajun in the Peruvian Amazon*. Ecology of Food and Nutrition, 46: 1–23.

Rockman M.V., Hahn M.W., Soranzo N., Goldstein D.B., Wray GA. 2003. *Positive selection on a human-specific transcription factor binding site regulating IL4 expression*. Curr Biol. (23):2118-23.

Rockman M.V., Hahn M.W., Soranzo N., Zimprich F., Goldstein D.B., Wray GA. 2005. *Ancient and recent positive selection transformed opioid cis-regulation in humans.* PLoS Biol; 3(12):e387.

Rodriguez-Sosa M., Satoskar A.R., Calderon R., Gomez-Garcia L., Saavedra R., Bojalil R., Terrazas L.I.. 2002. *Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability.* Infect Immun; 70:3656–64.

Sánchez-Robles L.A. y Jara C.A.. 2010. *Prevalencia de infección por helmintos intestinales en niños de "Alto Trujillo", La Libertad, Perú*. Rebiol 30(1):58-64

Sánchez-Robles L.A. y Jara C.A.. 2011. *Prevalencia de infección por Blastocystis y protozoarios intestinales en niños de "Alto Trujillo", La Libertad, Perú*. Sciendo 14(1-2):32-41

Sato M.O., Sako Y., Nakao M., Yamasaki H., Nakaya K., Ito A.. 2006. *Evaluation of purified Taenia solium glycoproteins and recombinant antigens in the serologic detection of human and swine cysticercosis.* J Infect Dis. 15; 194(12):1783-90

Schur N., Hürlimann E., Stensgaard A.S., Chimfwembe K., Mushinge G., Simoonga C., Kabatereine N.B., Kristensen T.K., Utzinger J., Vounatsou P.. 2011a. *Spatially explicit Schistosoma infection risk in eastern Africa using Bayesian geostatistical modelling*. Acta Trop.

Schur N., Hürlimann E., Garba A., Traoré M.S., Ndir O., Ratard R.C., Tchuem Tchuenté L.A., Kristensen T.K., Utzinger J., Vounatsou P.. 2011b. *Geostatistical model-based estimates of Schistosomiasis prevalence among individuals aged ≤ 20 years in West Africa.* PLoS Negl Trop Dis. 5(6):e1194

Seibold M.A., Reese T.A., Choudhry S. et al., 2009. *Differential Enzymatic Activity of Common Haplotypic Versions of the Human Acidic Mammalian Chitinase Protein.* Journal of Biological Chemistry. 284(29):19650–19658

Šimůnek J., Kopečný J., Hodrová B., Bartoňová H. 2002. *Identification and characterization of Clostridium paraputrificum, a chitinolytic bacterium of human digestive tract*. Folia Microbiologica Prague, 47, 559–564.

Stephen J. Jenkins and Judith E. Allen, 2010. *Similarity and Diversity in Macrophage Activation by Nematodes, Trematodes, and Cestodes.* Journal of Biomedicine and Biotechnology, vol. 2010, Article ID 262609, pp. 14

Stork N.E. 1988. *Insect diversity: facts, fiction and speculation*. Biol. J. Linn. Soc. 35: 321-327

Taylor M.D., Harris A., Nair M.G., Maizels R.M., Allen J.E.. 2006. *F4/80+ alternatively activated macrophages control CD4+ T cell hyporesponsiveness at sites peripheral to filarial infection*. J Immunol, 176:6918–27.

Ward W.W., Alvarado L., Rawlings N.D., Engel J.C., Franklin C., McKerrow J.H. 1997. *A Primitive Enzyme for a Primitive Cell: The Protease Required for Excystation of Giardia*. Cell, 89, 437–444

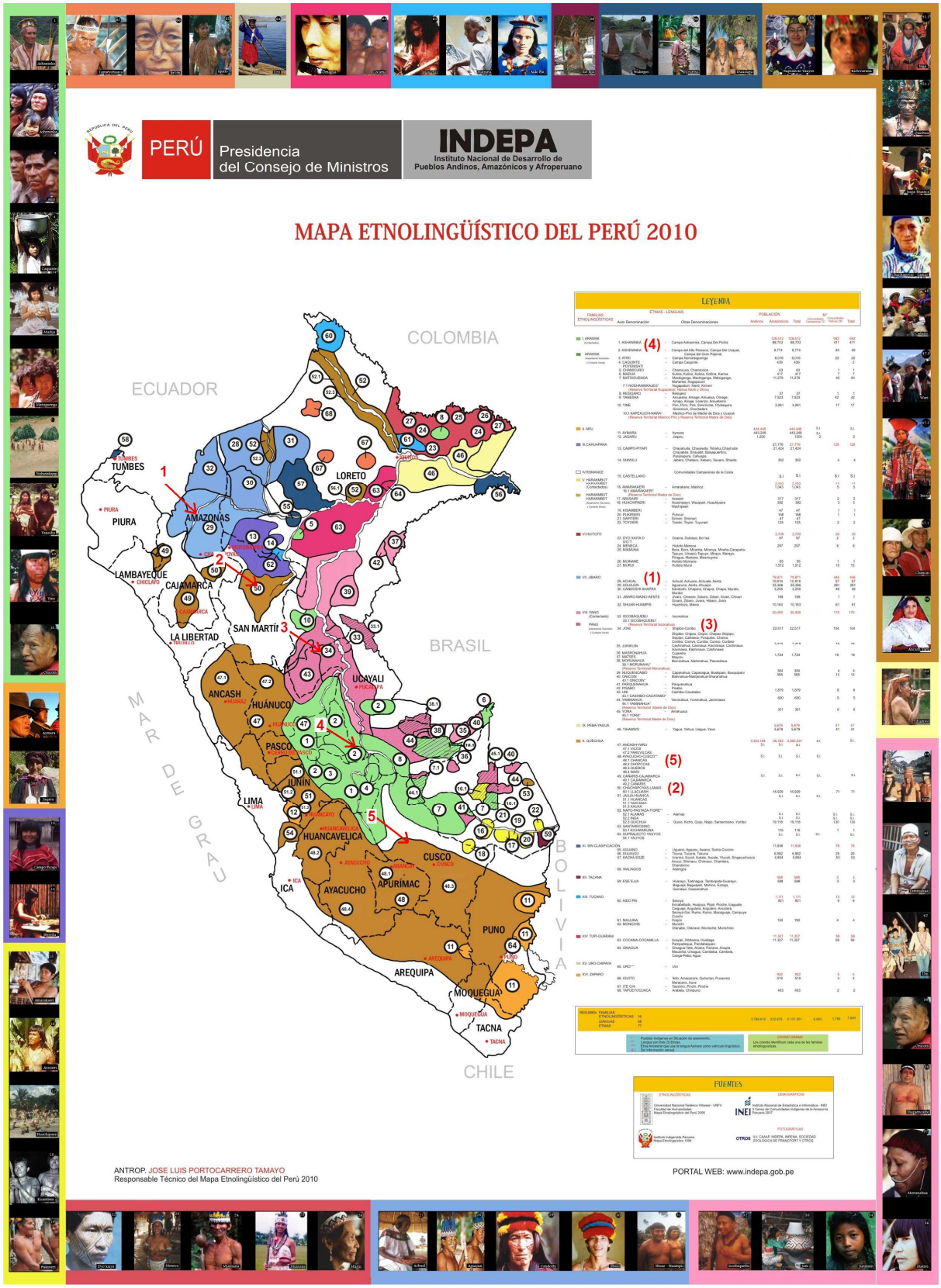
Wimmer M, Schmid B, Tag C, Hofer HW. 1998. *Ascaris suum: Protein Phosphotyrosine Phosphatases in Oocytes and Developing Stages*. Exp parasitol. 88: 139-145

Wu Y., Egerton G, McCarthy S.J., Nutman B.T., Bianco E.A. 2003. *Human immune responses to infective stage larval-specific chitinase of filarial parasite, Onchocerca volvulus, Ov-CHI-1*. Filaria Journal, 2:6.

Yazdanbakhsh M., Kremsner P.G., van Ree R. 2002. *Allergy, Parasites, and the Hygiene Hypothesis*. Science 296:5567 pp. 490-49

Zhang Y., Foster J.M., Nelson L.S., Ma D., Carlow C.K.. 2005. The chitin synthase genes chs-1 and chs-2 are essential for C. elegans development and responsible for chitin deposition in the eggshell and pharynx, respectively. Dev Biol. 15;285(2):330-9.

ANEXO 1. Mapa Etnolinguistico de Perú.



LEYENDA

FAMILIAS ETNOLINGÜÍSTICAS	ÉTNIAS - LENGUAS: Auto Denominación		Otras Denominaciones	POBLACIÓN: Andinos	Amazónicos	Total	Nº: Comunidades Campesinas CC	Comunidades Nativas CN	Total
I. ARAWAK (Contactados)	1. ASHANINKA (4)	-	Campa Ashaninka, Campa Del Pichis		128,512 88,703	128,512 88,703		592 411	592 411
ARAWAK (Aislamiento Voluntario y Contacto Inicial)	2. ASHENINKA	-	Campa del Alto Perence, Campa Del Ucayali, Campa del Gran Pajonal.		8,774	8,774		49	49
	3. ATIRI	-	Campa Nomatsiguenga		8,016	8,016		22	22
	4. CAQUINTE POYENISATI	-	Campa Caquinte		439	439			2
	5. CHAMICURO	-	Chamicura, Chamicolos		63	63		1	1
	6. MADIJA	-	Kulina, Kulino, Kolina, Kollina, Karina		417	417		7	7
	7. MATSIGUENGA	-	Machigenga, Machiganga, Matsiganga, Mañaries, Kogapacori		11,279	11,279		40	40
	7.1 NOSHANINKAJEG*	-	Nugapakori, Nanti, Kirineri						
	(Reserva Territorial Kugapakori, Nahua Nanti y Otros)								
	8. RESIGARO	-	Resígero		37	37		1	1
	9. YANESHA	-	Amuesha, Amage, Amueixa, Omage, Amajo, Amaje, Lorenzo, Amuetamo		7,523	7,523		42	42
	10. YINE	-	Piro, Pirro, Pira, Sinirinche, Chotaquiro, Simiranch, Chontaders		3,261	3,261		17	17
	10.1 KAPEXUCHI-NAWA*		Mashco-Piro de Madre de Dios y Ucayali						
	(Reserva Territorial Mashco Piro y Reserva Territorial Madre de Dios)								
II. ARU				444,448		444,448	S.I.		S.I.
	11. AYMARA	-	Aymara	443,248		443,248	S.I.		
	12. JAQARU	-	Jaqaru	1,200		1200	2		2
III.CAHUAPANA					21,776	21,776		128	128
	13. CAMPO-PIYAPÍ	-	Chayahuita, Chayawita, Tshahui,Chayhuita Chayabita, Shayabit, Balsapuertino, Paranapura, Cahuapa		21,424	21,424			
	14. SHIWILU	-	Jebero, Chebero, Xebero, Severo, Shiwila		352	352		4	4
IV.ROMANCE	15. CASTELLANO		Comunidades Campesinas de la Costa		S.I	S.I		S.I	S.I
V. HARAKMBUT HARAKMBET (Contactados)					2,092	2,092		14	14
	16. AMARAKAERI	-	Amarakaire, Mashco		1,043	1,043		5	5
	16.1 AMARAKAERI*								
	(Reserva Territorial Madre de Dios)								
HARAKMBUT HARAKMBET (Aislamiento Voluntario y Contacto Inicial)	17. ARASAIRI	-	Arasairi		317	317		2	2
	18. HUACHIPAERI	-	Huachipayri, Wacipairi, Huachipaire Wachipaeri		392	392		3	3
	19. KISAMBERI				47	47		1	1
	20. PUKIRIERI	-	Puncuri		168	168		1	1
	21. SAPITERI	-	Sirineri, Shirineri		47	47			
	22. TOYOERI	-	Toioén, Toyeri, Tuyuneri		125	125		2	2
VI.HUITOTO					2,709	2,709		30	30
	23. DYO´XAIYA O IVO´T	-	Ocaina, Dukaiya, Ibo`tsa		97	97		2	2
	24. MENECA	-	Hiutoto Meneca		297	297		6	6
	25. MIAMUNA	-	Bora, Boro, Miranha, Miranya, Miraña-Carapaña-Tapuyo, Uiraazú-Tapuyo, Mirayo, Marayo, Piragua, Mariana, Meamuyma						
	26. MUINANE	-	Huitoto Muinane		55	55		1	1
	27. MURUI	-	Huitoto Murui		1,512	1,512		15	15
VII. JIBARO					79,871	79,871		446	446
	28. ACHUAL (1)	-	Achual, Achuare, Achuale, Aents		10,919	10,919		57	57
	29. AGUAJUN	-	Aguaruna, Aents, Ahuajún		55,366	55,366		281	281
	30. CANDOSHI-SHAPRA	-	Kandoshi, Chapara, Chapra, Chapa, Murato, Murata		3,255	3,255		46	46
	31. JIBARO-MAINU-AENTS	-	Jivaro, Chiwaro, Siwaro, Gibari, Xivari, Chivari Givaro, Zibaro, Jivara, Hibaro, Jivira		168	168		1	1
	32. SHUAR-HUAMPIS	-	Huambiza, Maina		10,163	10,163		61	61
VIII. PANO (Contactado)					30,409	30,409		175	175
	33. ISCOBAQUEBU	-	Isconahua						
	33.1 ISCOBAQUEBU*								
	(Reserva Territorial Isconahua)								
PANO (Aislamiento Voluntario y Contacto Inicial)	34. JONI (3)	-	Shipibo-Conibo Shipibo: Chipeo, Chipio, Chepeo Shipipo, Ssipipo, Calliseca, Posquibo, Chama. Conibo: Conivo, Cuniba, Cunivo, Curibeo		22,517	22,517		104	104
	35. JUNIKUIN	-	Cashinahua, Caxinaua, Kachinaua, Cachinaua, Kaxinawa, Kashinaua, Cashinawa		2,419	2,419		19	19
	36. MASRONAHUA	-	Cujareño		1,724	1,724		16	16
	37. MATSES	-	Mayoru						
	38. MORUNAHUA	-	Morunahua, Nishinahua, Paconahua						
	38.1 MORUNAHU*								
	(Reserva Territorial Morunahua)								
	39. NIUQUENCAIBO	-	Capanahua, Capanagua, Buskipani, Busquipani		384	384		4	4
	40. ONICOIN	-	Marinahua-Mastanahua-Sharanahua		585	585		13	13
	40.1 ONICOIN*								
	41. PARQUENAHUA	-	Parquenahua						
	42. PISABO	-	Pisabo						
	43. UNI	-	Cashibo-Cacataibo		1,879	1,879		8	8
	43.1 CASHIBO-CACATAIBO*								
	44. YAMINAHUA	-	Yaminahua, Yuminahua, Jamimawa		600	600		5	5
	44.1 YAMINAHUA*								
	(Reserva Territorial Madre de Dios)								
	45. YORA	-	Amahuaca		301	301		6	6
	45.1 YORA*								
	(Reserva Territorial Madre de Dios)								
IX. PEBA-YAGUA					5,679	5,679		41	41
	46. YIHAMWO	-	Yagua, Yahua, Llagua, Yava		5,679	5,679		41	41
X. QUECHUA				3'324,168	36,163	3,360,331	S.I.		S.I.
	47. ANCASH-YARU			S.I.	S.I.	S.I.			
	47.1 VICOS								
	47.2 YARUVILCAS								
	48. AYACUCHO-CUSCO** (5)			S.I.	S.I.	S.I.	S.I.		
	48.1 CHANCAS								
	48.2 CHOPCCAS								
	48.3 QUEROS								
	48.4 WARI								
	49. CAÑARIS-CAJAMARCA			S.I.	S.I.	S.I.	S.I.		S.I.
	49.1 CAJAMARCA								
	49.2 CAÑARIS								
	50. CHACHAPOYAS-LAMAS (2)								
	50.1 LLACUASH				16,929	16,929		71	71
	51. JAUJA-HUANCA				S.I.	S.I.	S.I.		
	51.1 HUANCAS								
	51.2 TARUMAS								
	51.3 XAUXA								
	52. NAPO-PASTAZA-TIGRE**								
	52.1 ALAMAS	-	Alamas		S.I.	S.I.		S.I.	S.I.
	52.2 INGA				S.I.	S.I.		S.I.	S.I.
	52.3 QUICHUA	-	Quixo, Kicho, Quijo, Napo, Santarrosino, Yumbo		19,118	19,118		130	130
	53. SANTARROSINO								
	53.1 KICHWARUNA				116	116		1	1
	54. SUPRALECTO YAUYOS				S.I.	S.I.	S.I.		S.I.
	54.1 YAUYOS								
XI. SIN CLASIFICACIÓN					11,836	11,836		78	78
	55. AGUANO	-	Uguano, Aguanu, Awano, Santa-Crucino						
	56. DUüXüGU	-	Ticuna, Tucuna, Tukuna		6,982	6,982		25	25
	57. KACHÁ EDZE	-	Urarina, Itucali, Itukaile, Itucale, Ytucali, Singacuchusca Arucui, Shimacu, Chimiaco, Chambira, Chambirino		4,854	4,854		53	53
	58. WALINGOS	-	Walingos						

(...)

ANEXO 2. Consentimiento informado.

Universidad Nacional de Trujillo
Av.da Juan Pablo II, Trujillo Perù

Università degli Studi di Padova
Via U.Bassi, 58/b, Padova Italia

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ANALISIS MOLECULARES

- PROYECTO QUITINASAS HUMANAS -

Yo _____

Lugar de nacimiento: _____ Prov. _____

Fecha de nacimiento ____ / ____ / _____

Residente en: _____ Provincia _____

Calle: _____ n° _____ Telf. _____

Declaro que he sido informado que el grupo de investigación sobre Quitinaza, coordinado por el Prof. Maurizio G. Paoletti de la Universidad de Padua, esta realizando una investigación sobre ADN y/o ARN para establecer la presencia de un particular familia de enzimas (familia de las Quitinazas) en diferentes poblaciones humanas. Las finalidades de este estudio son las de comparar la expresión de estos genes y de reconocer las posibles relaciones con la historia de diferentes grupos humanos, su dieta, la exposición a los parásitos y unas patologías especificas. Los genes analizados son: AMCase (*Acidic Mammalian Chitinase*) y CHIT1 (Quitotriosidasis).

Estoy entonces de acuerdo con hacer las análisis parasitológicas y genéticas con la finalidad de estudiar las variaciones polimórficas de los genes AMCase e CHIT1, la expresión génica y mi ascendencia genética, donando una pequeña cantidad de mis heces y de mi saliva al grupo de investigación sobre Quitinazas coordinado por el Prof. Maurizio G. Paoletti. Datos relativos a mi ascendencia genética podrán ser usados para informar estudios futuros relativos a enfermedades (ej. asma y reacción a terapias).

Declaro que he sido informado que el material biológico obtenido de la muestra donada por mi va ser tratada para fines exclusivamente involucrados en esta investigación.

Declaro que he sido informado que no voy obtener ninguna beneficio diagnostico o terapéutico de las análisis de la maestra por mi donada, pero los estudios que serán conducidos sobre la misma muestra pueden, en el futuro, ayudar los investigadores a comprender mejor los mecanismos moleculares, digestivos y fisiopatológicos.

Además declaro que he sido informado que los datos parasitológicas que serán obtenidos de mi maestra, serán comunicados a mi mismo, como también los resultados genéticos, aún sean en fase preliminar y non predictivos ni de enfermedades ni de predisposiciones a determinadas patologías.

Mis datos personales serán guardados en un adecuado listado (de papel o electrónico), y accesibles solamente al investigador principal. En el caso que mi muestra sea enviada a otros entes de investigación, llevar otro código, de manera que nadie pueda conocer mi identidad. Mis datos serán tratados y eventualmente publicados solamente de forma anónima (código). Mi muestra será tratada de forma absolutamente anónima y será destruida después de 10 años después de la recolecta. En cualquier momento tengo derecho a pedir, por escrito, al Investigador principal de destruir mi muestra.

Fecha _____ Firma del voluntario _____

Firma del investigador que recolectó el Consentimiento _____

ANEXO 3. Cuestionario individual sobre dieta, parásitos y disturbios debidos a la quitina.

Università degli Studi di Padova
Via U. Bassi, 58/b, Padova Italia

Universidad Nacional de Trujillo
Av.da Juan Pablo II, Trujillo Perù

CUESTIONARIO
- PROYECTO QUITINASAS HUMANAS -

Nombre _____

Lugar de nacimiento: _____ Prov. _____

Fecha de nacimiento ____ / ____ / _____

Residente en: _____ Provincia _____

Calle: _____ n° _____ Telf. _____

n° voluntario _____ [Análisis parasitológico □ NO □ SI]

[Análisis moleculares □ NO □ SI]

1) Alergias: □ Pollinos (sustancias volátiles, olores, fragmentos inalados) □ Ácaros (polvo) □ Otras ……

2) Asma alérgica: □ NO □ Raras (<1 vez por mes) □ Frecuentes [□ Cierto □ Percibido]

3) Bronquitis: □ NO □ Raras (<1 vez por mes) □ Frecuentes [□ Cierto □ Percibido]

4) Dermatitis atópicas? □ NO □ Raras □ Frecuentes [□ Cierto □ Percibido]

5) Alergias y intolerancias alimentarias: □ NO □ Raras □ Frecuente [□ Cierto □ Percibido]

6) ¿A que alimento? □ Crustáceos □ Hongos □ otros: ……..……

7) ¿Gastritis? □ NO □ Raras □ Frecuentes [□ Cierto □ Percibido]

8) ¿Ulceras? □ NO □ SI [□ Cierto □ Percibido]

9) ¿Ha sofferto di infezione da *Helicobacter pylori*? □ NO □ SI

10) ¿Cuando?
- □ Actualmente
- □ hace 1 - 2 años
- □ hace 3 - 5 años
- □ Más de 5 años atrás

11) ¿Practica unos tratamientos contra gastritis o alergias? □ NO □ SI

¿Cuales? .....

.....

.....

12) ¿Come insectos? □ NO □ SI

13) ¿Cuantas especies de insectos come? □ 1 - 5 □ 5 - 10 □ 10 - 50

14) Variación anual del de insectos:

Frecuencia mensual	1 – 5	6 – 10	11 – 20	21 – 30
Trimestre	Ene. – Mar.	Abr. – Jun.	Jul. – Set.	Oct. – Dic

Colegar a cada trimestre el intervalo de la frecuencia mensual correspondiente.

15) Insectos identificados: .....

.....

.....

16) ¿Come crustáceos (camarones y cangrejos)? □ NO □ SI

17) ¿Cuantas especies de crustáceos come? □ 1 – 5 □ 5 – 10 □ 10 – 50

18) Variación anual del consumo de crustáceos:

Frecuencia mensual	1 – 5	6 – 10	11 – 20	21 – 30
Trimestre	Ene. – Mar.	Abr. – Jun.	Jul. – Set.	Oct. – Dic

EJEMPLO

Colegar a cada trimestre el intervalo de la frecuencia mensual correspondiente.

19) Crustáceos identificados**:** ……

……

20) ¿Come hongos? □ NO □ SI

21) ¿Cuantas especies de hongos come? □ 1 – 5 □ 5 – 10 □ 10 – 50

22) Variación anual del consumo de hongos:

Frecuencia mensual	1 – 5	6 – 10	11 – 20	21 – 30
Trimestre	Ene. – Mar.	Abr. – Jun.	Jul. – Set.	Oct. – Dic

Colegar a cada trimestre el intervalo de la frecuencia mensual correspondiente.

23) Hongos identificados: .....

.....

24) ¿Usted tiene malaria? □ NO □ SI □ he tenido [□ Cierto □ Percibido]

25) ¿ Usted tiene parásitos intestinales? □ NO □ SI [□ Cierto □ Percibido]

Firma voluntario

.....

Firma Investigador

.....

ANEXO 4. GIDEON database

GIDEON, the *Global Infectious Diseases and Epidemiological Network* (Network Online de Enfermedades Infecciosas y Epidemiología Global) es la herramienta informática *on-line* de gestión del conocimiento medico-científico sobre las enfermedades infecciosas más utilizado e importante del mundo. Se utiliza para el diagnóstico y referencia en los campos de las enfermedades infecciosas y tropicales, epidemiología etc., y consiste en módulos de contenido, que se actualizan continuamente: el módulo de Enfermedades Infecciosas abarca más de 340 enfermedades, 231 países, más de 500 medicamentos antiinfecciosos y vacunas. Esta base de datos incluye informaciones basadas en 400.208 referencias de la literatura científica mundial que adhiere a los estándares de la Medicina Basada en la Evidencia: con más de 19.000 notas, más de 5.000 imágenes, 30.000 gráficos, 347 mapas interactivos y más de 150.000 referencias enlazadas.

Las mapas que siguen muestran la distribución mundial de: *Schistosoma hematobioum* y cisticercosis inducida por *Taenia solium.*

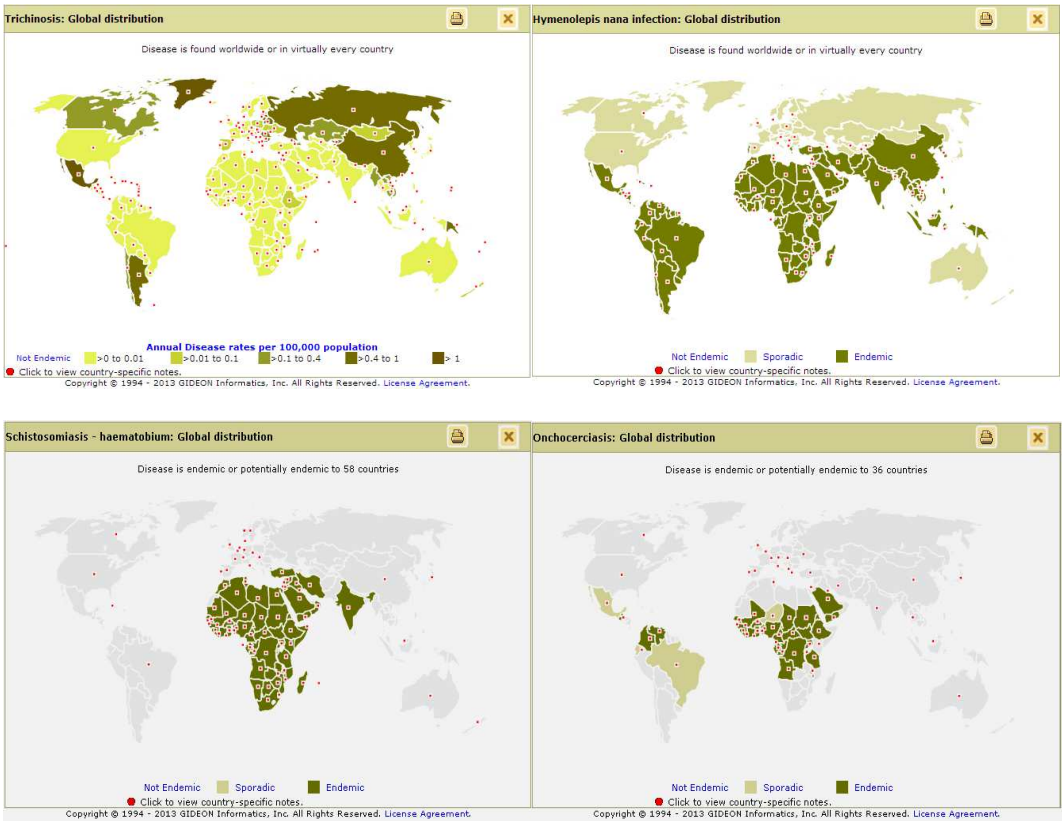


Figura 29. Distribución mundial de helmintos *Schistosoma, Taenia,* filarias, y *Fasciola* según el base de datos GIDEON.

ANEXO 5. Oragene DNA Self-Collection Kit

Figura 30. Manuel de uso del kit utilizado en el muestreo de saliva.

Protocolo de extracción

Los 2 ml de saliva recogidos en el frasco, serán incubados en Baño Termostático a 50°C por 1 hora. Luego se transferirán rápidamente 500 µl de saliva (la restante parte puede quedar a temperatura ambiental para realizar otros análisis) en un nuevo tubo de ensayo estéril, se le echará 20 µl (1/25 del volumen) de los enzimas presentes en el kit (*Oragene™ Purifier*). Se agita el tubo de ensayo y se lo pone a incubar en hielo por 10 minutos. Luego se centrifugará a 15.000 g/minuto por 5 minutos. Se colecta el líquido sobrante (*supernatant*) y se lo pone en un nuevo tubo de ensayo estéril. Se le adjunta un igual volumen de isopropanol 95% a temperatura ambiental que hará precipitar el ADN. Otra vez se lo centrifuga a 15.000 g/minuto por 10 minutos y, después de verificar que el *pellet* de ADN se quede pegado al fundo del tubo de ensayo, se saca el líquido sobrante. Finalmente se suspende el *pellet* en 100 µl di TE *buffer*.

ANEXO 6. Pimers utilizados para el secuenciamiento de CHIA: calculados según el programa PRIMER-3.

(http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus.cgi)

```
CHIA_2F        59.83   aaggtcttgggagggtgttt
CHIA_2R        58.98   agaagaatggaaaagtatagggatgt
PRODUCT SIZE:  298

CHIA_3F        60.14   aaattggaaggcaatcaatcc
CHIA_3R        59.83   cccatctgtctgtgaagcaa
PRODUCT SIZE:  214

CHIA_4F        60.76   aaacagaggcaaggccaaa
CHIA_4R        60.05   gagtcttggtccccatctca
PRODUCT SIZE:  396

CHIA_5F        59.24   gaccagatccaacactaaagca
CHIA_5R        58.90   tgtgaagtctaaagggacagtga
PRODUCT SIZE:  229

CHIA_6F        60.35   gtcctgatgaagggctctga
CHIA_6R        60.33   accctagagccacccaattc
PRODUCT SIZE:  346

CHIA_7+8F      59.73   tgaaagcaatttaagagagagaagc
CHIA_7+8R      60.28   ggcagcctaatttcccattt
PRODUCT SIZE:  657

CHIA_9F        59.82   acctgtcggaatagggggact
CHIA_9R        60.04   gcatttaggtaggagacagaatgaa
PRODUCT SIZE:  374

CHIA_10+11F    58.50   aactggagacatgaaagaagaaaa
CHIA_10+11R    59.48   tgctttttgagttggagaagg
PRODUCT SIZE:  500

CHIA_12F       57.25   cccacagttctcttcacctc
CHIA_12R       57.22   atgcatagcccctattttca
PRODUCT SIZE:  500
```

ANEXO 7. ENSEMBL GenomeBrowser.

Por cada variante se efectuó la búsqueda insertando la referencia en el cuadro, luego que seleccionar los comandos "Human Variation"→ "Population Genetics" para obtener las informaciones esenciales: tipo de variante (SNP/duplicación/inserción), localización, alelo ancestral, frecuencia alélica media entre las poblaciones humanas, las frecuencias alélicas de cada población en forma grafica de tortas. El enlace directo al *database* dbSNP permite de acceder a más detalles útiles (sustitución aminoacídica, secuencia de contorno, otros datos poblacionales etc.). A seguir unos ejemplos de la visualización de las informaciones sobre los polimorfismos en el database ENSEMBL.

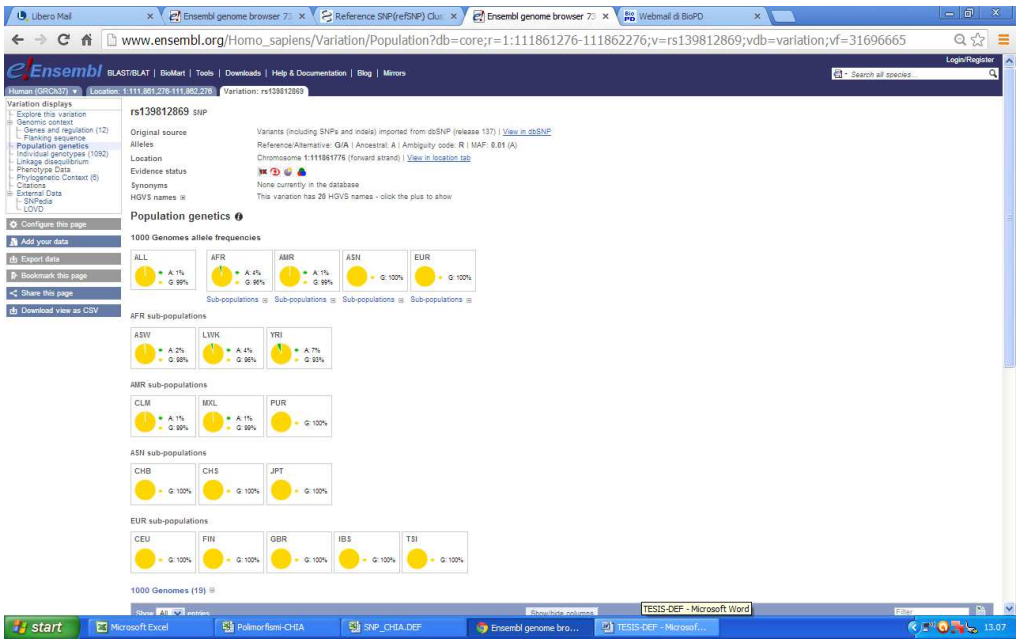


Fig. 31. Variante no-sinónima rs139812869 en el exón 10 con bajo grado de variabilidad humana. Presenta el alelo derivado "G" (ancestral: A) en los humanos, y una muy baja variabilidad (frecuencia alélica media = 1%; desviación estándar ≈ 0). Se ha completamente fijado el alelo derivado en todas las poblaciones humanas.

Fig. 32. Variante no-sinónima rs41282492 en el exón 4, presenta el alelo derivado A en los humanos, tiene una baja variabilidad (frecuencia alélica media = 0,10; desviación estándar = 0.07). El alelo derivado es completamente fijado en los asiáticos y en vía de fijación en los Amerindios, cuando en los Africanos conserva frecuencias elevadas del alelo ancestral G (frec. = 16-24%).

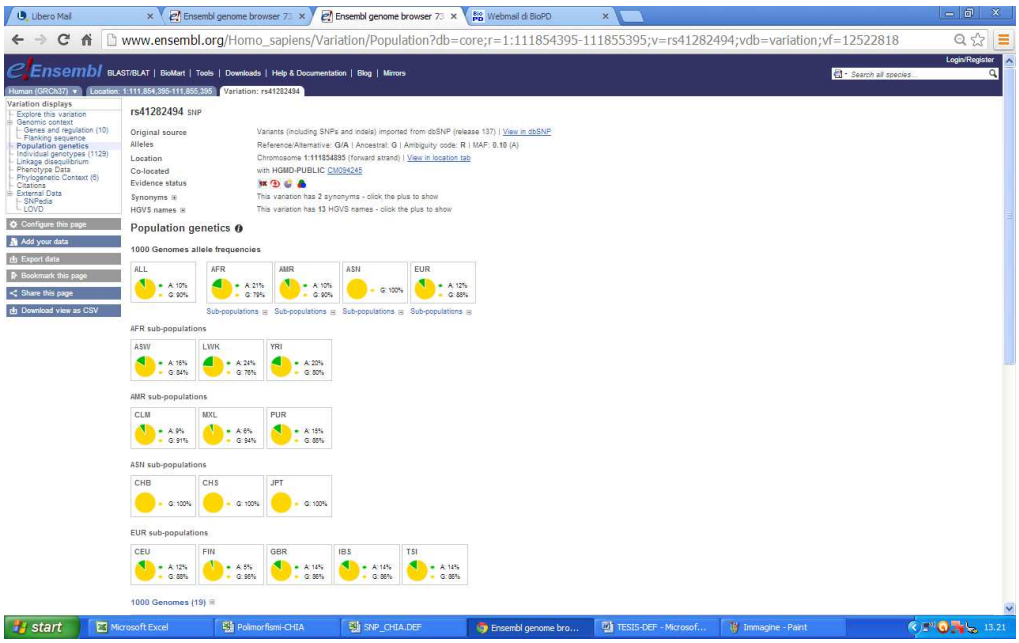


Fig. 33. Variante no-sinónima rs41282494 en el exón 4: el alelo derivado es ausente en los Asiáticos y presenta frecuencias > 0,10 en diferentes poblaciones mundiales y especialmente en los Africanos (frec. = 16-24%), y en los Puertorriqueños (15%). Las poblaciones humanas tendencialmente conservan el alelo ancestral "G" (frec. alélica media de A = 10%; desviación estándar ≤ 0.10) y la variante no resulta candidata a selección positiva.

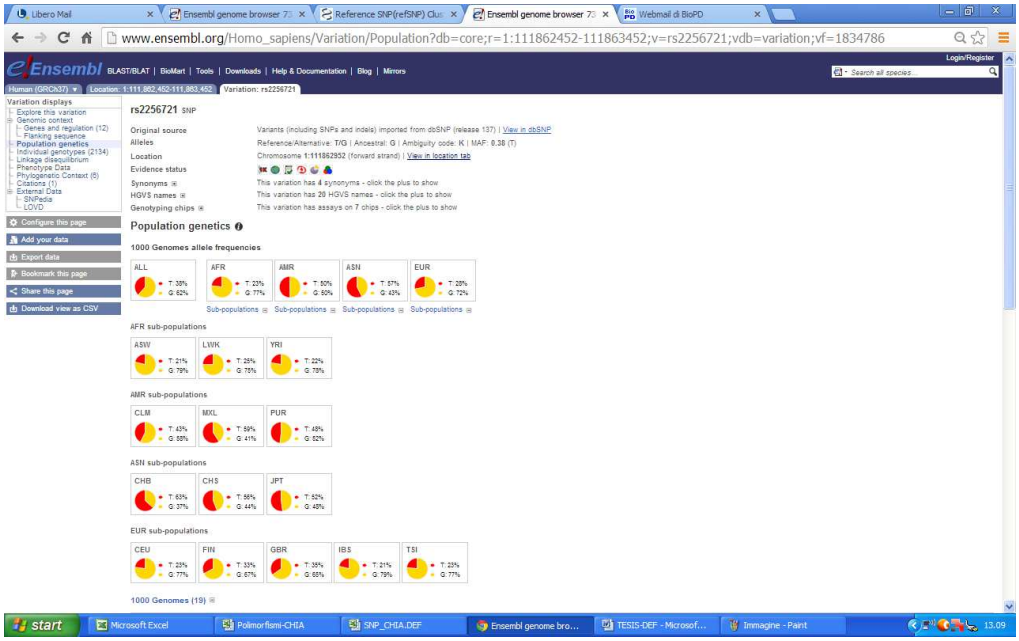


Fig. 34. Variante non-sinónima rs2256721 en el exón 12, las poblaciones humanas tendencialmente conservan el alelo ancestral "G" (frecuencia alélica media de A = 0,10; desviación estándar > 0.01).

ANEXO 8. Artrópodos comestibles y otros alimentos contenientes quitina.

Artrópodos y otros alimentos contenientes quitina, consumidos por los *Awajún.* Estadio de vida consumido: (–) larva; (@) pupa; (+) imago.

Orden	Familia	Nombre cientifico	Nombre Etnico	Estadio	Estaciòn
Coleoptera	Curculionidae	*Rhynchophorus palmarum* L.	*suri, daptush*	–, @, +	todas
	Curculionidae	*Metamasyus emipterus* L.	*dehish, ponsheimi*	–, @, +	todas
	Curculionidae	*Metamasyus emipterus* subsp. *sericeus* Oliver	*dehish, ponsheimi*	–, @, +	todas
	Curculionidae	??? subf. Molytinae	???	–, @	*???*
	Cerambycidae	*Acrosinus longimanus*	???	–	todas
	Scarabeide	*Dynastes hercules* L.	???	–, +	todas
Hymenoptera	Formicidae	*Atta cephalotes* L.	*kuruwinsi*	+	Nov-Marzo
	Formicidae	*Atta sexdens* L.	*kuruwinsi*	+	Nov-Marzo
	Formicidae	*Crematogaster stollii* Forel.	*visuk*	–, +	Nov-Marzo
	Vespidae	*Polybia platycephala* Richards, subg. Myrapetra	*sani, shanu*	–, @, +	todas
	Vespidae	*Polybia furnaria* von Ihering, subg. Furnariana	*iwash ete*	–, @, +	todas
Lepidoptera	Nymphalidae	*Brassolis astyra* Godman et Salvin	*baga, shuni*	–	Fin de lluvias
	Nymphalidae	*Brassolis sophorae* L.	*baga, shuni*	–	Fin de lluvias
	Castnidae	*Castnia daedalus* Cramer	*shuni*	–	Mayo
Crustacea		*Hypolobocera peruana* Rathbun	*ujig*	+	todas
		Macrobrachium brasiliense Heller	*mujush*	+	todas
		Macrobrachium amazonicum Heller	*mujush*	+	todas
Gasteropoda		*Megalobulimus maximus* Sowerby	*kunku*	+	todas
		Pomacea maculata Perry	*tzuntsu*	+	todas
		Ampollaria sp.	*tzuntsu*	+	todas
Fungi		*Auricularia delicata* (Fr.) Henn.	*ukajip, uicapi*		lluvias
		Auricularia polyticha (Montagne) Sacc.	*ukajip*		lluvias
		Cookeina tricholoma(Mont.) Kuntze	-		lluvias
		Cookeina speciosa (Fr.) Dennis	-		lluvias
		Clitocybe ???	-		lluvias
		Lentinus ???	-		lluvias
		Pleurotus ???			lluvias

Artrópodos y otros alimentos contenientes quitina, consumidos por los *Ashaninka.* Estadio de vida consumido: (–) larva; (@) pupa; (+) imago.

Orden	**Familia**	**Nombre cientifico**	**Nombre Etnico**	**Estadio**	**Estaciòn**
Coleoptera	Curculionidae	*Rhynchophorus palmarum* L.	*emoki, piroki* (adulto)	–, @, +	todas
	Curculionidae	*Rhynostomus* sp.	*emoki*	–, @, +	todas
	Curculionidae	*Metamasyus emipterus* L.	*chouiki*	–, +	todas
	Curculionidae	*Metamasyus emipterus* subsp. *sericeus* Oliver	*chouiki*	–, +	todas
	Scarabeide	*Dynastes hercules* L.	*maho, moho*	–	lluvias
	Scarabeide ???	???	*ungurabe*	–, +	???
Hymenoptera	Formicidae	*Atta cephalotes* L.	*sankori*	+	lluvias
	Formicidae	*Atta sexdens* L.	*sankori*	+	lluvias
Lepidoptera	Nymphalidae	*Brassolis astyra* Godman et Salvin	*shiopa*	–	lluvias
	Nymphalidae	*Brassolis sophorae* L.	*shiopa*	–	lluvias
	Castnidae	*Castnia daedalus* Cramer	*ohuaycorati*	–	todas
	Castnidae	*Eupalamides cyparissias* Fab.	*tiyobi*	–	todas
	???	???	*kota*	–	lluvias
	???	???	*hùmpa*	–	Junio
	???	???	*tzirompe*	–	???
	Sphingidae	???	*kororo*	–	???
Diptera	Pantophtalmidae	???	???	–	???
	???	???	*shagárendo*	–	???
Omoptera	Cicalidae	???	*kentori*	+	Fin de lluvias
Crustacea		*Hypolobocera peruana* Rathbun	*oshero*	+	todas
		Macrobrachium sp.	*Kito*	+	todas
Gasteropoda		*Megalobulimus maximus* Sowerby	*mapoto*	+	todas
		Pomacea maculata Perry	???	+	todas

ANEXO 9. Resultados del CC-QLs test

A) Etnicos VS. no-etnicos

Analysis of Marker 1: CHIT1 duplication

```
85 cases and 50 controls available

allele frequency estimates using the allele based quasi-likelihood
estimator in
                    cases           controls        all sample
allele 1 (WT):    freq = 0.5401   freq = 0.7112   freq = 0.6089
allele 2 (dupl.): freq = 0.4599   freq = 0.2888   freq = 0.3911
****************************************
Case-control corrected chi2 test

Corrected chi2 statistic value = 8.635056
pvalue = 0.003298
****************************************
Case-control quasi-likelihood score test

CC-QL statistic value = 6.536602  pvalue = 0.010568
```

Frequency of allele 1 is increased in the controls (quasi-score associated to this allele is -18.1989)

```
****************************************
```

Analysis of Marker 2: Promoter CHIA (rs12033184)

```
75 cases and 29 controls available

allele frequency estimates using the allele based quasi-likelihood
estimator in
               cases           controls        all sample
allele 1 (C): freq = 0.0391   freq = 0.3118   freq = 0.1201
allele 2 (A): freq = 0.9609   freq = 0.6882   freq = 0.8799
****************************************
Case-control corrected chi2 test

Corrected chi2 statistic value = 18.214261
pvalue = 0.000020

The p-value might not be exact because of the small number of allele 1
in cases

****************************************
Case-control quasi-likelihood score test

CC-QL statistic value = 24.456614
pvalue = 0.000001
```

Frequency of allele 1 is increased in the controls (quasi-score associated to this allele is -18.9542)

```
The p-value might not be exact because of the small number of type 1
alleles in cases
****************************************
```

Analysis of Marker 3: CHIA exon 4 (rs41282492)

```
75 cases and 39 controls available

allele frequency estimates using the allele based quasi-likelihood
estimator in
             cases           controls        all sample
allele (A): freq = 0.9695   freq = 0.9681   freq = 0.9689
allele (G): freq = 0.0305   freq = 0.0319   freq = 0.0311

****************************************
Case-control corrected chi2 test
```

```
Corrected chi2 statistic value = 0.002408 pvalue = 0.960859  df = 1

The p-value might not be exact because of the small number of allele 2
in cases

The p-value might not be exact because of the small number of allele 2
in controls

****************************************
Case-control quasi-likelihood score test

CC-QL statistic value = 0.002832  pvalue = 0.957561  df = 1

The p-value might not be exact because of the small number of type 2
alleles in cases
The p-value might not be exact because of the small number of type 2
alleles in controls
```

B) Awj + Ash + Shp + QuL VS. controles + QuC

Analysis of Marker 1: CHIT1 duplication

```
76 cases and 59 controls available

allele frequency estimates using the allele based quasi-likelihood
estimator in
                  cases           controls            all sample
allele 1 (WT) :   freq = 0.5464   freq = 0.6757       freq = 0.6089
allele 2 (Dupl.): freq = 0.4536   freq = 0.3243       freq = 0.3911

****************************************
Case-control corrected chi2 test

Corrected chi2 statistic value = 6.065420
pvalue = 0.013785

****************************************
Case-control quasi-likelihood score test

CC-QL statistic value = 3.873492  pvalue = 0.049054  df = 1

Frequency of allele 1 is increased in the controls (quasi-score
associated to this allele is -14.2777)

****************************************
```

Analysis of Marker 2: CHIA Promoter rs12033184

```
66 cases and 38 controls available

allele frequency estimates using the allele based quasi-likelihood
estimator in
            cases           controls        all sample
allele 1 : freq = 0.0462   freq = 0.2286   freq = 0.1201
allele 2 : freq = 0.9538   freq = 0.7714   freq = 0.8799

****************************************
Case-control corrected chi2 test

Corrected chi2 statistic value = 10.062287
pvalue = 0.001513

The p-value might not be exact because of the small number of allele 1
in cases

****************************************
Case-control quasi-likelihood score test
```

```
CC-QL statistic value = 12.623927        pvalue = 0.000381  df = 1

Frequency of allele 1 is increased in the controls (quasi-score
associated to this allele is -14.6299)

The p-value might not be exact because of the small number of type 1
alleles in cases
****************************************
```

Analysis of Marker 3: CHIA exón 4

```
66 cases and 48 controls available

allele frequency estimates using the allele based quasi-likelihood
estimator in
              cases              controls            all sample
allele 1 : freq = 0.9639  freq = 0.9746        freq = 0.9689
allele 2 : freq = 0.0361  freq = 0.0254        freq = 0.0311
****************************************
Case-control corrected chi2 test

Corrected chi2 statistic value = 0.217356
pvalue = 0.641062

The p-value might not be exact because of the small number of allele 2
in cases

The p-value might not be exact because of the small number of allele 2
in controls

****************************************
Case-control quasi-likelihood score test

CC-QL statistic value = 0.177618
pvalue = 0.673429

The p-value might not be exact because of the small number of type 2
alleles in cases
The p-value might not be exact because of the small number of type 2
alleles in controls
```

ANEXO 11. Tabla con los detalles sobre los *loci* de *Acidic Mammalian Chitinase* variables en los humanos.

Variante	Region del gen	posicion genomica	Alelos	Alele de referencia	frec. media pop. Ensembl	σ frec. alel. pop. (desv. estand.)	Alelo ancestral	genotipo Peru Amerindios	sujeto 10299
rs12023321	Promotor	chr1:111832618	T>G	G	0,49	0,17	G	G/G	**G/T**
rs12033184	Promotor	chr1:111832765	C>A	C	0,51	0,17	C	A/A	**C/A**
rs11102234	Promotor	chr1:111832773	T>C	T	0,99	0,02	C	T/T	T/T
rs35042265	Promotor	chr1:111832950	C>T	C	0,51	0,17	T	T/T	**C/T**
rs12023459	Promotor	chr1:111832973	G>T	T	0,16	≤ 0,01	G	G/G	G/G
rs4546919	Promotor	chr1:111833200	T>C	T	0,51	0,17	T	C/C	**T/C**
rs4554721	Promotor	chr1:111833254	G>C	G	0,51	0,17	G	C/C	**G/C**
rs4442363	Promotor	chr1:111833270	C>T	C	0,51	0,17	C	T/T	**C/T**
rs11102235	Promotor	chr1:111833441	G>A	G	0,51	0,17	G	A/A	G/G
rs34698010	5'UTR	chr1:111833488-9	dupl.CT	--	0,51	0,17	--	CT/CT	CT/CT
rs12026825	5'UTR	chr1:111833517	G>A	G	0,51	0,17	G	A/A	**A/G**
rs41282492	Exón 4	chr1:111854889	A>G	A	0,90	0,07	G	A/A	**A/G**
rs41282494	Exón 4	chr1:111854895	G>A	G	0,90	0,07	G	G/G	**G/A**
rs41282496	Exón 4	chr1:111854938	G>T	G	0,90	0,07	T	G/G	G/G
rs3818822	Exón 5	chr1:111857208	G>A	G	0,89	0,07	G	G/G	G/G
rs61756687	Exón 6	chr1:111857951	A>G	A	0,93	0,06	A	A/A	A/A
rs79500525	Exón 9	chr1:111861268	G>A	G	> 0,99	≈ 0	A	G/G	G/G
rs139812869	Exón 10	chr1:111861776	G>A	G	0,99	0,02	A	G/G	G/G
rs17027410	Exón 10	chr1:111861822	G>A	G	0,93	0,06	G	G/G	G/G
rs2275253	Exón 10	chr1:111861841	G>A	A	0,38	0,16	G	A/A	**G/A**
rs2275254	Exón 11	chr1:111861974	T>C	T	0,57	0,16	T	T/T	**C/T**
rs12094378	Exón 11	chr1:111862078	C>T	C	0,90	0,07	C	C/C	**C/T**
rs2256721	Exón 12	chr1:111862952	G>T	T	0,38	0,15	G	T/T	**T/G**

Leyenda:

- Variantes candidatas por retroselección del alelo ancestral (o selección negativa del alelo derivado) en los Amerindios
- Variantes candidatas por selección positiva del alelo derivado en los Amerindios
- Variantes que conservan el alelo ancestral (frec. ≥90) en todas las poblaciones humanas y baja variabilidad (σ ≤ 0,10)
- Variantes que presentan el alelo derivado (frec. ≥ 90) en todas las poblaciones humanas y baja variabilidad (σ ≤ 0,10)