

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Departamento de Genética e Biologia Molecular

**Adaptação e coadaptação de genes relacionados com
pigmentação de pele e vitamina D em populações nativas americanas**

Bruna Oliveira Missaggia

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cátira Bortolini

Coorientadora: Profa. Dra. Tábita Hünemeier

Porto Alegre

2019

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Evolução Humana e Molecular (LEHM) do Departamento de Genética, Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) proveu bolsa de mestrado à aluna, vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM – UFRGS).

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Maria Cátira Bortolini, por ter me recebido gentilmente em seu laboratório mesmo sem me conhecer. À ela também pelo respaldo e pelo empenho com que me ajudou em todas as etapas do desenvolvimento desta dissertação.

À professora Tábita Hünemeier por ter aceitado ser minha co-orientadora e pela valiosa sugestão do tema da vitamina D em nativos americanos.

Agradeço a todos os que contribuíram com essa pesquisa, especialmente à professora Gabriela Cybis pela competente consultoria estatística, sem a qual não teria sido possível concluir a dissertação. Ao Guillermo Reales pela fundamental ajuda com os *scripts* de R e pelas proveitosas conversas sobre ciência. Ao Cainã Couto-Silva pelos *scripts* bash. E à Vanessa Jacovas pela ajuda no começo da pesquisa.

Também sou grata à Martiela Freitas pelo tempo dedicado a entender as redes. Ao Pedro Vargas por ter me recebido bem no laboratório. Ao Lucas Viscardi por ter me ensinado os primeiros comandos de bash. À Gabriela Caldas pela companhia nas disciplinas que fizemos juntas. E aos demais colegas do LEHM: Bibiana Fan, Vinícius Sortica, Gabrielle Rosa, Camila Cantele e Luane Landau pela convivência agradável no laboratório.

Agradeço também aos funcionários e professores do PPGBM pela competência e ensinamentos. Em especial ao professor Aldo Araújo que foi meu orientador durante a graduação e que muito me ensinou sobre genética.

Meus agradecimentos especiais aos que fazem parte da minha vida pessoal. Os amigos que estiveram mais presentes nesses dois anos: Alex Moraes, Juliana Mesomo, Giulia Bicca e Tobias Balbinder. E aos meus familiares, meus pais por me apoiarem em tudo e meus irmãos pela convivência e amizade. Sou grata sobretudo à minha irmã Juliana pelas conversas, conselhos e por todo o incentivo sempre.

Por fim, agradeço ao CNPQ pela bolsa concedida.

Sumário:

Resumo.....	8
Abstract.....	10
Introdução.....	12
1.1 Cor de pele e radiação ultravioleta.....	12
1.2 Pressão seletiva em ambientes com alta incidência de radiação: Fotólise da vitamina B9 e câncer de pele.....	14
1.3 Pressão seletiva em ambientes com baixa incidência de radiação: Fotossíntese de vitamina D.....	16
1.4 Evolução da cor de pele humana e a adaptação das populações nativas continentais à incidência de radiação.....	19
1.5 Variação da cor da pele em Nativos Americanos: implicações adaptativas.....	24
Objetivos.....	31
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
Amostra e Métodos.....	32
3. Populações e Genes.....	32
3.1 Populações amostradas.....	32
3.2 Categorias populacionais.....	33
3.2.1 Para testar a influência das práticas de subsistência e hábitos de dieta.....	34
3.2.2 Para testar a influência da altitude.....	34
3.2.3 Para discriminar a influência das práticas de subsistência/hábitos de dieta da altitude.....	34

3.2.4 Para testar a influência da latitude.....	35
3.3 Seleção de genes e obtenção de SNPs.....	35
3.3.1 Metabolismo da vitamina D.....	35
3.3.2 Controle da expressão da vitamina D.....	35
3.3.3 Via da pigmentação da pele.....	35
4 Análises dos dados.....	36
4.1 Análises de SNPs em diferentes grupos populacionais.....	36
4.2 Análises de redes e combinações alélicas: Coeficiente de Correlação Personalizado e BlocBuster.....	37
4.2.1 Filtro de Desequilíbrio de Ligação (LD).....	38
4.2.2 Formação das redes.....	38
4.2.3 Testes de permutação e validação do limiar.....	39
4.2.4 Simulação e medida de associação das arestas.....	40
4.2.5 Comparação entre redes e combinações alélicas específicas e grupos populacionais.....	40
4.3 Estimativa do nível de estruturação das categorias.....	41
Resultados.....	42
5.1 Influência das práticas de subsistência e hábitos de dieta.....	42
5.2 Influência da altitude.....	43
5.3 Distinção entre a influência da altitude e da dieta.....	43
5.4 Influência da latitude.....	44
6. Formação das redes e medida de associação entre as interações.....	45
6.1 Filtro de LD e aplicação do BlocBuster.....	45

6.2 Testes de permutação e associação entre alelos considerando as 9 redes.....	47
6.3 Interações intergênicas (alelo-alelo).....	48
6.4 Comparação entre redes e combinações alélicas específicas e grupos populacionais.....	49
6.4.1 Influência das práticas de subsistência e hábitos de dieta.....	50
6.4.2 Influência da altitude.....	50
6.4.3 Distinção entre a influência da altitude e das práticas de subsistência/hábitos de dieta.....	51
6.4.4 Influência da latitude.....	51
7. Análises de SNPs em diferentes grupos populacionais.....	51
Discussão.....	53
8.1 Considerações sobre os métodos utilizados.....	53
8.2 Variações nos genes e vias sob investigação e suas implicações.....	57
8.2.1 Práticas de subsistência e hábitos de dieta.....	57
8.2.2 Influência da altitude.....	62
8.2.3 Influência da latitude.....	64
Conclusões e reflexões finais.....	67
Referências Bibliográficas.....	72
Imagens Suplementares.....	84
Figura suplementar 1.....	84
Tabela S1. Classificação das populações estudadas.....	85
Tabela S2. Genes envolvidos no metabolismo da vitamina D.....	89
Tabela S3. Genes envolvidos no controle da expressão da vitamina D.....	90
Tabela S4. Genes relacionados com pigmentação de pele.....	92

Tabelas suplementares 5 e 6.....	96
Tabela S7.....	97
Tabela suplementar 8.....	98

Resumo:

A adaptação humana à radiação ocorre, basicamente, pela seleção em genes relacionados à vitamina D e à pigmentação de pele. O objetivo desse trabalho é avaliar se há sinal de que um conjunto pré-selecionado de genes e variantes comuns nessas duas vias estão coevoluindo em populações nativas americanas que habitam diferentes regiões e que têm distintos hábitos de subsistência e dieta. Então podemos sugerir que, se as populações autóctones americanas estiverem adaptadas a seus respectivos contextos geográficos/ecológicos/culturais, é possível que apresentem distribuição alélica diferencial nesses *loci*.

Para testar a hipótese acima, utilizamos dados de varredura genômica, pré-selecionando SNPs de 16 genes (8 relacionados a vitamina D e 8 a pigmentação) em 333 indivíduos de 33 populações nativas. Com objetivo de testar coadaptação, aplicamos um método de redes que mede interação por meio de um cálculo de desequilíbrio de ligação.

Comparamos as frequências alélicas, bem como a frequência de indivíduos com as interações alélicas, entre as categorias populacionais relacionadas à incidência de radiação (altas altitudes vs baixas altitudes e altas latitudes vs baixas latitudes) e a potencial variação da disponibilidade de vitamina D na dieta (agriculturalistas vs caçadores-coletores). Aplicando o teste exato de Fisher com correção FDR, encontramos diferenças estatisticamente significativas em diversos SNPs, bem como em combinações alélicas que sugerem interação.

Alguns achados merecem destaque. Por exemplo, entre as categorias altas latitudes e baixas latitudes, detectamos uma variante no gene *CYP2R1* (alelo A do rs2060793), que confere mais eficiência à enzima codificada por ele, mais frequente em indivíduos de altas latitudes (e baixa incidência de UV). A maior frequência desse alelo pode ter sido favorecida pela seleção natural devido a necessidade aumentada da eficiência no metabolismo da vitamina D nesse ambiente com menos disponibilidade da vitamina.

Em relação à comparação entre as categorias altas e baixas altitudes foi encontrada em maior frequência a ligação entre alelos potencialmente

funcionais dos genes *CYP24A1* e *VDR* (alelo C do rs2248359 e alelo G do rs11574143, respectivamente) nas terras altas, o que pode ter sido resultado do relaxamento da pressão de seleção para eficiência no metabolismo desse hormônio em ambientes com alta incidência de radiação UV em populações com a pele relativamente clara.

No que diz respeito às diferenças nas práticas de subsistência e hábitos de dieta, um alelo (A do rs4516035) relacionado a maior atividade do VDR pode ter sido selecionado em agriculturistas para compensar a menor disponibilidade dessa vitamina na alimentação deles. Além disso, identificamos alelos (rs3740164/C e rs750358/T) de diferentes genes (*CUBN* e *OCA2*, respectivamente) pertencentes a vias distintas (metabolismo da vitamina D e rota da pigmentação) que podem estar sendo segregados juntos em populações nativas que praticam agricultura por favorecerem adaptativamente os indivíduos nesse contexto em particular.

Palavras-chave: Vitamina D, pigmentação de pele, nativos americanos, adaptação, coadaptação, interação gênica, radiação ultravioleta.

Abstract:

The human adaptation to UV radiation occurs, basically, by selection in genes related to vitamin D and skin pigmentation. The objective of this work is to evaluate if there is a signal that a pre-selected set of genes and common variants in these two pathways are co-evolving in Native American populations that inhabit different regions and that have distinct habits of subsistence and diet. Thus, we can suggest that if Native American populations are adapted to their respective geographic/ecological/cultural contexts, they may have differential allelic distribution at these loci.

To test the hypothesis above, we used genomic scanning data, pre-selecting SNPs from 17 genes (8 related to vitamin D and 9 to pigmentation) in 333 individuals from 33 Native American populations. In order to test co-adaptation, we applied a method of networks that measures interaction using linkage disequilibrium (LD) approaches.

We compared allele frequencies as well as the frequency their interactions, considering population categories related to UV radiation (high altitudes vs low altitudes and high latitudes vs low latitudes), as well as the potential variation of vitamin D availability in the diet (agriculturalists vs hunter-gatherers). Applying the Fisher exact test with FDR correction, we found statistically significant differences in several SNPs, as well as in allelic combinations, suggesting interaction.

Some findings deserve attention. For example, among the high latitudes and low latitudes categories, we detected a variant in the *CYP2R1* gene (allele A of rs2060793), which gives more efficiency to the enzyme encoded by it, more frequent in individuals of high latitudes (and low incidence of UV). The higher frequency of this allele may have been favored by natural selection because of the increased need for vitamin D metabolism efficiency in this environment with less vitamin availability.

Regarding the comparison between the high and low altitudes categories, the interaction between potentially functional alleles of the genes *CYP24A1* and *VDR* (rs2248359 C allele and G allele of rs11574143, respectively) was found to be more frequent in high altitudes populations, which

may have resulted from the relaxation of the selection pressure for efficiency in the metabolism of this hormone in environments with high incidence of UV radiation in populations with relatively clear skin.

Concerning differences in subsistence practices and dietary habits, an allele (A of rs4516035) related to increased VDR activity may have been selected in agriculturalists to compensate for the lower availability of this vitamin in their foods. In addition, we identified alleles (rs3740164 / C and rs750358 / T) from different genes (*CUBN* and *OCA2*, respectively) belonging to distinct pathways (vitamin D metabolism and route of pigmentation) that may be segregating together in agriculturalists, favoring adaptatively individuals from that context.

Keywords: Vitamin D, skin pigmentation, Native American, adaptation, co-adaptation, gene interaction, ultraviolet radiation.

Introdução:

1.1 Cor de pele e radiação ultravioleta

A cor de pele é uma das características fenotípicas que distingue de modo mais marcante as populações humanas. Isso é reflexo da grande diversidade interpopulacional para este traço, aproximadamente 88%, em contraposição à relativamente baixa diversidade genética geral existente entre grupos humanos, estimada entre 5% e 15% (Relethford, 2002). Além disso, há assinatura de seleção, tanto positiva como purificadora, em muitos genes envolvidos com pigmentação de pele (Hancock *et al.*, 2011; Sturm e Duffy, 2012), o que denota sua importância adaptativa.

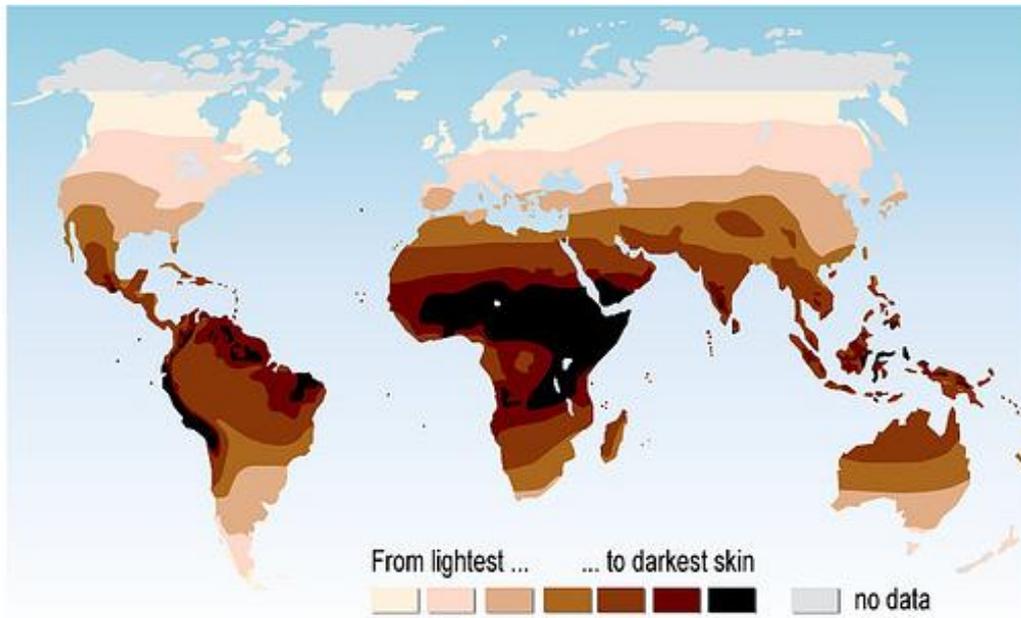
A pigmentação cutânea é determinada pela melanina, um polímero orgânico derivado do aminoácido tirosina, produzida nos melanócitos, células do estrato basal da epiderme. Existem dois tipos de melanina quimicamente distintos, a eumelanina (com coloração de marrom a preta e formato oval) e a feomelanina (com coloração de amarelo a vermelho e formato esférico) (Ito e Wakamatsu, 2003; Sturm, 2006; Scherer e Kumar, 2010; Cerqueira, *et al.*, 2014). Ambos os tipos de melanina são sintetizados e armazenados nos melanosomos, organelas tecido-específicas relacionadas aos lisossomos (Raposo *et al.*, 2009; Scherer e Kumar, 2010). Quando maduros, os melanosomos são transportados através de projeções dendríticas dos melanócitos até os queratinócitos (Sturm, 2006; Scherer e Kumar, 2010). Os diferentes tons de pele são influenciados pela quantidade, tamanho e o tipo de melanina dos melanosomos depositadas nos queratinócitos da epiderme (Barsh, 2003; Scherer e Kumar, 2010; Deng e Xu, 2018; Figura suplementar 1).

O pigmento melanina exerce um papel fotoprotetivo, bloqueando a penetração da radiação ultravioleta (RUV) na pele (Jablonski, 2004; D’Orazio, *et al.*, 2013). Atualmente acredita-se que a diversidade de pigmentação da pele em populações humanas evoluiu por uma demanda adaptativa para regular a quantidade de raios ultravioleta que penetram na pele em diferentes ambientes (Jablonski e Chaplin, 2000, 2010; McEvoy *et al.*, 2006; Lewis *et al.*, 2013; Deng e Xu, 2018, Crawford *et al.*, 2017; Martin *et al.*, 2017).

Os raios UV são a porção do espectro solar que compreende os comprimentos de onda entre 100 nm e 400 nm, entre a luz visível e os raios gama. Eles são subdivididos em três componentes com base em propriedades eletrofísicas, UVA, UVB e UVC. Os fótons UVA (400-315 nm) são os menos energéticos, como consequência de sua menor frequência têm maior poder de penetração, correspondendo entre 90% e 95% da radiação ultravioleta que penetra na atmosfera (D’Orazio, *et al.*, 2013). Os raios UVB (315-280 nm), equivalem de 5% a 10% da radiação incidente na terra, devido ao menor comprimento de onda sua penetração varia mais intensamente com a altitude e o ângulo zênite, o que implica em grande variação com a estação do ano e o período do dia (Engelsen, 2010; Jablonski e Chaplin, 2009; 2010; Hosseinezhad e Holick, 2013; D’Orazio, *et al.*, 2013; Greaves, 2014). Os raios UVC (280-100 nm) geralmente são integralmente absorvidos pela camada de ozônio e não penetram na terra (Jablonski, 2004; Scherer e Kumar, 2010; D’Orazio, *et al.*, 2013; Holick, 2016).

A ideia de que o fator seletivo primário para adaptação da cor de pele é a radiação, é baseada no fato de que esse traço fenotípico é mais fortemente correlacionado com radiação ultravioleta do que com qualquer outro fator ambiental (Walter, 1971; Jablonski e Chaplin, 2000; Chaplin, 2004). Um estudo de George Chaplin (2004) mostrou que aproximadamente 86% ($r = 0,927$ $p < 0,0001$) da variação na cor de pele humana pode ser explicada exclusivamente pelos níveis de UVMED no outono. UVMED é uma forma de medir os efeitos da radiação na pele, e significa “dose mínima de eritema”. Em outras palavras, é a quantidade de radiação necessária para produzir um leve rubor em pessoas com pele clara (tipo 1 na escala de Fitzpatrick), sendo principalmente determinado por UVB (Jablonski e Chaplin, 2000; 2010; 2013).

A incidência de radiação é maior em latitudes baixas e altitudes elevadas, portanto povos autóctones de regiões com essas características tendem a ter pele mais escura do que populações originárias de outras regiões (Jablonski e Chaplin, 2000, 2010) (Figura1) (Imagem adaptada de Chaplin, 2004).



Source: Chaplin G.®, *Geographic Distribution of Environmental Factors Influencing Human Skin Coloration*, *American Journal of Physical Anthropology* 125:292–302, 2004; map updated in 2007.

Figura 1: Mapa de distribuição de cor de pele de populações nativas, quantificada por refletância, previsto por modelo de regressão múltipla (Imagem copiada de: <https://www.vitamindwiki.com/Skin+color+and+vitamin+D+%E2%80%93+Jablonski+%E2%80%93+Spring+2012>).

Esses resultados de regressão da cor de pele pela radiação UV ilustram a importância da radiação como agente seletivo. Para elucidar a razão fisiológica que gerou essa forte relação causal é preciso compreender os efeitos para o organismo da penetração da radiação na pele.

1.2 Pressão seletiva em ambientes com alta incidência de radiação: Fotólise da vitamina B9 e câncer de pele

Não havendo quantidades suficientes de eumelanina na pele para absorver e dispersar a radiação, os raios UVA são facilmente capazes de penetrar até a derme (D’Orazio *et al.*, 2013). Nesta camada a radiação tem acesso aos vasos sanguíneos, onde circulam compostos bioativos da vitamina B9, genericamente chamados de folatos. Essas moléculas, em especial o 5-metiltetraidrofolato (5-MTHF) que é a principal forma circulatória do folato no corpo humano, são essenciais para a saúde. Os compostos químicos que compõem a família da vitamina B9 estão ligados às reações de metilação e são importantes na síntese e reparo do DNA. Baixos níveis destas substâncias estão associados a diversos problemas de saúde, como defeitos no tubo

neural, anemia megaloblástica, doenças cardiovasculares, câncer e distúrbios cognitivos (Borradale e Kimlin, 2012; Jablonski e Chaplin, 2013; Scaglione e Panzavolta, 2014; Lucock, *et al.*, 2015).

Os raios UVA são capazes de degradar de forma direta o ácido fólico e indiretamente, por meio da geração de espécies reativas de oxigênio, o 5-MTHF (para mais detalhes sobre esses processos, consultar Borradale e Kimlin, 2012). Baixas quantidades dessas substâncias afetam o sucesso reprodutivo masculino, uma vez que prejudicam a espermatogênese (Mathur *et al.*, 1977; Boxmeer *et al.*, 2009). A deficiência de folato também compromete o desenvolvimento embrionário, gerando defeitos no tubo neural, como espinha bífida, o que se constitui como importante fator seletivo para aumento de pigmentação de pele em ambientes de alta exposição à radiação ultravioleta (Jablonski e Chaplin, 2010).

Ambientes de alta incidência de radiação, principalmente do espectro UVB, também estão associados ao aumento de incidência de câncer de pele, especialmente em indivíduos com pele clara (Scherer e Kumar, 2010; Greaves, 2014). Os cânceres de pele, induzidos pela ação mutagênica da radiação, são classificados em duas categorias principais: os melanomas, originados por alterações nos melanócitos, e os cânceres de pele não-melanoma, originados em outras células epidérmicas, predominantemente nos queratinócitos (Scherer e Kumar, 2010). Alguns estudos (Blum, 1961; Elias e Williams, 2013) argumentam que o câncer de pele não poderia constituir-se como força seletiva relevante para o escurecimento de pele, dado que costuma ocorrer depois da idade reprodutiva e está associado a baixa letalidade.

Outros autores (Robins, 1991; Lewis *et al.*, 2013; Greaves, 2014), no entanto, discordam dessa visão. Alegam que não é adequado usar parâmetros atuais de incidência e letalidade da doença para pensar sobre a diminuição no valor adaptativo gerada pelo câncer de pele em outros momentos da história evolutiva humana. Seria preciso contextualizar o papel que esta doença teria tido durante a ocorrência do fenômeno. O processo mais evidente de alteração da pigmentação na linhagem Homininea teria ocorrido quando populações com a pele clara habitavam ambientes com mais incidência de radiação UV e teriam menos recursos culturais para prevenir a doença, tais como roupas, protetores

solares, além de menos conhecimento sobre as implicações da exposição intensiva ao sol. Desse modo, passariam mais tempo ao ar livre e não haveria prevenção nem tratamento de saúde apropriado. Além disso, o câncer do tipo melanoma, embora seja bastante mais raro que os demais, ainda nos dias de hoje acomete jovens em idade reprodutiva, e muitas vezes leva a óbito. Então ao menos esse tipo de câncer é reconhecido como tendo influência seletiva, ainda que moderada, para o aumento de pigmentação (Jablonski e Chaplin 2010).

1.3 Pressão seletiva em ambientes com baixa incidência de radiação: Fotossíntese de vitamina D

A vitamina D, é na verdade um pró-hormônio do hormônio esteroide $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D, também chamado de calcitriol (Pilz, *et al.*, 2016). Trata-se de um elemento fundamental para manutenção da homeostase do cálcio e está envolvido em processos fisiológicos essenciais como mineralização óssea. Baixas quantidades dessa substância são a causa de problemas esqueléticos como raquitismo, estreitamento da pélvis e osteoporose (Jablonski e Chaplin, 2009; Veldurthy, *et al.*, 2016). Além dessas ações clássicas, o calcitriol também gera outros efeitos biológicos importantes. Ele está associado, por exemplo, à inibição da progressão de vários tipos de câncer, protege de muitas doenças autoimunes e exerce efeitos sobre o sistema cardiovascular (Christakos, *et al.*, 2016).

A vitamina D pode ser obtida por meio de duas fontes: a alimentação, que provê cerca de 20% da quantidade requerida pelo organismo; e a síntese cutânea, responsável por 80% (Pilz, *et al.*, 2016). Além do nível de exposição à radiação, a produção cutânea de vitamina D depende da pigmentação de pele já que quanto maior a quantidade de melanina menor a penetração de radiação. Peles escuras produzem até seis vezes menos vitamina D que peles claras (Juzeniene *et al.*, 2009; Engelsen, 2010). A produção endógena do hormônio da vitamina D ocorre a partir de um conjunto de reações fotoquímicas e enzimáticas e envolve uma série de genes, conforme será descrito a seguir.

A penetração da radiação ultravioleta do espectro B na pele, especialmente nos comprimentos de onda entre 295 nm e 297 nm, provoca a quebra do 7-deidrocolesterol (7-DHC), que é um esteroide localizado na membrana plasmática dos queratinócitos. Essa reação fotolítica gera a pré-vitamina D₃, que sofre um rearranjo sensível à temperatura, convertendo-se em vitamina D₃, o colecalciferol. Exposição continuada ao sol pode converter a previtamina D₃ em fotoprodutos inativos, o taquisterol e o lumisterol, evitando intoxicação de vitamina D induzida pelo sol (Hossein-nezhad e Holick, 2013; Lucock, *et al.*, 2015; Christakos, *et al.*, 2016; Veldurthy, *et al.*, 2016).

Uma vez formada, a vitamina D₃ é ejetada da membrana plasmática dos queratinócitos e levada até o fígado pela proteína de ligação à vitamina D, DBP (codificada pelo gene *GC*). No fígado o colecalciferol sofre uma hidroxilação no carbono 25, catalisada pela enzima 25-hidroxilase (codificada pelo gene *CYP2R1*), transformando-se em calcidiol, 25(OH)D₃. O calcidiol é transportado pela DBP até os rins, onde as proteínas receptoras transmembrana megalina (codificada pelo gene *LRP2*) e cubilina (codificada pelo gene *CUBN*), localizadas nos túbulos proximais, ligam-se a DBP e promovem a internalização do 25(OH)D₃ (Hossein-nezhad e Holick, 2013; Jolliffe, *et al.*, 2015; Veldurthy, *et al.*, 2016). No interior das células do túbulo proximal, o calcidiol sofre outra hidroxilação, desta vez no carbono 1 por meio da enzima 1 α -hidroxilase codificada pelo gene *CYP27B1*, convertendo-se no hormônio secosteroide calcitriol, 1 α ,25-dihidroxitamina D₃ (1,25[OH]₂D₃) (Engelsen, 2010; Hossein-nezhad e Holick, 2013; Christakos, *et al.*, 2016; Veldurthy, *et al.*, 2016).

O calcitriol tem o efeito de reter o cálcio no organismo, ele provoca aumento da absorção intestinal desse elemento, melhora a reabsorção renal e favorece a mineralização óssea. A atividade da enzima 1 α -hidroxilase, que o produz, é estreitamente regulada tendo sua expressão aumentada pelo paratormônio (PTH), hipocalcemia e hipofosfatemia e é inibida pela hiperfosfatemia, pelo fator 23 de crescimento do fibroblasto (FGF23) e pelo próprio 1,25(OH)₂D₃ (Kini e Nandeesh, 2012; Hossein-nezhad e Holick, 2013; Veldurthy, *et al.*, 2016).

Em ocasiões de excesso de cálcio e vitamina D no organismo, pode ocorrer a expressão do gene *CYP24A1*, que codifica a enzima que hidroxila o carbono 24 tanto do calcidiol quanto do calcitriol, gerando respectivamente os produtos $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ que são metabolizados a ácido calcitriólico e excretados (Christakos, *et al.*, 2016; Pilz, *et al.*, 2016; Holick, 2016).

O calcitriol também desempenha um papel importante na regulação da expressão gênica. As ações genômicas do calcitriol são mediadas pelo fator de transcrição VDR (codificado por um gene de mesmo nome). O VDR é membro da superfamília de receptores nucleares de hormônios que regulam a transcrição, ele possui mais de 900 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em populações humanas, alguns deles associados a fenótipos clínicos. Os SNPs mais frequentemente estudados neste gene são rs1544410, rs731236, rs2228570 e rs7975232, conhecidos pelo nome das enzimas de restrição que os clivam, respectivamente *BsmI*, *TaqI*, *FokI* e *Apal* (Santoro *et al.*, 2015; Nunes *et al.*, 2016; Alizadeh *et al.*, 2017).

Ao ligar-se a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ o VDR entra no núcleo, onde sofre uma heterodimerização, associando-se ao receptor retinoide X (RXR), codificado pelo gene *RXRA*. O complexo ativo $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR-RXR, interage com regiões específicas no DNA, os elementos de resposta à vitamina D (VDREs) localizados em genes alvo ou em seu entorno. Essa interação leva ao recrutamento de outras proteínas que modulam a expressão gênica resultando na ativação ou repressão da transcrição. O VDR é quase ubíquo, está presente em mais de 38 tecidos e diversos tipos celulares, dentre eles o epitélio intestinal, mamário, túbulos renais, glândula pituitária, paratireoide, tecidos reprodutivos, queratinócitos, células do sistema imune, etc. (Haussler *et al.*, 2011; Lucock, *et al.*, 2015). Estima-se que o calcitriol regule, direta ou indiretamente, 2.000 genes que exercem diversas funções no genoma humano, indicando a importância desse hormônio (Hosseini-nezhad e Holick, 2013; Christakos, *et al.*, 2016; Holick, 2016). O esquema apresentado na Figura 2 ilustra os processos supramencionados.

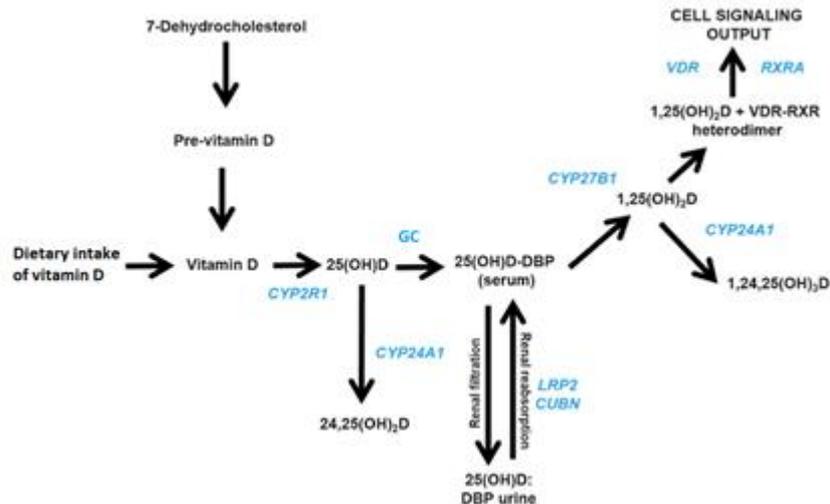


Figura 2: Diagrama que descreve as etapas das vias de metabolismo e sinalização da vitamina D. Em azul estão os principais genes envolvidos no metabolismo e controle da expressão, cujas funções estão descritas no texto. Este esquema é uma adaptação de Jolliffe, *et al.* (2015) e contém a lista de genes, relacionados a vitamina D, candidatos deste estudo.

A importância de produção cutânea e os efeitos deletérios da falta dessa substância, levaram à formulação da hipótese de que ambientes com pouca incidência de radiação seriam vantajosos seletivamente para indivíduos com pele clara. Isso constitui-se na 'hipótese da vitamina D', que é a teoria mais aceita atualmente para explicar por que populações autóctones de regiões com baixa incidência de radiação tendem a ter a pele clara.

1.4 Evolução da cor de pele humana e a adaptação das populações nativas continentais à incidência de radiação

Acredita-se que o ancestral comum aos humanos e chimpanzés tinha pele clara coberta de pelos, à semelhança da maioria dos atuais primatas pertencentes à infraordem Catarrhine (Jablonski e Chaplin 2000; 2010; Jablonski, 2004). Após a divergência entre as duas linhagens, estimada aproximadamente 6,5-9,3 milhões de anos atrás (Moorjani *et al.*, 2016), houve seleção para perda de pelos corporais no grupo que deu origem aos humanos. Não é possível datar o surgimento desse traço, pois não são conhecidas as mutações subjacentes a ele (Stoneking, 2017). Alguns trabalhos argumentam

que a perda de pelos corporais teria surgido em resposta à necessidade aumentada de termorregulação. Segundo essa hipótese, o evento teria começado a ocorrer progressivamente há 2 milhões de anos, devido ao estresse térmico gerado pela migração para ambientes abertos de Savana e adoção de atividades musculares extenuantes, como a caça diurna (Wheeler, 1992; Rogers *et al.*, 2004; Ruxton e Wilkinson, 2011).

De qualquer modo, a perda de pelos corporais levou à alteração em uma série de estruturas da pele, selecionando variantes em genes responsáveis pela diminuição da permeabilidade e aumento da resistência à abrasão (Jablonski e Chaplin, 2010). Este fenótipo também causou diminuição da proteção contra radiação ultravioleta (RUV), que degrada o folato, vitamina importante na síntese e no reparo do DNA que protege contra defeitos congênitos na formação do tubo neural. Isso resultou em pressão seletiva para aumento da produção cutânea do pigmento melanina, que é fotoprotetivo, e consequente escurecimento da pele ao longo das gerações (Jablonski e Chaplin, 2000, 2010, 2017). Há cerca de 1,2 milhões de anos a seleção favoreceu uma variante do gene *MC1R*, receptor de melanocortina 1, que confere pele escura às populações africanas e está sob seleção purificadora neste continente (Rogers *et al.*, 2004). Análises mostraram sinais de seleção positiva para esse alelo, indicando também que o processo de escurecimento da pele provavelmente começou a ocorrer antes do surgimento dos humanos modernos, datado entre 200 mil e 300 mil anos atrás (Stoneking, 2017; Deng e Xu, 2018; Crawford, *et al.*, 2017). Além de *MC1R*, variantes em outros genes da via da pigmentação também estariam segregando por centenas de milhares de anos na linhagem dos hominíneos (Crawford, *et al.*, 2017).

Quando algumas populações humanas modernas saíram da África, cerca de 100 mil anos atrás em direção a latitudes norte, passaram a viver em um ambiente com menos exposição à radiação. Como já mencionado, a radiação UVB permite a fotossíntese cutânea de vitamina D, que embora possa ser adquirida através da dieta, tem a produção endógena como principal fonte. A menor incidência de UVB leva à diminuição deste pró-hormônio, cuja deficiência é causa de uma série de problemas de saúde, incluindo alguns diretamente relacionados à diminuição do valor adaptativo, como estreitamento

da pélvis, que gera problemas no parto, e raquitismo (Jablonski e Chaplin, 2009). Nesse novo ambiente, indivíduos com quantidades menores de melanina na pele, e, portanto, mais facilidade na etapa inicial de síntese da vitamina D, passaram a ter vantagem seletiva.

No Oriente Médio, há aproximadamente 60-50 mil anos, os humanos anatomicamente modernos entraram em contato com os Neandertais (*Homo neanderthalensis*, espécie de hominíneo arcaico que divergiu do *Homo sapiens* moderno há ~430 mil anos e viveu na Eurasia entre 400-28 mil anos atrás) (Deng e Xu, 2018; Kuhlwilm, *et al.*, 2016). Não se sabe ao certo qual era a cor de pele desses hominíneos, entretanto a maioria dos autores acredita que eles possuíam a pele clara, quando comparada aos africanos do sul do Saara (Juzeniene *et al.*, 2009; Stoneking, 2017; Deng e Xu, 2018; Crawford, *et al.*, 2017).

De forma pioneira, nosso grupo de pesquisa, utilizando 124 SNPs localizados em 33 genes e 7 regiões intergênicas ligados a via da pigmentação, desenvolveu um método para predição dos fenótipos de cor da pele, cabelo e olhos a partir de genomas completos já conhecidos (Cerqueira *et al.*, 2012). Os resultados indicaram que os 3 Neandertais amostrados na atual Croácia (Vi33.16, Vi33.25 e Vi33.26) teriam uma pele relativamente escura (similar a dos atuais europeus do mediterrâneo) e cabelo castanho, exceto o indivíduo Vi33.25 que seria ruivo. Anteriormente, Lalueza-Fox *et al.* (2007) encontraram uma variante no gene *MC1R* em dois Neandertais que habitavam a atual Espanha, similar a que nos humanos modernos determinaria pele clara e cabelos ruivos.

A partir do conhecimento do primeiro genoma nuclear completo do Neandertal (Green e cols. 2010), foi possível também identificar a dimensão do intercruzamento entre as duas espécies. Cerca de 2% do genoma das populações não-africanas modernas seria de origem Neandertal (Skoglund e Mathieson, 2018). Como resultado, alguns autores postulam que houve a entrada de alelos Neandertais relacionados à pigmentação mais clara em algumas populações da nossa espécie, novamente considerando uma comparação com africanos do sul do Saara. Esses alelos teriam sido selecionados positivamente, conforme sugerido a partir de dados que apontam

que nas populações europeias, um haplótipo que contém um alelo de origem Neandertal no gene *BNC2*, têm frequência de 70%. Esse haplótipo codifica uma proteína com função relacionada a saturação da cor da pele (Jacobs *et al.*, 2013; Marciniak e Perry, 2017).

Outros autores demonstraram ainda uma origem de variantes ligados ao clareamento da pele na nossa espécie. Por exemplo, um alelo a montante do gene *KITLG* (que codifica uma proteína com amplo espectro de atuação, incluindo melanogênese) associado à pele mais clara teria sido selecionado há cerca de 30 mil anos no ancestral comum das populações asiáticas e europeias (Beleza, *et al.*, 2012; Deng e Xu, 2018; Stoneking, 2017). Dados do HGDP (*Human Genome Diversity Project*) por sua vez mostraram que essa variante de *KITLG* também teria se espalhado pela Oceania, e é bastante frequente nas populações ameríndias estudadas até o presente (Deng e Xu, 2018).

Em contrapartida, um número significativo de variantes populacionais-específicas ligadas a vários outros genes da via da pigmentação, e que estariam associados ao desenvolvimento do fenótipo “pele clara”, teriam emergido de forma independente em populações da Ásia e Europa. Esse fato indica convergência adaptativa e denota a importância da seleção natural na evolução da pigmentação cutânea humana. Por exemplo, a partir de dados obtidos de populações europeias atuais, alelos associados à cor clara nos genes *SLC24A5*, *SLC45A2* (identificados como genes determinantes na pigmentação humana e de outros vertebrados) e *TYRP1* (envolvido na produção de melanina) tiveram seleção estimada entre 19 e 10 mil anos atrás (Beleza, *et al.*, 2012). Estima-se que o alelo relacionado à cor clara no gene *SLC45A2*, embora presente desde 9 mil anos AP na Escandinávia, apresentava frequências muito baixas ou estava ausente na maior parte da Europa antes do início da Era do Cobre (~5.300- 4.800 AP). As variantes associadas à cor de pele clara nos genes *TYR* e *HERC2*, também aumentaram sua frequência mais recentemente, entre 6.500 e 4.000 anos AP na atual Ucrânia (Marciniak e Perry, 2017).

Populações do leste da Ásia têm um alelo relacionado à cor clara no gene *OCA2* que só existe nesta região, então é suposto que se trate de uma

mutação nova que foi selecionada neste local. A exata função da proteína codificada por *OCA2* é desconhecida, mas sabe-se que é essencial para a pigmentação normal e provavelmente está envolvida na produção de melanina. Asiáticos do leste também mostraram seleção positiva exclusiva em uma variante no gene *DCT*, um importante parólogo de *TYRP1* (Deng e Xu, 2018). O gene *MFSD12*, que influencia como a melanina é produzida e armazenada na pele, tem um alelo derivado no leste da Ásia com frequências correlacionadas com baixa intensidade da radiação solar. Esse alelo está ausente na Europa e é relacionado a cor clara, indicando mais uma vez a evolução paralela da despigmentação na Europa e Ásia (Adhikari *et al.*, 2019).

Como um todo, essas investigações com DNA de populações antigas revelaram que o processo de despigmentação possivelmente ocorreu paulatinamente e se acentuou mais recentemente na Eurásia. Outra informação interessante advinda de estudos com DNA de amostras arqueológicas é a possibilidade de que a despigmentação da pele tenha sido influenciada também pela agricultura e não apenas pela incidência de radiação. Um alelo relacionado à pele clara no gene *SLC24A5* estava ausente ou existia em baixas frequências em caçadores-coletores que viveram entre 13 mil e 7 mil anos AP na Europa. Porém, tal alelo seria encontrado em altas frequências ou fixado em agricultores do neolítico que habitavam a Anatólia, região que hoje compõe a maior parte da Turquia, e chegaram na Europa por volta de 7,5 mil anos AP. Este fato sugere que os migrantes desta região levaram tal alelo para a Europa ocidental, sendo o mesmo hoje encontrado em altas frequências em todo continente (Mathieson *et al.* 2015; Marciniak e Perry, 2017).

Um aspecto importante que deve ser mencionado é que uma dieta baseada em plantas domesticadas, comuns em sociedades agriculturalistas, normalmente tem baixas quantidades de vitamina D, em contraste com a alimentação de caçadores-coletores, mais rica e diversa pois contém produtos de caça e recursos marinhos. As evidências arqueológicas de deficiência de vitamina D, baseadas em deformidades esqueléticas e defeitos na mineralização dentária, são raras antes das origens da agricultura e aumentaram ao longo do tempo à medida que as populações humanas deixaram os hábitos de caça e coleta e tornaram-se agriculturalistas e

sedentárias (Brickley *et al.*, 2017). Então, no período de expansão da agricultura, sedentarização e, conseqüentemente, aumento populacional, a seleção de alelos que conferem pele mais clara pode ter sido impulsionada como adaptação para compensar a baixa ingestão da vitamina D e suas conseqüências deletérias (Richards, *et al.*, 2003; Marciniak e Perry, 2017; Stoneking, 2017; Quillen *et al.* 2019).

Como pode ser visto até aqui, os estudos sobre a seleção de alelos de genes relacionados com pigmentação estão predominantemente concentrados em populações europeias e asiáticas, mas alguns dados sobre outros grupos continentais são reveladores. Populações da Oceania, por exemplo, apresentam em altas frequências uma variante específica do gene *OCA2* (Sturm e Duffy, 2012). Há também uma variação não sinônima exclusiva no gene *TYRP1* em habitantes das Ilhas Salomão e em algumas partes do arquipélago de Bismarck. Essa variante está relacionada ao cabelo claro e também, de modo menos acentuado, à cor de pele (Sturm e Duffy, 2012; Deng e Xu, 2018). Foram encontradas variantes em torno de diversos genes, tais como *SLC24A5*, *MFSD12*, *DDB1*, *TMEM138*, *OCA2*, *HERC2*, *SLC24A5*, *TYRP1*, *SMARCA2/VLDLR*, *SNX13*, associadas a diferenças de cor em populações africanas (Martin, *et al.*, 2017; Crawford *et al.*, 2017).

Esses achados como um todo indicam heterogeneidade e complexidade na arquitetura genética por trás da pigmentação humana e mostra a importância de estudar diferentes populações.

1.5 Variação da cor da pele em Nativos Americanos: variabilidade genética e implicações adaptativas

Pouco se sabe sobre pigmentação de pele em nativos americanos. Essas populações têm origem em um grupo de indivíduos que começou a divergir dos asiáticos em torno de 36 mil anos atrás, ainda no nordeste da Ásia. Recentes estudos indicam ainda que houve fluxo gênico com outros asiáticos e com povos norte-eurasianos até aproximadamente 25 e 20 mil anos AP, respectivamente (Moreno-Mayar *et al.*, 2018a).

O resfriamento da Terra durante o último máximo glacial (entre 26 e 18 mil anos AP) ocasionou a diminuição do nível do mar e consequente exposição da Beringia, uma grande massa de terra que juntava o nordeste da Ásia ao noroeste da América. Este local, onde ingressaram os ancestrais dos nativos americanos entre 24 e 20 mil anos AP, era então caracterizado por um clima relativamente ameno (González-José *et al.*, 2008; Fagundes *et al.*, 2008; Bortolini *et al.*, 2014; Amorim, *et al.*, 2017; Moreno-Mayar *et al.*, 2018a; Pinotti, *et al.*, 2019). Não há consenso sobre o tempo em que a Beringia foi habitada, as estimativas variam entre 2,4 mil até 8 mil anos (Raghavan *al.*, 2015; Amorim, *et al.*, 2017; Pinotti, *et al.*, 2019), um tempo estimado como suficiente para a emergência de alelos exclusivos, só encontrados em populações nativas americanas (Amorim, *et al.*, 2017; Posth, *et al.*, 2018).

Entre 18 mil anos AP e o fim do pleistoceno (~12-10 mil anos AP), a massa de terra da Beringia foi sendo reduzida devido ao ótimo climático e, então, aumento do nível do mar. A diminuição de recursos, somada ao aumento populacional, impulsionou a migração de algumas das populações que viviam na Beringia para o sul. Como resultado, entre 19,5 e 15 mil anos AP houve a efetiva entrada no continente americano (González-José *et al.*, 2008; Fagundes *et al.*, 2008; Reich *et al.*, 2012; Bortolini *et al.*, 2014; Amorim, *et al.*, 2017; Pinotti, *et al.*, 2019).

Ao chegarem na América, os primeiros migrantes se depararam com uma ampla variedade de ambientes onde desenvolveram diferentes culturas. Em algumas regiões, como nos Andes e na Mesoamérica, as sociedades se tornaram urbanas e produtoras de agricultura, outras comunidades permaneceram caçadoras-coletoras até os dias atuais (Hünemeier *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2016; Reales *et al.*, 2017).

Vale destacar que a América abriga populações autóctones que habitam regiões com extrema diferença na incidência de radiação UV, desde as altas latitudes do Ártico até elevadas altitudes dos Andes. Pesquisas sobre a cor de pele atual de índios da América são escassas. As informações diretamente observadas mais completas que dispomos são apresentados em um mapa na escala de von Luschan, com dados obtidos antes de 1940 pelo geógrafo italiano Renato Biasutti (figura 3) (Barsh, 2003; Jablonski, 2004; Lewis

et al., 2013). Esse mapa é impreciso, uma vez que o método de medição é subjetivo e as regiões para as quais não havia informações o autor preencheu por extrapolação com os resultados de outras áreas (Robins, 1991; Jablonski, 2004).

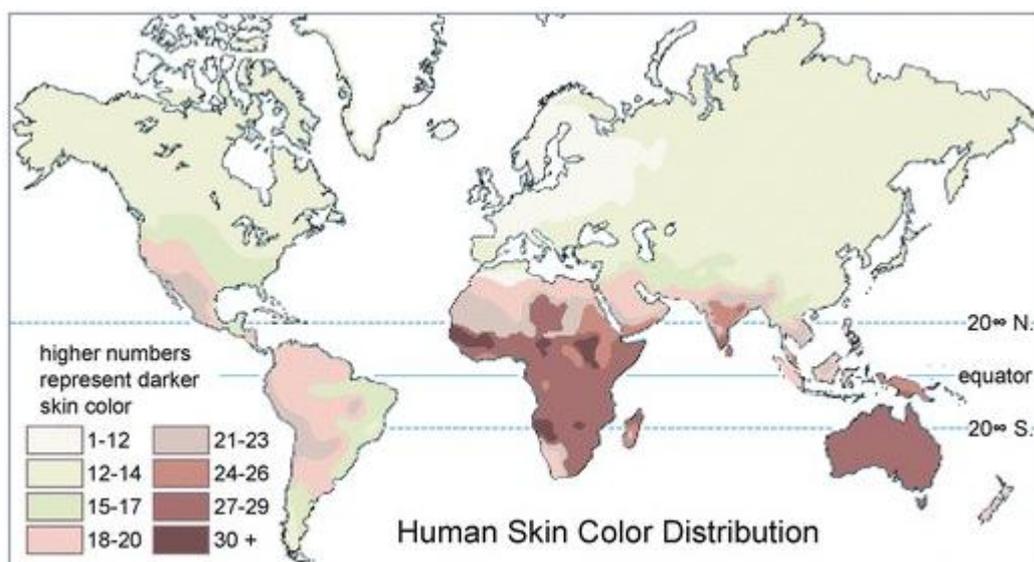


Figura 3: Mapa de distribuição de cor de pele em populações humanas na escala de von Luschan (copiado de Deng e Xu, 2018).

Dados mais precisos sobre cor de pele de nativos americanos, com medida de refletância, são apresentados em poucos trabalhos. Jablonski e Chaplin (2000) compilaram as informações então disponíveis para todas as populações autóctones do mundo. Os autores mostram que existem dados de Inuits (esquimós) do oeste da Groenlândia e de quatro populações da América do sul.

Apesar da escassez de trabalhos sobre o tema nesse conjunto de populações, os indígenas americanos são frequentemente citados (Murray, 1934; Diamond, 1991; Robins, 1991; Aoki, 2002; Barsh, 2003; Jablonski, 2004; Juzeniene *et al.*, 2009; Jablonski e Chaplin, 2000; 2010; 2013; Elias e Williams, 2013; Greaves, 2014; Quillen, 2015; Deng e Xu, 2018; Adhikari *et al.*, 2019; Quillen *et al.* 2019) como exceções à regra de distribuição da cor de pele de populações autóctones. De fato, se compararmos a cor de pele esperada para nativos do continente americano apresentada na figura 1 com as informações obtidas de observação direta destas populações, mostradas na figura 3, percebe-se uma grande diferença. Notadamente os Inuit têm a pele mais

escura do que seria esperado para as latitudes em que eles habitam, e consequente incidência de radiação a que estão expostos. Por outro lado, as populações nativas americanas de latitudes equatoriais e os habitantes das elevadas altitudes andinas têm a pele mais clara do que o esperado.

A inexistência de um gradiente latitudinal de cor de pele equivalente ao encontrado em populações do Velho Mundo pode ter uma base genética, conforme indicado por Adhikari *et al.*, (2019). Ao analisar um amplo conjunto de dados de 6.000 latino-americanos, os autores não detectaram nenhuma variante relacionada a cor de pele exclusiva da América, porém descreveram novas regiões associadas com a pigmentação da pele (em 10q26) e cor do olho (em 1q32, 20q13 e 22q12). Além disso, detectaram uma forte associação com a pigmentação da pele e uma variante (Tir182His; na proteína do gene *MFSD12*) comum, como já mencionado, apenas em asiáticos e nativos americanos. Os autores mostraram que a frequência do alelo derivado (182His) está significativamente correlacionada com a menor intensidade de radiação solar no leste da Ásia, indicando que *MFSD12* esteve sob pressão seletiva em asiáticos, provavelmente após sua separação dos europeus (Adhikari *et al.*, 2019).

Outro estudo que merece destaque é o de Quillen e colaboradores (2012). Neste artigo os autores mostraram que, diferentemente do encontrado em outras populações, um conjunto dos genes de pigmentação em indígenas americanos não teria sinal de ter sofrido ação de seleção, quando comparado com um conjunto aleatório de outros genes do genoma. Todavia isso não significa que determinados genes de pigmentação não tenham sofrido seleção nessas populações, conforme mostrou o mesmo trabalho ao encontrar variantes dos genes *OPRM1* e *EGFR* com sinal da ação de seleção, além de associação com diferenças na cor de pele nos grupos sob investigação (Quillen *et al.*, 2012).

Alguns dos trabalhos que criticam a teoria segundo a qual a cor de pele é uma adaptação à incidência de radiação (Diamond, 1991; Aoki, 2002), utilizam essa discrepância fenotípica para respaldar a idéia de que a pigmentação cutânea não é explicada pela seleção natural. Os autores que defendem que a cor de pele é resultado da seleção natural acreditam que a

inadequação da cor de pele dos nativos americanos pode ser devido a sua chegada relativamente recente ao continente (Jablonski, 2004; Juzeniene *et al.*, 2009; Quillen, 2015; Adhikari *et al.*, 2019). Portanto, segundo eles, essas populações poderiam não ter tido tempo suficiente para se adaptar aos ambientes em que habitam. Com relação aos Inuit especificamente, a alimentação tradicional baseada em mamíferos marinhos e peixes, que é rica em vitamina D, também é usada como justificativa para um padrão de cor diferente daquele esperado (Murray, 1934; Quillen *et al.* 2019). Sobre os indígenas que tem a cor mais clara do que o esperado, além da proposta da colonização recente, são consideradas também outras hipóteses para explicar o fenômeno. Por exemplo, que o uso de roupas poderia ser um fator atenuante para pressão seletiva (Jablonski, 2004), ou que os americanos poderiam ter capacidade aumentada de produzir pigmentação facultativa (bronzamento) (Quillen, 2015).

De fato, o continente americano foi o último a ser habitado por populações humanas e isso poderia constituir-se como fator atenuante para a adaptação. Contudo, trabalhos de nosso grupo de pesquisa e de outros autores têm mostrado que as populações nativas americanas, apesar do relativo pouco tempo no continente, sofreram adaptação específicas, por exemplo: às elevadas altitudes andinas (Jacovas, *et al.*, 2015; Jacovas, *et al.*, 2018), ao ambiente glacial e à dieta protéica ainda na Beringia (Amorim, *et al.*, 2017), às regiões de floresta tropical (Amorim, *et al.*, 2015) e à agricultura desenvolvida na Mesoamérica (Hünemeier *et al.*, 2012). Além disso, conforme exemplo de populações européias, em que parte significativa da despigmentação foi relativamente rápida e recente (entre 12 e 6 mil anos AP), não são exigidas necessariamente muitas gerações para a adaptação deste fenótipo (Gibbons, 2007). Contudo, é preciso ponderar que não se espera resposta molecular exatamente igual considerando diferentes grupos continentais em contextos de evolução paralela, embora estejam sujeitos a similares pressões seletivas e que as mesmas vias sejam cooptadas, esses grupos apresentam um relativamente diferente repertório genético (incluindo nas vias que podem “responder” a determinada pressão seletiva), além de terem passado por diferentes eventos estocásticos e demográficos.

Um ponto central neste debate que é muitas vezes ignorado, embora esteja subjacente à teoria, é que a cor de pele sofre seleção atrelada à resposta fisiológica à radiação UV. Ou seja, o fenótipo que está sendo selecionado é determinado por um amplo conjunto de genes, em vias diferentes, relacionadas tanto à pigmentação quanto ao metabolismo e controle da expressão da vitamina D. Desse modo, medir apenas a cor de pele para determinar se houve adaptação é limitado. Trabalhos de vários autores (Hochberg e Templeton, 2010; Lucock, *et al.*, 2014; 2015; Tiosano, *et al.*, 2016) sustentam a importância do estudo da adaptação à radiação de maneira integrada, considerando a variação em genes pertencentes às diferentes vias que com potencial para interferir no fenótipo.

Hochberg e Templeton (2010) propuseram que além dos genes relacionados à pigmentação, variantes alélicas no gene *VDR* (controle da expressão da vitamina D) integram o complexo evolutivo que adapta os seres humanos a diferentes níveis de exposição à radiação UV. Lucock e colaboradores (2015) ao revisar 28 estudos, encontraram uma relação entre a frequência de alelos específicos de 4 polimorfismos conhecidos no gene *VDR* (*BsmI* (b), *Apal* (a), *TaqI* (t) e *FokI* (f)) e a latitude em populações africanas e eurasiáticas localizadas entre 12° e 60° N. Com base em um trabalho anterior conduzido por Lucock (2014), os autores ainda propuseram hipóteses sobre os mecanismos moleculares por meio dos quais a radiação UV selecionaria variantes específicas do *VDR* e de genes centrais no metabolismo do folato. Isso constitui-se como um possível artifício evolutivo para adaptação conjunta dessas vitaminas fotossensíveis e a pigmentação.

A partir de um método que busca interação gênica, Tiosano e colaboradores (2016) mostraram a existência de coadaptação entre genes de pigmentação e o *VDR*. Este trabalho encontrou uma relação latitudinal entre conjuntos de polimorfismos de genes relacionados à pigmentação e variantes do *VDR*. Esses polimorfismos, de ambas as vias, encontrados em desequilíbrio de ligação foram agregados no que os autores chamaram de 'redes'. Uma informação central deste trabalho é que alguns dos SNPs pertencentes a essas redes, vistos de modo isolado, não se relacionam com a latitude. Ou seja, apenas dentro de um contexto mais amplo, variantes alélicas funcionais de

diferentes vias são selecionadas em conjunto em resposta aos diferentes níveis de radiação, que se alteram com a latitude. Portanto, foi possível comprovar estatisticamente a existência de epistasia relacionada ao valor adaptativo de uma característica fenotípica humana.

As populações nativas americanas, por suas características peculiares são especialmente interessantes para investigar a existência de adaptação e coadaptação nessas vias. Conforme dito anteriormente, essas populações habitam uma ampla gama de latitudes, possuem diferentes hábitos de subsistência e alimentares, além de apresentarem distribuição da cor de pele em desacordo com o esperado pela distribuição geral dessa característica entre os povos autóctones de outros continentes (os habitantes de latitudes equatoriais, como amazônicos e os andinos têm a pele mais clara e os Inuit têm a pele mais escura do que o esperado).

Vale destacar que o nosso trabalho será o primeiro a investigar, além do *VDR* e outros genes de pigmentação, polimorfismos ligados ao controle da expressão e a via metabólica da vitamina D, bem como a interação entre todos eles, acrescentando assim maior complexidade à investigação. Com isso buscamos identificar possíveis combinações alélicas que teriam um potencial funcional e adaptativo considerando os nativos americanos como um todo, bem como grupos populacionais que habitam diferentes ambientes e/ou que possuem distintos hábitos de subsistência e dieta.