

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

DESVENDANDO MECANISMOS GENÉTICOS DE ADAPTAÇÃO À ALTA  
ALTITUDE EM POPULAÇÕES NATIVAS AMERICANAS DOS ANDES

Vanessa Cristina Jacovas

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Cátira Bortolini

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Porto Alegre  
Março de 2019.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Evolução Humana e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratório de Diversidade Humana, no Departamento de Ciências Experimentais e da Saúde da Universidade Pompeu Fabra, no Parque de Pesquisa Biomédica de Barcelona, entre março de 2016 e fevereiro de 2017, com o financiamento do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

## AGRADECIMENTOS

Aos voluntários Nativos Americanos que aceitaram contribuir para que estudos científicos dessa natureza pudessem ser realizados.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup>Dr.<sup>a</sup> Maria Cátira Bortolini, pela confiança em mim depositada, pelos conhecimentos transmitidos diariamente, pela orientação, incentivo e amizade.

*In memoriam*, ao Prof. Dr. Francisco Mauro Salzano, pelo exemplo de pesquisador e cientista, pelas eternas palavras de otimismo. Professor, quanto mais nós conhecemos o mundo, mais te admiramos.

Ao Prof. Dr. David Comas pela atenção, confiança e por me receber tão bem em seu grupo de pesquisa.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>Tábita Hünemeier, por abrir as portas do seu laboratório na Universidade de São Paulo e me proporcionar uma enorme oportunidade de crescimento.

Aos meus grandes colegas do Laboratório de Evolução Humana e Molecular pelo excelente ambiente de trabalho, por todos os cafés, almoços, e pelas palavras de incentivo nos dias mais difíceis.

Aos colegas com quem tive o prazer de trabalhar na Universidade Pompeu Fabra.

Ao meu companheiro, Rafael, pela amizade e parceria, pela compreensão em todos os momentos, pelas palavras de apoio de todos os dias.

Por último, mas não menos importante, à minha família, pelo amor e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. Por todo o esforço que vocês fizeram pra que nós, eu e o mano, tivéssemos a oportunidade de ser quem nós quiséssemos ser.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<i>ABCA1</i>	<i>atp-binding cassette subfamily A, member 1</i>
<i>ANGPT1</i>	<i>angiopoietin 1</i>
<i>ARHGAP15</i>	<i>rho GTPase activating protein 15</i>
<i>ARNT</i>	<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
atm	atmosfera
ATP	adenosina trifosfato
<i>BHLHE41</i>	<i>basic helix-loop-helix family member e41</i>
<i>BRINP3</i>	<i>bone morphogenetic protein/retinoic acid inducible neural-specific 3</i>
<i>C6orf195</i>	<i>chromosome 6 open reading frame 195</i>
<i>CBARA1</i>	<i>calcium-binding atopy-related autoantigen 1</i>
<i>CCDC141</i>	<i>coiled-coil domain containing 141</i>
<i>COL6A1</i>	<i>collagen type 6 alpha-1</i>
<i>CTBP2</i>	<i>c-terminal binding protein 1</i>
<i>ECE1</i>	<i>endothelin converting enzyme 1</i>
<i>EDRF1</i>	<i>erythroid differentiation regulatory factor 1</i>
<i>eNOS</i>	sintase endotelial do óxido nítrico
<i>EPAS1</i>	<i>endothelial PAS domain-containing protein 1</i>
<i>EPO</i>	<i>erythropoietin</i>
<i>FADS</i>	<i>fatty acid desaturases</i>
<i>FAM213A</i>	<i>family with sequence similarity 213, member A</i>
<i>FOXO1</i>	<i>forkhead box O1</i>
FVC	capacidade vital forçada
GWAS	estudos de associação com varredura genômica
<i>HGF</i>	<i>hepatocyte growth factor</i>
<i>HIF</i>	fator de indução por hipóxia
<i>HLA-DR</i>	<i>human leukocyte antigen-DR alpha</i>
<i>HLA-G</i>	antígeno leucocitário humano-G
<i>HLH</i>	<i>helix-loop-helix</i>
<i>HMOX2</i>	<i>heme oxygenase 2</i>
HREs	elementos responsivos à hipóxia

kb	kilobases
<i>KCTD12</i>	<i>k<sup>+</sup> channel tetramerization domain containing 12</i>
<i>LEPR</i>	<i>leptin receptor</i>
LGM	último máximo glacial
<i>LINE-1</i>	<i>long interspersed element-1</i>
m	metros
<i>MDM2</i>	<i>mouse double minute 2 homolog</i>
<i>MHC</i>	complexo principal de histocompatibilidade
mmHg	milímetro de mercúrio
<i>MTHFD1</i>	<i>methylenetetrahydrofolate dehydrogenase, cyclohydrolase and formyltetrahydrofolate synthetase 1</i>
<i>MTHFR</i>	<i>methylenetetrahydrofolate reductase</i>
NO	óxido nítrico
<i>NOS2</i>	nitric oxide synthase 2
<i>NOS3</i>	nitric oxid synthase 3
O <sub>2</sub>	oxigênio
°C	graus Celsius
<i>PAPOLA</i>	<i>poly(A) polymerase alpha</i>
<i>PAS</i>	<i>per arnt sim</i>
<i>PHD</i>	<i>hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 1</i>
<i>PHD2</i>	<i>hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 2</i>
<i>PPARA</i>	<i>peroxisome proliferator-activated receptor A</i>
<i>PRKAA1</i>	<i>protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 1</i>
<i>PTGIS</i>	<i>prostaglandin I2 synthase</i>
RCIU	restrição do crescimento intrauterino
<i>RNF216</i>	<i>ring finger protein 216</i>
<i>RORA</i>	<i>RAR related orphan receptor A</i>
<i>RUNX1</i>	<i>runt related transcription factor 1</i>
RUV	radiação unltravioleta
<i>RXR</i>	<i>receptor retinóide X</i>
<i>RYR1</i>	<i>ryanodine receptor 1</i>
SaO <sub>2</sub>	saturação de oxigênio

<i>SFTPD</i>	<i>surfactant protein D</i>
sHLA-G	HLA-G solúvel
<i>SLC30A9</i>	<i>solute carrier family 30 member 9</i>
SNP	polimorfismo de nucleotídeo único
STRs	<i>short tandem repeats</i>
<i>TBX5</i>	T-Box 5
<i>TED</i>	<i>Tibetan enriched deletion</i>
<i>TEX36</i>	<i>testis expressed 36</i>
<i>THRB</i>	<i>thyroid hormone Receptor beta</i>
<i>TP53</i>	<i>tumor protein P53</i>
<i>VAV3</i>	<i>vav guanine nucleotide exchange factor 3</i>
<i>VDR</i>	<i>vitamin D3 receptor</i>
<i>VEGF</i>	fator de crescimento endotelial vascular
<i>VEGFA</i>	<i>vascular endothelial growth factor A</i>
<i>VHL</i>	<i>von Hipper-Lindau</i>
<i>VRK1</i>	<i>vaccinia related kinase 1</i>

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1.</b> Vias do transporte de O <sub>2</sub> desde a absorção pelos alvéolos pulmonares, até sua utilização para geração de energia na mitocôndria.....	24
<b>Figura 2.</b> Via de HIF.....	27
<b>Figura 3.</b> Órgãos envolvidos na adaptação à altas altitudes, juntamente com genes selecionados da via de HIF e genes-alvo de HIF que podem desempenhar um papel relevante na adaptação à altitude.....	29
<b>Figura 4.</b> Genes da via de HIF com papel na adaptação humana às grandes altitudes.....	29
<b>Figura 5.</b> Os gráficos acima mostram a distribuição da concentração de hemoglobina em população etíope, norte americanos que vivem à nível do mar, tibetanos e andinos, respectivamente em A) homens e B) mulheres.....	34
<b>Figura 6.</b> As distribuições de saturação de oxigênio (SaO <sub>2</sub> ) dos norte-americanos que vivem à nível do mar incidem com a dos etíopes de altas altitudes e contrastam com os índices reduzidos observadas nos tibetanos e andinos.....	34
<b>Figura 7.</b> Mecanismos que podem ativar p53 e as possíveis respostas celulares desencadeadas.....	41
<b>Figura 8.</b> Rede clássica dos genes que interagem com <i>TP53</i> .....	42
<b>Tabela 1.</b> Membros da via do fator de indução por hipóxia (HIF).....	25

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	13
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	16
1. Introdução.....	17
1.1 Considerações gerais.....	17
1.2 Populações Nativas Americanas.....	18
1.3 Adaptação genética à altitude.....	21
1.3.1 O que andinos, tibetanos e etíopes têm em comum.....	21
1.3.2 Adaptação genética à altitude: Os Tibetanos.....	30
1.3.3 Adaptação genética à altitude: Os Etíopes.....	33
1.3.4 Adaptação genética à altitude: Os Andinos.....	36
1.4 O gene <i>TP53</i> e sua <i>Network</i> .....	40
1.5 O gene <i>HLA-G</i> .....	44
1.6 A Busca por Genes e suas Variantes através das Varreduras Genômicas.....	46
1.7 Referências bibliográficas.....	46
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	54
2.1 Objetivo Geral.....	55
2.2 Objetivos Específicos .....	55
2.3 Métodos.....	55
2.4 Resultados.....	56
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	57
Artigo I: <i>Genetic Variations in the TP53 Pathway in Native Americans Strongly Suggest Adaptation to the High Altitudes of the Andes</i> .....	58
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	82
Artigo II: <i>Selection Scan Reveals Three New Loci Related to High Altitude Adaptation in Native Andeans</i> .....	83
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	100
Manuscrito em preparação: <i>Andean high altitude as a potential selection factor influencing haplotype HLA-G 3'UTR distributions in South American Natives</i> .....	101
<b>CAPÍTULO 6</b> .....	134



6.1	Discussão geral.....	135
6.2	Referências bibliográficas.....	141
6.3	ANEXOS.....	143
6.4	Outras produções científicas.....	143
6.4.1.	<i>Novel genetic associations and gene-gene interactions of chemokine receptor and chemokine genetic polymorphisms in HIV/AIDS.....</i>	143
6.4.2.	<i>A tale of agriculturalists and hunter-gatherers: Exploring the thrifty genotype hypothesis in native South Americans.....</i>	144
6.4.3.	<i>Skin Pigmentation Polymorphisms Associated with Increased Risk of Melanoma in Individuals from Southern Brazil.....</i>	145

## RESUMO

O estudo da adaptação humana para vida em altas altitudes é um tema bastante abordado na literatura científica mundial, tanto no que se refere às adaptações genéticas, quanto às adaptações fisiológicas. Historicamente, os estudos nesta área iniciaram-se já nos anos 1900, quando ainda se acreditava que os nativos dessas terras eram seres fisicamente inferiores, sendo que funções fisiológicas "normais" eram consideradas impossíveis em altitudes onde o oxigênio é encontrado em concentrações tão baixas. Essa perspectiva começou a ser alterada quase na década de 50, quando cientistas descreveram a existência de mecanismos fisiológicos que, ao longo dos séculos, aclimataram essas populações ao ambiente extremo ao qual vivem.

No final da década de 70 (início dos anos 80) iniciaram-se os primeiros estudos com adaptação genética para a vida em altas altitudes. Após quase 4 décadas de investigação e mais de duas centenas de publicações relativas à adaptação genética às altas altitudes, ainda não existe um consenso sobre qual gene, ou genes, estão principalmente envolvidos nesse fenômeno.

Deste modo, as abordagens apresentadas nesta tese buscam preencher as lacunas encontradas nesta temática, principalmente no que tange às populações do Altiplano Andino, ainda insuficientemente estudadas e compreendidas. Os resultados desta tese foram apresentados sob a forma de 3 artigos científicos, e os resultados são resumidos como seguem:

Jacovas *et al.*, 2015: A diversidade de cinco polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) localizados nos genes da via *TP53* (*TP53*, rs1042522; *MDM2*, rs2279744; *MDM4*, rs1563828; *USP7*, rs1529916; e *LIF*, rs929271) foram estudadas em um total de 282 indivíduos pertencentes às seguintes populações: Quechua, Aymara, Chivay, Cabanaconde, Yanke, Taquile, Amantani, Anapia, Uros, Guarani Ñandeva e Guarani Kaiowá, caracterizadas como Nativas Americanas apresentando alto nível (> 90%) de ancestralidade indígena. Além disso, acrescentamos ao nosso banco de dados originais, dados já publicados referentes a 100 indivíduos de outras cinco populações Nativas Americanas (Suruí, Karitiana, Maya, Pima e Piapoco). As populações foram classificadas como vivendo em altas altitudes [ $\geq 2.500$  metros (m)] ou em terras baixas (<2.500 m). Nossas análises revelaram que os alelos *USP7-G*, *LIF-T* e *MDM2-T* mostraram evidências significativas de

que foram selecionados e correlacionados a variáveis ambientais adversas inerentes às altas altitudes. Nossos resultados mostram, pela primeira vez, que alelos da rede clássica de *TP53* foram evolutivamente cooptados para o sucesso da colonização humana dos Andes.

Jacovas *et al.*, 2018: O Altiplano Andino tem sido ocupado continuamente desde o final do Pleistoceno, há cerca de 12.000 anos atrás, o que situa os nativos andinos como uma das populações mais antigas a viverem em altas altitudes. No presente estudo, analisamos dados genômicos de Nativos Americanos que vivem há muito tempo no Altiplano Andino e nas áreas de planície da Amazônia e Mesoamérica. Nós identificamos três novos genes candidatos - *SP100*, *DUOX2* e *CLC* - com evidência de seleção positiva para adaptação às altas altitudes em andinos. Esses genes estão envolvidos na via de *TP53* e relacionados a vias fisiológicas importantes para a resposta à hipóxia às altas altitudes, como aquelas ligadas ao aumento da angiogênese, adaptações do músculo esquelético e funções imunes na interface materno-fetal. Nossos resultados, combinados com outros estudos, mostraram que os Andinos se adaptaram ao Altiplano de diferentes maneiras e usando estratégias moleculares distintas em comparação com os de outros nativos que vivem em grandes altitudes.

Jacovas *et al.*, a ser submetido para publicação: A resposta fisiológica à hipóxia envolve uma ampla gama de mecanismos biológicos e, nesse cenário, residentes de altas altitudes são geneticamente adaptados. O *HLA-G* desempenha um papel fundamental em vários processos biológicos, incluindo a reprodução humana e a resposta à hipóxia, sendo um gene potencialmente envolvido na adaptação humana às altitudes elevadas. A variação genética do *HLA-G* já foi caracterizada e mostrou ter grande impacto nos padrões de expressão da proteína. Estudos em nível mundial de populações sugerem que a seleção balanceadora esteja atuando no *HLA-G* principalmente nas regiões regulatórias. No entanto, o conhecimento atual da variação do *HLA-G* nas populações Nativas Americanas e, especialmente, na região 3' UTR não traduzida, ainda é inexplorado. Além disso, a hipótese de que variações específicas nesta região contribuem para a resposta de hipóxia em tais populações ainda não havia sido investigado. Neste estudo, o *HLA-G* 3'UTR foi sequenciado em 301 indivíduos ameríndios de 17 populações (Amantani, Anapia, Andoas, Aimara, Cabanaconde, Chivay, Cinta Larga, Guarani Kaiowá, Guarani Ñandeva, Lengua, Quechua, Taquile, Uros, Xavante, Xicrin, Yanke e Zoró), divididos em residentes de altas altitudes (>2.500m) e habitantes de terras baixas (<2.500m). No total, 11 haplótipos foram

observados, três deles únicos de altas altitudes (UTR-8, -18 e -30) e outros três apenas em terras baixas (UTR-9, -13 e -21). Uma estrutura populacional foi observada nesses dois grupos populacionais e, curiosamente, a variância observada dentro dos grupos (*Fst*) é marcadamente alta (11%) para a UTR-5, indicando uma diferença notável e significativa entre as distribuições de haplótipos. Além disso, análises posteriores mostraram correlações estatísticas entre o UTR-5 e o UTR-2 com diversas variáveis climáticas, incluindo radiação ultravioleta e altitude.

Desta forma nossos dados corroboram a ideia de que não há somente uma única resposta adaptativa ao estresse devido às altas altitudes. Apesar disto, sugerimos que uma regulação adequada de p53 (e proteínas associadas), bem como de HLA-G esteja relacionada à adaptação de altas altitudes nas populações andinas, de forma que não apenas permita a sobrevivência dessas populações, mas também seu sucesso reprodutivo em ambientes hostis. Essa combinação de alelos, no entanto, pode resultar em susceptibilidade ao câncer nos dias atuais. Os mecanismos envolvidos na regulação destas vias, que tem em comum o “gatilho” da hipóxia, bem como suas consequências funcionais, merecem ser alvo de futuras investigações.

## ABSTRACT

The study of human adaptation to life at high altitudes is a widely addressed topic in the world scientific literature with most of studies investigating both genetic and physiological adaptations. Historically, the investigations in this field began in the early 1900 when it was still believed that the native populations belonging to these lands were physically inferior individuals since normal physiological functions were considered insufficient at high altitudes where the oxygen concentrations are limited. This perspective began to change in the '50s when scientists described the existence of physiological mechanisms that over the centuries shaped these populations to the harsh environment of high altitude.

In the late '70s (early '80s) the first studies of genetic adaptation to life at high altitudes began. After almost four decades of investigation and more than two hundred publications relating to genetic adaptation to high altitudes, a consensus of which genetic variant or genes are involved in this phenomenon is still a matter of interest.

In this context, the thematic presented in this thesis seek to fill the gaps in the knowledge of high altitude genetic adaptation. More specifically, we investigated the populations of the Andean Altiplano which are still insufficiently studied and understood. The current thesis are presents in the form of 3 scientific articles, and the results are summarized as follow:

Jacovas *et al.*, 2015: The diversity of five single nucleotide polymorphisms (SNPs) located in genes of the *TP53* pathway (*TP53*, rs1042522; *MDM2*, rs2279744; *MDM4*, rs1563828; *USP7*, rs1529916; and *LIF*, rs929271) were studied in a total of 282 individuals belonging to Quechua, Aymara, Chivay, Cabanaconde, Yanke, Taquile, Amantani, Anapia, Uros, Guarani Ñandeva, and Guarani Kaiowá populations. These individuals were characterized as Native American showing a high level (> 90%) of Native American ancestry. In addition, published data of 100 individuals from five Native American populations (Surui, Karitiana, Maya, Pima, and Piapoco) were analyzed. The populations were classified high altitude [ $\geq 2,500$  meters (m)] or lowlands (< 2,500 m) populations. Our analyses revealed that alleles *USP7-G*, *LIF-T*, and *MDM2-T* showed significant evidence that they were selected along to the settlement of the harsh environmental variables related to high altitudes. Our results show for the first time that

alleles of classical *TP53* network genes have been evolutionary co-opted for the successful human colonization of the Andes.

Jacovas *et al.*, 2018: The Andean Altiplano has been continuously settled since the late Pleistocene, ~12,000 years ago, a fact that places the Andean natives as one of the most ancient populations living at high altitudes. In the present study, we analyzed genomic data from Native Americans living a long-time at Andean Altiplano high altitude and Amazonia and Mesoamerica lowland areas. We have identified three new candidate genes - *SPI100*, *DUOX2*, and *CLC* - with evidence of positive selection for altitude adaptation in Andeans. These genes are involved in the *TP53* pathway and are related to physiological routes important for high-altitude hypoxia response, such as those linked to increased angiogenesis, skeletal muscle adaptations, and immune functions at the fetus-maternal interface. Our results, combined with other studies, showed that Andeans have adapted to the Altiplano in different ways and using distinct molecular strategies as compared to those of other natives living at high altitudes.

Jacovas *et al.*, To be submitted for publication. The physiological response to hypoxia involves a wide range of biological mechanisms. In this scenario, local residents of highaltitude areas are genetically adapted. *HLA-G* plays a crucial role in several biological processes, including human reproduction and hypoxia response, and thus being a gene potentially involved in human adaptation to high altitudes. The genetic variation of *HLA-G* is well known and it has been shown that regulatory SNPs have a significant impact on protein expression patterns. Studies evaluating worldwide populations suggest that balancing selection is acting in the *HLA-G* mainly in the regulatory regions. Interestingly, the *HLA-G* variation in Native American communities (living at low and high altitude), and more specifically the characterization of the whole 3' untranslated region (UTR) is still unexplored. In addition, the hypothesis that functional SNPs in this region contribute to hypoxia response in such populations is of wide biological relevance. In this study, *HLA-G* 3'UTR was characterized in 301 Amerindian individuals from 17 populations (Amantani, Anapia, Andoas, Aimara, Cabanaconde, Chivay, Cinta Larga, Guarani Kaiowá, Guarani Ñandeva, Language, Quechua, Taquile, Uros, Xavante , Xicrin, Yanke and Zoró), grouped into residents of high altitudes (> 2,500 m) and inhabitants of low lands (<2,500 m). In total, 11 *HLA-G* 3'UTR haplotypes were observed, three of them exclusive to high altitudes (UTR-8, -18 and -30) and three others exclusive to lowlands

(UTR-9, -13 and -21). A population structure was observed in these two population groups and, interestingly, the observed variance within the groups ( $F_{st}$ ) was markedly high (11%) for the UTR-5, indicating a significant difference between the haplotype distributions. Also, subsequent analyzes showed statistical correlations between UTR-5 and UTR-2 with several environmental variables, including ultraviolet radiation and altitude.

Therefore, our data corroborate the idea that there is not only a single adaptive response to stress due to high altitudes. Here, we suggest that adequate regulation of p53 (and associated proteins) as well as HLA-G is related to the high and long-time adaptation in the Andes, ensuring not only the survival of the highlanders, but also their reproductive success in hostile environments. This combination of alleles, however, may result in cancer susceptibility at present days. The mechanisms involved in the regulation of these pathways, which have in common the "trigger" of hypoxia, as well as their functional consequences, deserve to be the subject of future investigations.

**CAPÍTULO 1**  
**INTRODUÇÃO**



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações gerais

Os estudos sobre adaptabilidade humana às grandes altitudes começaram no início dos anos 1900, quando pesquisadores franceses e britânicos lideraram expedições para as terras altas do México e do Peru. A maioria destes pesquisadores acredita que o nativo dessas terras era um ser fisicamente inferior, já que funções fisiológicas "normais" eram consideradas impossíveis em altitudes onde o oxigênio é encontrado em concentrações tão baixas (Cueto, 1989). Essa perspectiva foi abruptamente alterada quando, em 1927, Carlos Monge Medrano - um médico peruano que posteriormente se especializaria em medicina da altitude - organizou uma expedição às terras altas do Peru, onde confirmou a existência de mecanismos fisiológicos que ao longo dos séculos aclimataram essas populações à baixa pressão de oxigênio característica às grandes altitudes. Diz ele numa publicação anos mais tarde: *“Biologically we have shown that the Andean carries in his organism the hereditary and ancestral soma which permits life at the very great altitudes that mark certain large inhabited areas of South America”* (Monge, 1948).

Ao longo de muitas gerações, os povos que vivem nas regiões de altas altitudes [acima de 2.500 m (metros) de acordo com Moore 2001] do globo terrestre (Altiplano Andino, na América do Sul, Planalto do Tibete, na Ásia e Montanhas Semien, na Etiópia) adaptaram-se a esses ambientes extremos e as baixas concentrações de oxigênio. Visto que locais de alta altitude são caracterizados por duras condições climáticas, tais como: baixas concentrações de oxigênio, altos índices de radiação ultravioleta (UV), períodos de frio extremo, grande amplitude térmica e clima árido.

Desse modo, pode-se considerar que, estas populações nativas, estejam idealmente situadas num contexto adequado para os estudos das adaptações genéticas, dada a onipresença do estresse ambiental ao qual estão submetidas.

A ocupação humana permanente no Altiplano Andino ainda é tema de controvérsias. Algumas evidências arqueológicas remetem a um período que pode variar de 12.000 a 7.000 anos atrás (Rademaker *et al.*, 2014; Chala-Aldana *et al.*, 2017). É importante ressaltar que estas populações não apenas alcançaram o Altiplano Andino, mas construíram civilizações e permanecem até hoje em tais ambientes, envolvendo um complexo processo que inclui tanto adaptações genéticas quanto culturais (Lindo *et al.*, 2018).

Diversas características têm sido associadas ao fenótipo de adaptação à altitude nos Andes, dentre elas, observam-se: o aumento da capacidade pulmonar, a relativa tolerância à hipóxia, e moderado aumento nos glóbulos vermelhos (Frisancho *et al.*, 2013). Entretanto, a elucidação completa da natureza dos processos biológicos relacionados à adaptação individual e populacional para a aquisição de tais fenótipos ainda permanece desconhecido.

Os padrões de diversidade genética observados nas populações humanas constituem uma base importante para muitas áreas da pesquisa em genética humana. Mais notavelmente, eles (os padrões) fornecem uma fonte inestimável de dados para inferências sobre nossa história demográfica e evolutiva. Além disso, tais variações genéticas auxiliam também na busca de genes e suas variantes que conferem maior suscetibilidade (ou proteção) às doenças sejam elas crônicas, agudas ou infecciosas.

Tendo em vista o que foi apresentado acima, nesta tese é proposto a investigação de possíveis variantes genéticas envolvidas na adaptação à vida em alta altitude. Para tal finalidade, investigamos diversas populações nativas que vivem desde épocas Pré-Colombianas até os dias atuais nas terras altas dos Andes ou em terras baixas da América do Sul (Mesoamericanos e Amazônicos), como um contraponto. Além disso, foi avaliada a relação entre as variantes genéticas identificadas e as variáveis climáticas que caracterizam os climas aos quais estas populações estão (ou estiveram) submetidas, no intuito de compreender os mecanismos genéticos envolvidos na adaptação à vida em altitude presente nas populações nativas Americanas, ainda insuficientemente compreendidos.

## **1.2 As populações Nativas Americanas**

Através de uma abordagem multidisciplinar integrando dados de arqueologia, genética e linguística, o cenário para a origem humana moderna remonta há cerca de 150.000-200.000 anos antes do presente (Scheinfeldt, *et al.*, 2010), na África. Alguns achados arqueológicos, no entanto, apontem para uma origem africana ainda mais antiga, a cerca de 315.000 anos antes do presente, no Marrocos, sugerindo uma região distinta da África Oriental (Hublin *et al.*, 2017). Lamentavelmente, Hublin e colaboradores não conseguiram extrair DNA dos fósseis de Djebel Irhoud. Uma análise genômica poderia ter elucidado e estabelecido se esses fósseis reescrevem verdadeiramente a história da nossa espécie.

Acredita-se que, entre 50 e 100 mil anos atrás, uma pequena fração da população original (hominínios) deixou a África em direção à Europa, Ásia, Oceania, e finalmente América, através da Beríngia, uma grande massa de terra com cerca de 1 milhão de Km<sup>2</sup> (Santos *et al.*, 2007) que ligava a Sibéria com o Alasca durante o Último Máximo Glacial (LGM, da sigla em inglês).

Desde a migração do *Homo sapiens* para fora da África, os humanos modernos colonizaram uma ampla gama de ambientes, desde regiões árticas à tropicais, das terras altas às terras baixas, e até mesmo ambientes considerados tóxicos, em um período relativamente curto de tempo (Schlebusch *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2016; Henry, 2019). Sendo assim, adaptações culturais, comportamentais e biológicas têm sido necessárias para o sucesso desta trajetória.

As glaciações do Pleistoceno (período que compreende 2.5 milhões a 11.7 mil anos antes do presente) - particularmente o LGM - desempenharam um papel importante na formação dos padrões atuais da diversidade genética humana observados ao redor do mundo. A chegada dos humanos na América é tema de intenso debate na comunidade científica. González-José e colaboradores (2008) propuseram um modelo de povoamento do continente americano integrando resultados de diferentes áreas do conhecimento, tais como, a genética, a morfologia e a linguística. Nesse modelo, dentre outras coisas, o papel da Beríngia é reforçado, já que populações vindas da Ásia permaneceram no local por um período suficiente para o surgimento e fixação de variantes genéticas exclusivas das populações americanas.

As variantes genéticas exclusivas Nativas Americanas podem ser detectadas tanto no genoma nuclear (Schroeder *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007), quanto no mitocondrial (Fagundes *et al.*, 2008) e no cromossomo Y (Pena *et al.*, 1995; Bortolini *et al.*, 2003). Estudos recentes analisando genomas de restos humanos oriundos do Alasca do período Pleistoceno Superior, confirmaram partes importantes dos achados anteriores (Moreno-Mayar *et al.*, 2018), em especial daqueles propostos por González-José *et al.*, (2008). Durante a permanência dos humanos na Beríngia (Fagundes *et al.*, 2008, estimaram um período de cerca de 5.000–8.000 de ocupação), o clima severo e a formação de barreiras glaciais podem ter influenciado o isolamento de populações por longos períodos, e, até mesmo a dificuldades na dispersão populacional pela região. Acredita-se que o aumento populacional, somado à diminuição dos recursos disponíveis devido a “submersão” da

Beríngia, resultou na migração dos primeiros povos para a América - há cerca de 21.000 - 15.000 mil anos antes do presente (González-José *et al.*, 2008; Reich *et al.*, 2012; Bortolini *et al.*, 2014; Skoglund *et al.*, 2015; Posth *et al.*, 2018; Moreno-Mayar *et al.*, 2018; Pinotti *et al.*, 2019).

Após o colapso da Beríngia, no fim do LGM houve fluxo gênico bidirecional, bem menos intenso, mas constante entre os habitantes do extremo oeste do Alasca com aqueles do extremo leste da Sibéria (González-José *et al.*, 2008), o que foi posteriormente corroborado com um estudo independente avaliando STRs (*Short Tandem Repeats*) (Ray *et al.*, 2009). Esses eventos posteriores ao desaparecimento da Beríngia (surgimento do estreito de Bering) impactaram de forma mais importante às populações nativas do círculo polar ártico e da América do Norte (González-José *et al.*, 2008).

Os humanos que colonizaram o continente americano se depararam com uma ampla variedade de ambientes, o qual resultou em adaptações genéticas únicas e também grande diferenciação em termos de suas culturas e sociedades. Basta referir que algumas populações caçadoras coletoras, em períodos Pré-Colombianos, domesticaram plantas e animais, tornando-se agriculturalistas e sedentárias, o qual sustentou a emergência de civilizações que envolviam estados organizados com cidades maiores do que aquelas de onde vieram os colonizadores europeus.

Tendo em vista a enorme amplitude dos ecossistemas observados no continente americano - desde as baixas latitudes do Ártico até elevadas altitudes dos Andes - é esperado que parte da diversidade genética encontrada nas populações nativas seja o resultado de processos não casuísticos, tais como a seleção natural darwiniana (Acuña-Alonzo *et al.*, 2010). Contudo, para se ter um panorama completo da história evolutiva das populações ameríndias, deve-se também levar em consideração fatores microevolutivos casuísticos, como a deriva genética e suas derivações (por exemplo, o efeito do fundador), as quais afetam a flutuação aleatória das frequências dos alelos pela introdução ou eliminação casual dos mesmos, independente de seu valor adaptativo. Tal fenômeno se mostra extremamente importante nas populações ameríndias, especialmente aquelas com hábitos de caça e coleta, devido ao baixo tamanho e isolamento populacional por motivos de natureza geográfica e/ou socioculturais.

Apesar disso, estudos têm mostrado que sinais de pressões seletivas ocorreram dentro do continente Americano (Hünemeier *et al.*, 2012; Amorim *et al.*, 2017). Por

exemplo, Hünemeier e colaboradores (2012) avaliaram a correlação entre os modos de subsistência (caçadores-coletores *versus* agriculturistas) e as frequências do SNP (polimorfismo de nucleotídeo único) Arg230Cys do gene de metabolismo do colesterol *ABCA1* (*Atp-Binding Cassette, Subfamily A – Member 1*) em populações nativas da América do Sul e Mesoamérica, associando as mesmas à registros arqueológicos de pólen de milho domesticado. Os dados sugeriram que a domesticação de milho foi a força motriz no aumento das frequências do alelo nativo exclusivo 230Cys na Mesoamérica, constituindo um exemplo evidente de coevolução gene-cultura envolvendo um alelo americano autóctone (Hünemeier *et al.*, 2012).

Amorim e colaboradores (2017), por sua vez, avaliaram variantes alélicas de genes *FADS* (*Fatty Acid Desaturases*) que já tinham sido descritas por apresentar sinais de seleção positiva em populações Inuit da Groelândia (Fumagalli *et al.*, 2015). Neste novo estudo, foram avaliados 349 indivíduos Nativos Americanos: da América do Norte, Mesoamérica e América do Sul. Interessantemente, sinais de seleção natural nos genes *FADS* em populações do Ártico e das Américas sugerem uma assinatura de seleção natural compartilhada entre as populações, indicando que tal adaptação ocorreu na população ancestral comum antes da entrada no Novo Mundo (possivelmente na Beríngia), e, se espalhou por todos os indivíduos do continente americano. Acredita-se que a seleção tenha ocorrido, possivelmente, devido à adaptação genética ao clima frio da região e a uma dieta rica em proteínas e ácidos graxos (Amorim *et al.*, 2017).

Por fim, exemplos de seleção natural associados à vida em altitude nos indivíduos do altiplano andino já foram reportados. Interessantemente, diferentes conjuntos de genes apresentam sinal de seleção natural tanto nos Andes, quanto nas outras populações de altitude do mundo, indicando que sob pressões seletivas semelhantes, diferentes soluções genéticas emergiram (Bigham *et al.*, 2016; Childebayeva *et al.*, 2019). Neste contexto, nos próximos tópicos são apresentados os principais achados científicos sobre as adaptações genéticas às altas altitudes no Platô do Tibete (Ásia), Montanhas Semien da Etiópia (África) e especialmente no Altiplano Andino (América do Sul).

### **1.3 Adaptação genética à altitude**

#### **1.3.1 O que Andinos, Tibetanos e Etíopes têm em comum**

Regiões de altas altitudes são locais acima de 2.500 metros acima do nível do mar que desafiam a sobrevivência e a reprodução humana. A principal característica dessas regiões é o ar rarefeito, ou seja, baixa quantidade de oxigênio (O<sub>2</sub>) disponível (hipóxia). A nível do mar, a pressão barométrica é de 1 (uma) atmosfera (1 atm), o equivalente a 760 mmHg (milímetro de Mercúrio), e 100% da quantidade de O<sub>2</sub> disponível - que representa 21% dos gases totais da atmosfera. Em contrapartida, a 2.500 m a pressão barométrica é de 570 mmHg e há apenas 75% de O<sub>2</sub> disponível em comparação com o nível do mar (<http://www.altitude.org/home.php>). Surpreendente, aos 3.821 m de altitude está localizado o lago Titicaca, região reconhecidamente povoada pelos povos Uro, Aymara e Quechua há milhares de anos. Nesta altitude, somente 64% de O<sub>2</sub> disponíveis são observados, e a pressão barométrica atinge somente cerca de 486 mmHg.

Outra característica dos ambientes elevados é a baixa temperatura. A temperatura cai, em média, 1°C (grau Celsius) a cada 150 m. Além disso, outro fator importante é a oscilação de temperatura observada nas regiões de altitude: a amplitude térmica média chega a 20°C em 24 horas nos Andes (dados próprios, compilados para esta tese). Pode-se acrescentar este cenário, dentre inúmeras outras variáveis climáticas, a baixa umidade do ar e o aumento da radiação ultravioleta (UV), sendo possível ter em mente um cenário não compatível com a vida. No entanto, isso não é observado, pois diversas espécies de plantas, fungos, bactérias e animais estão, há milênios, adaptados a vida em altitude. Desse modo, tais espécies, incluindo o *Homo sapiens*, tornam-se um foco extraordinário para estudos evolutivos.

Seres humanos habitam há anos pelo menos três regiões geograficamente distintas, mas que compartilham o fato de serem consideradas de altas altitudes: O Altiplano Andino (altitude média de 3.750m), continuamente habitado desde o final do Pleistoceno, aproximadamente 12.000 anos antes do presente (Rademaker *et al.*, 2014; Chala-Aldana *et al.*, 2017), o Platô do Tibete (altitude média de 4.000m) entre a China e a Índia, colonizado no Pleistoceno superior há cerca de 30.000 anos, com migrações posteriores e estabelecimento de aldeias permanentes no planalto há pelo menos 6.500 anos antes do presente (Aldenderfer *et al.*, 2011), e ocupações nas terras altas da Etiópia (altitude média de 2.500 m), Montanhas Semien, que teriam ocorrido de 5.000 até, possivelmente, 70.000 anos antes do presente (Alkorta-Aranburu *et al.*, 2012). Apesar de algumas incertezas na datação de ocupação permanente destas localidades, é certo que os humanos habitam essas

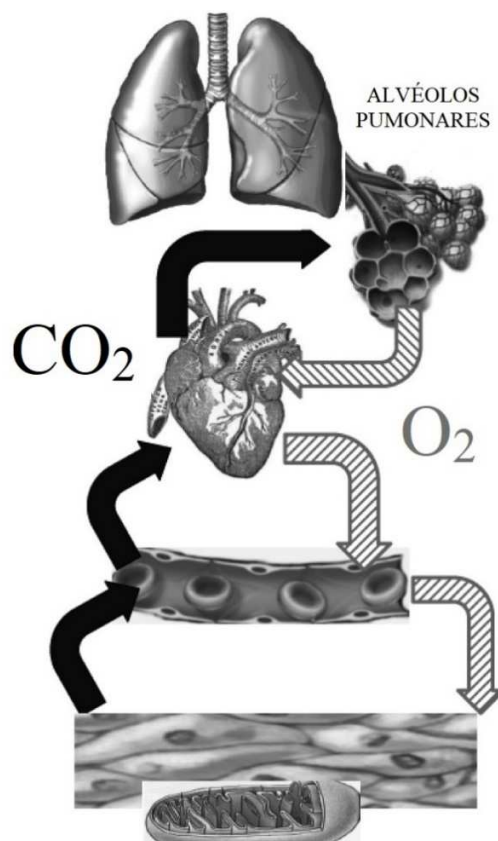
regiões de climas hostis a milhares de anos. Atualmente, estima-se que cerca de 466 milhões de pessoas vivem permanentemente acima dos 2.500 m de altitude, conforme indica o *Center for International Earth Science Information Network* (<http://www.ciesin.org/>).

Todos os organismos, desde as bactérias até os seres humanos, possuem mecanismos para manter a homeostase do O<sub>2</sub>, que são essenciais para a manutenção da vida na forma que conhecemos. A baixa concentração do O<sub>2</sub> (ou hipóxia) pode resultar na incapacidade de gerar adenosina trifosfato (ATP) suficiente para manter as funções celulares essenciais, enquanto a hiperóxia resulta na geração de intermediários reativos de oxigênio e danos potencialmente letais às membranas celulares e ao DNA. Assim, as concentrações celulares de oxigênio devem ser rigidamente reguladas dentro de uma faixa fisiológica estreita. Desta forma, a contribuição de uma multiplicidade de fatores regulatórios é necessária para estabelecer e modular esses sistemas fisiológicos.

Os mecanismos fisiológicos adaptativos desencadeados pela exposição à altitude têm o objetivo de aumentar a disponibilidade de O<sub>2</sub>, aumentando a concentração do mesmo nos tecidos (**Figura 1**). Isto é conseguido através de modificações na: (I) ventilação pulmonar, (II) volume pulmonar e capacidade de difusão pulmonar, (III) transporte de oxigênio no sangue, (IV) difusão de oxigênio do sangue para os tecidos e (V) utilização de O<sub>2</sub> ao nível do tecido (Frisancho, 2013).

(I) O processo de aclimação fisiológica transiente (*short-time*), aquele que ocorre quando indivíduos de terras baixas migram para altitudes elevadas, inicia-se dentro de 72 horas após a subida, com um aumento progressivo da ventilação pulmonar através da estimulação dos quimiorreceptores arteriais, que chega a ser 100% maior em comparação ao nível do mar. (II) Após a exposição inicial à hipóxia devido à altitude, o volume de ar exalado após uma inspiração vigorosa [conhecida como capacidade vital forçada (FVC) do volume pulmonar] dos nativos das terras baixas é reduzida. No entanto, após cerca de um mês de residência em altas altitudes, esses indivíduos atingem valores comparáveis aos que tinham em baixas altitudes. (III) Em seguida, ocorre o aumento do número de hemácias - em resposta às quantidades insuficientes de oxigênio - a medula óssea é estimulada por um fator eritropoiético para aumentar a produção de hemácias. Por essa razão, em altas altitudes, tanto os nativos das terras baixas quanto os das terras altas têm contagens de hemácias e hemoglobina normalmente superiores às encontradas em indivíduos que se

encontram à nível do mar. (IV) Para que o oxigênio seja utilizado, ele deve atingir as mitocôndrias através de um processo de difusão física. Como o oxigênio é consumido à medida que passa por sucessivas camadas de tecido, a concentração de oxigênio diminui rapidamente, e quanto maior a distância que o oxigênio tem de percorrer, mais rápida é a queda de  $O_2$ . Como em altas altitudes a concentração de  $O_2$  já é baixa, o organismo responde encurtando a distância que este deve percorrer, através do surgimento de novos capilares, aumentando a perfusão sanguínea e, assim, facilitando a difusão do  $O_2$  nos tecidos (Frisancho, 2013). (V) O último passo no processo de adaptação à hipóxia envolve variações na taxa de utilização de  $O_2$  e geração de energia no nível celular. Com base em estudos in vivo, foi proposto que em altas altitudes, a glicólise anaeróbica prossegue pela via das pentoses-fosfato, em vez da via de Embden-Meyerhof. A vantagem da via das pentoses parece estar relacionada ao fato de que nenhuma adenosina trifosfato adicional é necessária para gerar gliceraldeído-3-fosfato e assim o organismo economiza energia e produz mais energia química com o mesmo consumo de oxigênio (Frisancho, 2013).



**Figura 1.** Vias do transporte de  $O_2$  desde a absorção pelos alvéolos pulmonares, até sua utilização para geração de energia na mitocôndria. Adaptado e traduzido de Frisancho, 2013.



Todo o complexo processo fisiológico e metabólico que foi descrito acima é relativamente bem conhecido. Tais respostas funcionais plásticas ocorrem quando indivíduos de baixa altitude visitam ou residem por um curto período em terras altas (Moore, 2017). Porém, sabe-se que esses tipos de adaptações biológicas reversíveis e de curto prazo podem ser relativamente diferentes daquelas que envolvem residentes nativos de longa data (*long-time*). Sob a profundidade temporal de um contexto evolutivo, várias características morfológicas, metabólicas e fisiológicas duradouras são necessárias para uma vida de sucesso em altas altitudes.

Desta forma, espera-se que a seleção natural deixe “pegadas” no genoma dos indivíduos que habitam essas regiões caracterizadas pelas condições climáticas extremas. Esses grupos humanos superaram a baixa concentração de O<sub>2</sub> no ambiente de altas altitudes e, um estudo mais aprofundado dos mecanismos que governam as mudanças adaptativas responsáveis pela adaptação à grandes altitudes contribuirá para o entendimento das bases moleculares da mudança evolutiva e auxiliará na anotação funcional do genoma humano.

Recentemente, vários estudos têm revelado as bases genéticas dessas mudanças nas populações que vivem em altitude, acima descritas. O mecanismo exato pelo qual se deu tal adaptação ainda não se encontra completamente elucidado, no entanto, diversos estudos tentam entender o papel de várias variantes genéticas associadas à adaptação à altitude (Yi *et al.*, 2010; Scheinfeldt *et al.*, 2012; Huerta-Sánchez *et al.*, 2014; Simonson *et al.*, 2015; Valverde *et al.*, 2015; Fehren-Schmitz and Georges, 2016; Crawford *et al.*, 2017; Moore, 2017).

Uma via genética que recorrentemente tem sido implicada na adaptação humana à alta altitude é a via do fator de indução por hipóxia (HIF), que é o principal regulador da resposta transcricional à hipóxia em metazoários desde o início do desenvolvimento embrionário e ao longo da vida adulta (Semenza, 1999). Na **tabela 1**, observamos os principais membros da via de HIF.

**Tabela 1.** Membros da via do fator de indução por hipóxia (HIF)

$\alpha$	$\beta$
HIF-1 $\alpha$	HIF-1 $\beta$ (ARNT)

HIF-2 $\alpha$	ARNT2
HIF-3 $\alpha$	ARNT3

---

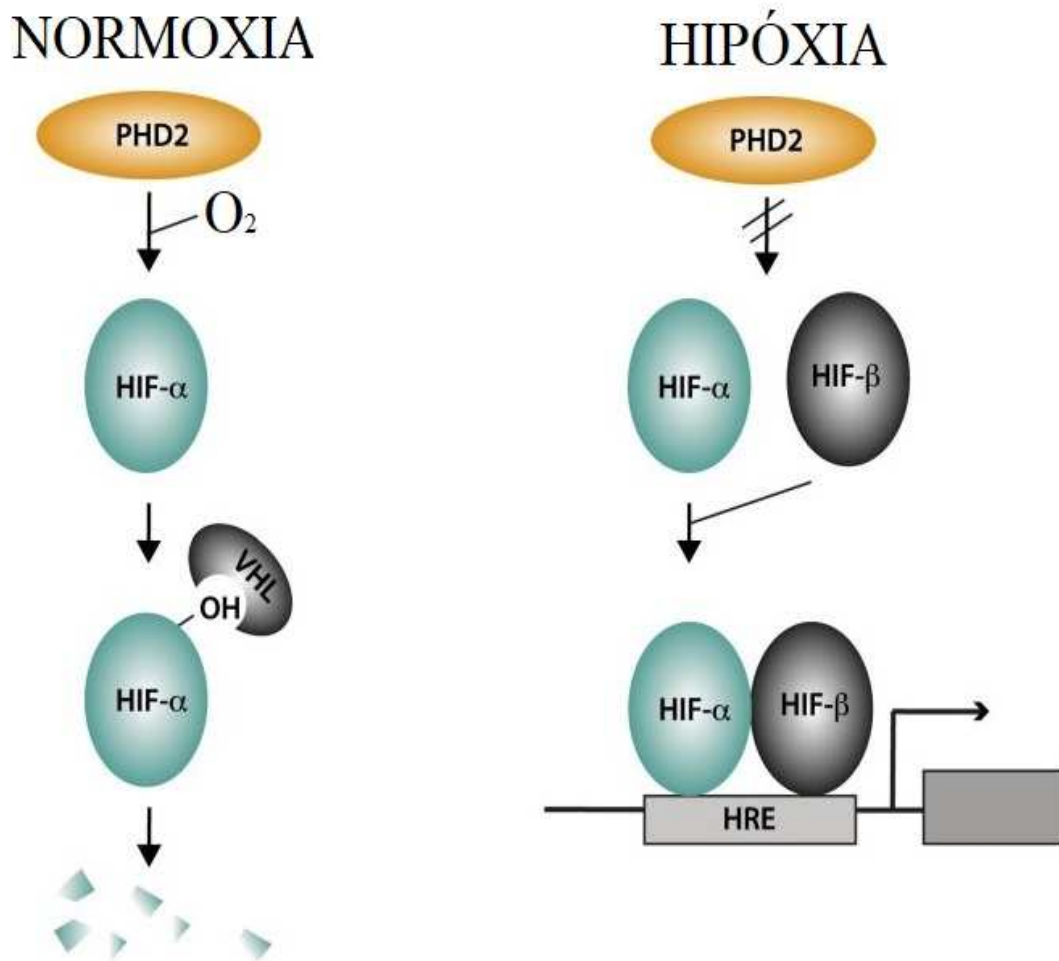
Disponível em Semenza, 1999.

HIF-1 foi purificado e caracterizado através de um ensaio de cromatografia por Wang e Semenza em 1995. HIF-1 é um heterodímero que consiste em uma subunidade  $\beta$  (HIF-1 $\beta$ , também conhecida como ARNT, (*Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*) e três subunidades  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  e HIF-3 $\alpha$ ). Através de análises de sequências nucleotídicas de clones cDNA, descreveu-se que HIF-1 contém um domínio N-terminal HLH (*Helix-Loop-Helix*) seguido pelo domínio PAS (*Per Arnt Sim*). O domínio HLH medeia a dimerização e ligação com o DNA num grande número de fatores de transcrição, enquanto que o domínio PAS desempenha um importante papel na formação de heterodímeros. As subunidades  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  e HIF-3 $\alpha$ ) contém, na porção C-terminal, domínios de ativação transcricional e degradação dependentes de O<sub>2</sub> (Semenza e Wang, 1995). Em resposta à concentração de O<sub>2</sub> disponível, o principal meio pelo qual a atividade de HIF é controlada é através da hidroxilação sítio-específico da subunidade  $\alpha$  (Semenza, 1999).

Sob condições de normóxia, uma família de três enzimas, PHD1 (*Hypoxia-InducibleFactor Prolyl Hydroxylase-1*), também conhecida como EGLN2, PHD2, também conhecida como EGLN1, e PHD3, também conhecida como EGLN3 - hidroxilam a subunidade  $\alpha$  em seu domínio de degradação dependente de O<sub>2</sub>. Essa hidroxilação permite a associação da proteína von Hippel-Lindau (VHL) que faz parte de um complexo E3 ubiquitina ligase que, em seguida, encaminha HIF- $\alpha$  para a degradação via ubiquitina-proteossomo. Em um cenário de hipóxia, essa modificação dependente de O<sub>2</sub> é interrompida, levando à dimerização de HIF- $\alpha$  com HIF- $\beta$ , e então este complexo se liga aos elementos responsivos a hipóxias (HREs) que vão atuar como controladores dos genes alvos (**Figura 2**) (Bigham e Lee, 2014).

Fatores relacionados com HIF-1 $\alpha$ , que dimerizam com HIF- $\beta$ , já foram descritos: HIF-2 $\alpha$ , também chamado de EPAS1 (*endothelial PAS domain protein 1*). HIF-2 $\alpha$  é semelhante ao HIF-1 $\alpha$  no que diz respeito não só a estrutura, mas também nos principais domínios funcionais e na regulação da atividade de hipóxia. Como resultado, observa-se a ativação da transcrição de mais de cem (100) genes possuindo elementos responsivos à

hipóxia em sua região promotora. Dos quais podemos citar: genes envolvidos na angiogênese (*VEGF*, *PDGF*, *FLT*), eritropoiese (*EPO*), morte celular (*TGFA*, *TNF*, *MMP*), inflamação (*IL6*), vasorreatividade (*EDN*, *NOS*, *PRKAA1*), metabolismo de glicose (*SLC2A1*, *IGFBP*, *PRKAA1*), bem como outros processos que afetam as várias etapas do sistema de transporte de  $O_2$  (Greer *et al.*, 2012; Moore, 2017).



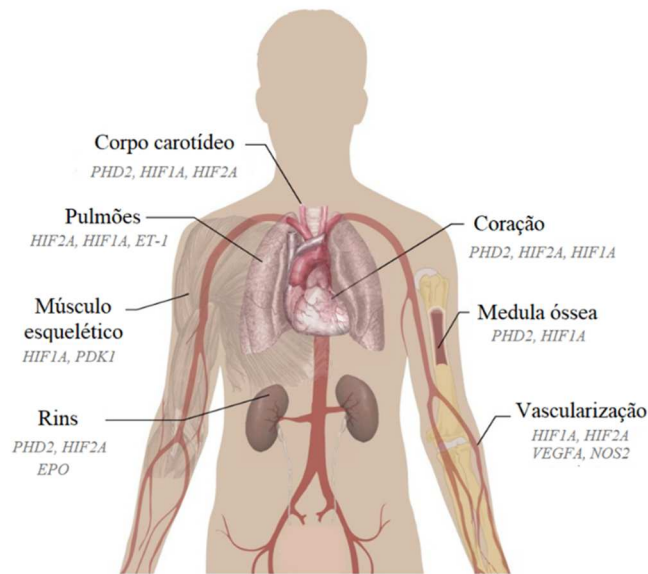
**Figura 2:** Via de HIF. À esquerda, em condições normais de  $O_2$ , PHD2 (*Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase 2*; conhecido como EGLN1) hidroxila constitutivamente HIF- $\alpha$ , visando sua degradação de maneira dependente de VHL (*von Hippel-Lindau*). À direita, em hipóxia, a hidroxilação é interrompida, ocasionando a estabilização de HIF- $\alpha$ , dimerização com HIF- $\beta$  e ligação a elementos de resposta à hipóxia (HREs) que controlam genes alvo. Adaptado e traduzido de Bigham e Lee, 2014.

HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  são ativados conjuntamente, mas desempenham distintas respostas celulares. HIF-1 $\alpha$  regula positivamente os genes que codificam as enzimas glicolíticas e, inibe a fosforilação oxidativa e a biogênese mitocondrial (Semenza, 1999). HIF-2 $\alpha$  por sua vez, desempenha um papel importante na regulação do gene *EPO* (*Erythropoietin*) em células intersticiais especializadas no rim adulto (Lee e Percy 2011). A eritropoietina é o regulador crítico envolvido na produção de glóbulos vermelhos (Scortegagna *et al.*, 2005).

Como é esperado dos fatores que orquestram a resposta à hipóxia, HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  geralmente atuam na mesma direção. Ambos têm a capacidade de ativar o gene *VEGFA* (*Vascular Endothelial Growth Factor A*), o qual codifica uma proteína-chave que induz a angiogênese e já foi implicado na patogênese da hipertensão pulmonar. Similarmente, tanto HIF-1 $\alpha$  quanto HIF-2 $\alpha$  foram implicados na patogênese da hipertensão pulmonar (Keith *et al.*, 2011; Shimoda e Laurie, 2014). No entanto, também está claro que HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  podem ter atividades antagônicas. Por exemplo, dependendo do contexto celular ao qual estão expostos, HIF-1 $\alpha$  pode promover a parada do ciclo celular, enquanto HIF-2 $\alpha$  mantém a progressão ao longo do ciclo celular (Keith *et al.*, 2012).

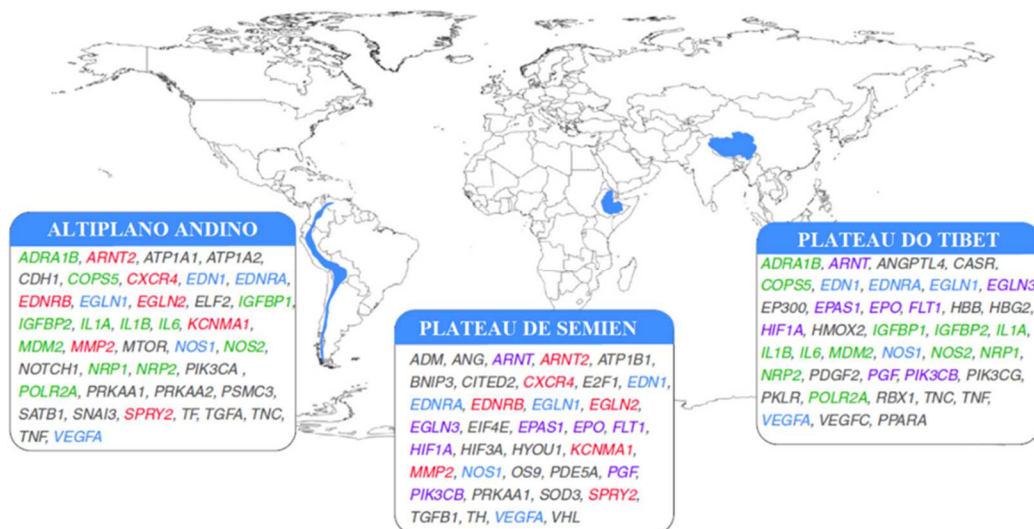
Inúmeros exemplos de evolução convergente na via da HIF têm sido documentados em populações humanas de altas altitudes (Scheinfeldt e Tishkoff, 2010; Simonson *et al.*, 2012). Nas populações do altiplano andino, *PRKAA1*, *EPAS1*, *VEGF*, *NOS2*, *TGFA*, *CXCR4* e *EGLN1* já foram descritos com sinal de seleção natural (Bigham *et al.*, 2009; Bigham *et al.*, 2010; Foll *et al.*, 2014; Eichstaedt *et al.*, 2017), enquanto nos tibetanos, *EPAS1* e *EGLN1* foram extensivamente identificados (Beall *et al.*, 2010; Yi *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2011; Lorenzo *et al.*, 2014; Simonson *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2017; Lanikova *et al.*, 2017; Tashi *et al.*, 2017; Jeong *et al.*, 2018). Estudos focados em populações das Montanhas de Semien, na Etiópia, sugerem o envolvimento de uma combinação de genes *HIF* diferente dos encontrados em Andinos e Tibetanos: *THRB*, *ARNT2*, *BHLHE41* (gene induzido por HIF-1 $\alpha$ ) e *RORA*, que codifica uma proteína que induz a ativação transcricional de HIF-1 $\alpha$  (Alkorta-Aranburu *et al.*, 2012; Scheinfeldt *et al.*, 2012; Huerta-Sánchez *et al.*, 2014).

Na **Figura 3** podemos observar os órgãos envolvidos na adaptação à altas altitudes, juntamente com genes selecionados da via de HIF e genes-alvo de HIF.



**Figura 3.** Órgãos envolvidos na adaptação à altas altitudes, juntamente com genes selecionados da via de HIF e genes-alvo de HIF que podem desempenhar um papel relevante na adaptação à altitude. Adaptado e traduzido de Bigham e Lee, 2014.

Na ilustração abaixo (**Figura 4**), extraída do trabalho de Abigail W. Bigham (2016), pode-se observar destacadas em azul as três regiões globais de alta altitude. Os genes candidatos da via de HIF para cada população são listados em cada uma das populações.



**Figura 4.** Genes da via de HIF com papel na adaptação humana às grandes altitudes. Os genes listados em preto são únicos para cada população em particular, os azuis são compartilhados entre as três populações, os

verdes são compartilhados entre Tibetanos e Andinos, os vermelhos são compartilhados entre Andinos e Etíopes e os roxos são compartilhados entre Tibetanos e Etíopes. Adaptado e traduzido de Bigham, 2016.

Como se pode observar, apesar de diversos genes compartilharem sinais de seleção natural, cada população de altitude possui características únicas no que se refere às adaptações genéticas, o que é esperado na evolução convergente. Sendo assim, as populações Etíopes, Andinas e Tibetanas que vivem em altitudes elevadas se adaptaram à hipóxia de maneira um tanto quanto diferente, afetando diferentes genes de uma mesma via (ou de rotas relacionadas), ou ainda os mesmos genes, mas com variantes exclusivas e/ou conjunto de alelos comuns, porém com marcantes diferenças em suas distribuições. Nos tópicos seguintes, são detalhados os mecanismos genéticos específicos de cada uma das populações de altas altitudes.

### 1.3.2 Adaptação genética à altitude: Os Tibetanos

Os indivíduos que vivem no platô do Tibete são - sem sombra de dúvida - os mais extensivamente estudados no que diz respeito às adaptações genéticas para vida em altas altitudes. Diversos estudos demonstraram variantes adaptativas nas regiões dos genes *EGLN1* e *EPAS1* (ou *HIF-2 $\alpha$* ), este último associado a níveis mais baixos de hemoglobina (Beall *et al.*, 2010; Simonson *et al.*, 2010; Yi *et al.*, 2010).

Através de experimentos *in vitro*, Song e colaboradores (2014) descreveram que duas substituições não sinônimas na região codificadora de *EGLN1* [éxon 1: rs12097901 (C127S) e rs186996510 (D4E)] resultam numa menor interação com proteína p23, afetando negativamente a regulação do *EGLN1* na via do HIF. É proposto que estas variantes tibetanas ocorrendo juntas em forma de haplótipo (D4E/C127S) gerem um alelo de perda de função (hipomórfico), levando a uma potencialização na sinalização de HIF, assim facilitando a adaptação à altas altitudes (Song *et al.*, 2014).

Um segundo gene candidato da via do HIF com evidências de seleção positiva nos Tibetanos em diferentes estudos é o *EPAS1* (Beall *et al.*, 2010; Simonson *et al.*, 2012; Yi *et al.*, 2010; 2014; Peng *et al.*, 2017; Yanget *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2017; Jeong *et al.*, 2018). Este gene codifica o fator de transcrição *HIF-2 $\alpha$* , que estimula a produção de glóbulos vermelhos (**veja tópico 1.3.1**). Além disso, variantes de *EPAS1* encontradas em Tibetanos foram associadas a baixas concentrações de hemoglobina, sugerindo um papel importante na proteção à policitemia (Beall *et al.*, 2010; Yi *et al.*, 2010).

Adicionalmente, estudos recentes em camundongos heterozigotos *knockout* para o gene *EPASI*<sup>+/-</sup> exibem respostas fisiológicas enfraquecidas à hipóxia crônica, com redução de aproximadamente 50% no nível de transcritos íntegros. Além disso, essas variantes de *EPASI* não estão associadas apenas ao nível relativamente baixo de hemoglobina como um protetor de policitemia (superprodução de eritrócitos), mas também está associada a uma vasoconstrição pulmonar diminuída nesses indivíduos, possibilitando a manutenção de uma capacidade de ventilação pulmonar adequada. Tomados em conjunto esses dados mostram que a regulação negativa de *EPASI* contribui para a base molecular da adaptação pelo menos dos Tibetanos à hipóxia em altas altitudes (Peng *et al.*, 2017).

Huerta-Sánchez e colaboradores (2014), sequenciaram o gene *EPASI* e regiões no entorno do mesmo, em 40 indivíduos nativos do Tibete e 40 indivíduos chineses da etnia Han, que habitam terras baixas. Através de análises comparativas, observaram que o gene possui uma estrutura haplotípica incomum nos Tibetanos. Expandindo as análises para um conjunto maior de populações ao redor do mundo, os autores descreveram que o haplótipo selecionado é encontrado apenas no hominínio de Denisova e em Tibetanos e, em uma frequência muito baixa entre os chineses Han. A extensão do haplótipo, e o fato de não ser encontrado em outras populações mundiais, torna improvável que o compartilhamento de haplótipos entre Tibetanos e o povo de Denisova tenha sido causado por uma simples ancestralidade comum, sugerindo assim uma introgressão adaptativa de uma porção do gene *EPASI*, a partir de “denisovanianos” para populações de *Homo sapiens* que habitavam a mesma região. Essa descoberta reforça que a hibridização do *Homo sapiens* com hominínios arcaicos teria sido elemento chave como fonte de variabilidade genotípica que, em certas ocasiões, pode ter auxiliado os humanos modernos a se adaptarem a novos ambientes (Huerta-Sánchez *et al.*, 2014).

Outro gene interessantemente encontrado com sinal de seleção natural nas populações Tibetanas é o *MTHFR* (*Methylene Tetra Hydro folate Reductase*) cuja proteína codificada - o metilenotetrahidrofolato redutase - consiste em uma enzima que desempenha um papel central no metabolismo do folato. O SNP rs1801133 foi encontrado com sinal de seleção positiva nos tibetanos e, o alelo rs1801133A em maior frequência nas populações tibetanas está diretamente relacionado com o aumento de folato, sugerindo adaptação à alta radiação ultravioleta, visto que a degradação do folato pode ser acelerada pela exposição aos raios UV (Borradale e Kimlin, 2012; Yang *et al.*, 2017).

Além dos genes *EGLN1* e *EPAS1* - alvos de seleção diretamente envolvidos na via de detecção de hipóxia, extensivamente identificados com sinal de seleção natural nos tibetanos - outros genes foram descritos. O gene *PPARA* (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor A*), um regulador principal da oxidação de ácidos graxos, foi identificado como um candidato de seleção associado com baixos níveis de hemoglobina nos tibetanos (Simonson *et al.*, 2010). Assim, é possível que alterações em genes que regulam o metabolismo, como o *PPARA*, possam compensar as mudanças inerentes às alterações na via do HIF.

Adicionalmente, o gene *HMOX2* (*Heme Oxygenase 2*) envolvido no catabolismo da heme, foi descrito abrigoando variantes potencialmente adaptativas em tibetanos. É descrito que nessas populações o alelo derivado (C) de rs4786504 (T>C) confere menores níveis de hemoglobina quando comparados aos portadores do alelo T. Adicionalmente, o alelo derivado (C) é associado a maior expressão de *HMOX2 in vitro*, presumivelmente favorecendo a quebra do heme e auxiliando na manutenção dos baixos níveis de hemoglobina em altas altitudes. Desta forma, os dados sugerem que *HMOX2* contribui para a adaptação a alta altitude em tibetanos, atuando como um modificador na regulação do metabolismo da hemoglobina (Yang *et al.*, 2016).

Wang e colaboradores (2011) também descreveram outros genes com sinais de seleção natural em tibetanos, incluindo *ANGPT1* (*Angiopoietin-1*), *ECEL1* (*Endothelin Converting Enzyme 1*), e *LEPR* (*Leptin Receptor*), que são associados a diversas funções biológicas, tais como: o desenvolvimento de vasos sanguíneos, placenta, embriões e gônadas femininas. As funções alteradas desses genes certamente afetariam as gestações e sobrevivência infantil, resultando em fenótipos mal adaptativos nos tibetanos (Wang *et al.*, 2011).

Além dos genes previamente descritos, ainda observa-se sinais de seleção natural nos genes: *PTGIS* (*Prostaglandin I2 Synthase*), *VDR* (*Vitamin D3 Receptor*), *KCTD12* (*K+ Channel Tetramerization Domain Containing 12*), *FOXO1* (*Forkhead Box O1*), *RUNX1* (*Runt Related Transcription Factor 1*), *RYR1* (*Ryanodine Receptor 1*) e *TED* (*Tibetan Enriched Deletion*) associados às mais diversas vias biológicas (Wang *et al.*, 2011; Lou *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2017).

Em um recente estudo avaliando mulheres nativas das altas altitudes do Himalaia e Nepal, Jeong e colaboradores (2018) associaram dados genotípicos com dados fenotípicos



que buscavam caracterizar a história reprodutiva dessas mulheres, como o número de filhos nascidos vivos, natimortos, perdas gestacionais, número de nascimento de gêmeos, entre outras. Foi descrito forte sinal de seleção natural nos genes *EPAS1* e *EGLN1*, além de seleção positiva e associação entre os alelos dos genes *CCDC141* (*Coiled-Coil Domain Containing141*), *PAPOLA* (*Alpha*), *VRK1* (*Vaccinia Related Kinase 1*), *C6ORF195* (*Chromosome Poly(A) Polymerase Alpha*), *VRK1* (*Vaccinia Related Kinase 1*), *C6ORF195* (*Chromosome 6 Open Reading Frame 195*), *CTBP2* (*C-Terminal Binding Protein 1*), *TEX36* (*Testis Expressed 36*) e *EDRF1* (*Erythroid Differentiation Regulatory Factor 1*) com fenótipos de sucesso, como aqueles associados à menor mortalidade de filhos, mais gestações e nascidos vivos. Isso demonstra que a seleção natural alterou sistematicamente a frequência dos alelos associados aos resultados reprodutivos em direção ao aumento de *fitness* (Jeong *et al.*, 2018).

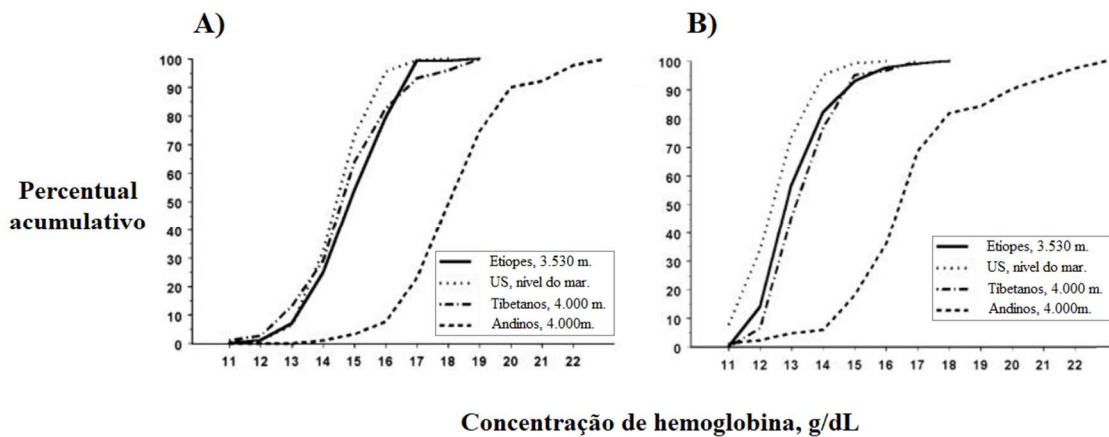
Podemos observar que os mecanismos de adaptação à vida no Tibete sugerem que as adaptações fisiológicas observadas são controladas através da interação entre múltiplos genes, especialmente, aqueles que constituem a via de HIF.

### **1.3.3 Adaptação genética à altitude: Os Etíopes**

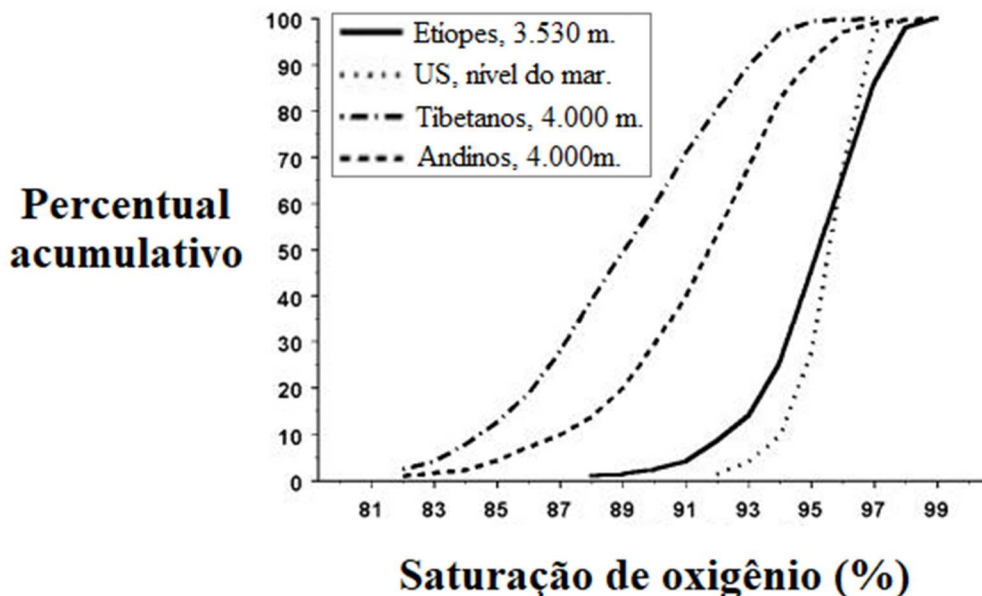
Desafortunadamente, as populações de altitude da Etiópia (Montanhas Semien) ainda são as menos estudadas no que tange a temática de adaptação genética à alta altitude, não obstante o sucesso extraordinário que atletas nativos dessa região tem em competições que envolvem corridas de longa distância, de resistência. No entanto, os poucos estudos disponíveis avaliando essas populações, não mostram um cenário muito diferente das vias encontradas com sinal de seleção positiva em tibetanos e andinos, mas evidentemente, apresentam suas particularidades. Por exemplo, a concentração de hemoglobina elevada em comparação aos valores normais encontrados ao nível do mar foi, durante muito tempo considerada uma característica de adaptação à hipóxia em altas altitudes (Winslow e Monge, 1987). No entanto, estudos em andinos, tibetanos e etíopes demonstram que esta não é uma resposta imprescindível à hipóxia ambiental.

As principais singularidades das populações etíopes encontram-se nos níveis de hemoglobina e saturação de O<sub>2</sub> (SaO<sub>2</sub>) dessas populações, que são praticamente iguais às encontradas nas populações que vivem no nível do mar (**Figuras 5 e 6**). Os nativos da Etiópia mantêm as concentrações de hemoglobina venosa e a SaO<sub>2</sub> arterial dentro dos limites das populações do nível do mar, apesar da inevitável diminuição na concentração

de O<sub>2</sub> do ambiente de altas altitudes (Beall *et al.*, 2002). Os resultados deste estudo sugerem que os nativos etíopes de altas altitudes respondem à hipóxia diferentemente dos andinos ou tibetanos. Mas assemelham-se a amostras do planalto tibetano, exibindo pouca ou nenhuma elevação da concentração de hemoglobina nesta faixa de altitude, porém diferenciam-se dos tibetanos apresentando maior saturação de oxigênio (Beall *et al.*, 2002).



**Figura 5.** Os gráficos acima mostram a distribuição da concentração de hemoglobina na população etíope, norte americanos que vivem à nível do mar, tibetanos e andinos, respectivamente. Em A) homens e B) mulheres. No eixo x observamos a concentração de hemoglobina em g/dl, enquanto que no eixo y encontramos a frequência do percentual cumulativo. Adaptado e traduzido de Beall *et al.*, (2002).



**Figura 6.** As distribuições de saturação de oxigênio (SaO<sub>2</sub>) dos norte-americanos que vivem à nível do mar coincidem com a dos etíopes de altas altitudes e contrastam com os índices reduzidos observadas nos tibetanos e andinos. Adaptado e traduzido de Beall *et al.*, (2002).

Na tentativa de compreender melhor esse fenômeno, e elucidar quais os mecanismos biológicos e genéticos que permitem a adaptação bem-sucedida dos etíopes às grandes altitudes, Scheinfeldt e colaboradores (2012) realizaram um estudo de associação com dados genéticos de varredura genômica (GWAS) em populações etíopes de altas altitudes, Amhara (3.202m) e terras baixas da Etiópia (Aari1, 1.407m e Hamer, 1.097m) (Scheinfeldt et al., 2012). As análises sugeriram vias significativamente enriquecidas e com sinal de seleção positiva nos Amhara: *CBARA1* (*Calcium-Binding Atopy-Related Autoantigen 1*), o qual está envolvido na regulação da captação de cálcio pelas mitocôndrias, *VAV3* (*Vav Guanine Nucleotide Exchange Factor 3*) que já foi descrito envolvido na angiogênese *in vivo* - processo que é iniciado pelo HIF-1 - em situações de hipóxia na idade adulta. *ARHGAP15* (*Rho GTPase Activating Protein 15*), o qual pode estar envolvido na sobrevivência após lesão pulmonar aguda e o *RNF216* (*Ring Finger Protein 216*) que codifica uma enzima que inibe as vias de ativação do NF-kappa B envolvidas na indução de HIF- $\alpha$  (Scheinfeldt *et al.*, 2012).

Adicionalmente, *ARNT2* também conhecido como HIF-1 $\beta$ , e, *THRβ* (*Thyroid Hormone Receptor Beta*) foram encontrados com padrões de variação polimórficas consistentes com sinal de seleção positiva. Estes genes possuem variantes genéticas associadas com os níveis de hemoglobina e participam da cascata de sinalização da via do HIF-1 iniciada sob hipóxia. A proteína THR $\beta$  é expressa em células hepáticas formando um heterodímero com receptor retinóide X (RXR) necessário para a expressão do HIF. Durante o desenvolvimento fetal, o fígado é a principal fonte de eritropoietina - HIF regula a produção de eritropoietina - que é necessária para a produção de glóbulos vermelhos. O HIF-1 $\alpha$  e o ARNT2 formam um heterodímero presente na maioria das células e desempenha um papel geral na resposta à hipóxia (**veja Figura 2**) (Scheinfeldt *et al.*, 2012).

Em relação aos níveis de hemoglobina, contrariando o que foi observado por Beall e colaboradores em 2002, foram descritas diferenças significativas entre níveis de hemoglobina de homens Amhara (16,4 g/dl) *versus* Aari1 (14,8g/dl) e Hamer (12,4g/dl) (Scheinfeldt *et al.*, 2012). Tais diferenças podem ser compreendidas levando-se em conta diversos fatores que podem influenciar os resultados, como as diferentes metodologias, as

quais afetam a sensibilidade da quantificação de hemoglobina entre os dois estudos, o tamanho amostral reduzido no estudo de Scheinfeldt e colaboradores (2012), entre outras possíveis variáveis.

Alkorta-Aranburu e colaboradores (2012), por sua vez, avaliando duas populações das terras altas da Etiópia (Amhara e Oromo) descreveram o sinal de seleção positiva no gene *RORA* (*RAR Related Orphan Receptor A*). Tal achado, revelou um excelente gene candidato para fenótipos de resposta à hipóxia uma vez que pertence à via do HIF-1. Além deste, outros genes candidatos à hipóxia, como *COL6A1* (*Collagen Type 6 Alpha-1*), *SLC30A9* (*Solute Carrier Family 30 Member 9*) e *HGF* (*Hepatocyte Growth Factor*) foram também destacados (Alkorta-Aranburu *et al.*, 2012).

Avaliando dados de estudos de associação com dados de GWAS em populações etíopes que vivem em altitude, foram descritos sinais de seleção natural no gene *BHLHE41* (*Basic Helix-Loop-Helix Family Member e41*) (Huerta-Sanchez *et al.*, 2014). Este gene é transcricionalmente regulado pelo HIF-1 $\alpha$ , o qual posteriormente se liga a HIF-1 $\alpha$  a fim de reprimir outros alvos transcricionais induzidos pela hipóxia, incluindo o *VEGF*, provavelmente devido à maior degradação das proteínas HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  induzido por *BHLHE41* (Miyazaki *et al.*, 2002).

Em outro estudo, com base na divergência da frequência alélica observada em alguns polimorfismos no gene *HLA-DRA* (*Human Leukocyte Antigen-DR Alpha*) em indivíduos Amhara, foi sugerido um papel de genes de defesa imunológica na adaptação a altas altitudes (Fort *et al.*, 1998). Interessantemente, doenças como a malária e esquistossomose são prevalentes nas comunidades de terras baixas, mas inexistentes nas terras altas. De fato, estudos epidemiológicos na Etiópia mostram a correspondência entre altitude e incidência de malária (Woyessa *et al.*, 2013).

#### **1.3.4 Adaptação genética à altitude: Os Andinos**

Considerando as populações do Altiplano Andino, várias características têm sido associadas ao fenótipo de adaptação à altitude, dentre elas pode-se citar: o aumento da capacidade pulmonar, tolerância à hipóxia, elevadas concentrações nos níveis de hemoglobina, saturação de oxigênio e ácido nítrico, bem como baixo peso ao nascer (Bigham e Lee, 2014).

Tradicionalmente, o estudo dos fenótipos adaptativos de altas altitude, se concentra principalmente em fatores pulmonares e hematológicos, tais como: índices de hemoglobina, SaO<sub>2</sub> e capacidade pulmonar. No entanto, em novas abordagens o papel dos fatores vasculares vem se destacando como parte importante dos processos adaptativos à altas altitudes. Neste contexto, o óxido nítrico (NO) é um poderoso vasodilatador expresso em vários tipos de células, incluindo as células endoteliais vasculares, e desempenha um papel central na regulação do fluxo sanguíneo e da resistência vascular (Beall *et al.*, 2012). O aumento da quantidade de NO na parte interna dos vasos sanguíneos leva ao aumento do fluxo sanguíneo. Desta forma, o gás (NO) se espalha pelo sangue e forma nitritos e nitratos fazendo com que as artérias e capilares se expandem e transportem o sangue rico em O<sub>2</sub> para o restante do corpo mais rapidamente que o normal (Beall *et al.*, 2012). Recentemente, um polimorfismo (rs1799983, G > T na posição 894) no gene *NOS3* (*Nitric Oxid Synthase 3*), que codifica a sintase endotelial do óxido nítrico (eNOS), foi descrito com sinal de seleção natural em 109 indivíduos peruanos de terras altas, que teriam vivido a aproximadamente 8.500-5.500 anos antes do presente (Fehren-Schmitz e Georges, 2016).

Outras alterações vasculares observadas nas mulheres andinas incluem aquelas associadas com a gestação e o crescimento fetal. Sugere-se que a hipóxia severa encontrada nos ambientes de altitude retarda o crescimento fetal por reduzir o fluxo sanguíneo da artéria uterina (Moore *et al.*, 2001). A restrição do crescimento intrauterino (RCIU) – principalmente baixo peso ao nascer - é um importante marcador de morbidade e mortalidade em recém-nascidos. No entanto, observa-se que bebês nascidos de mulheres andinas são menos afetados pela hipóxia, embora o peso em média desses bebês ainda seja significativamente menor do que os bebês de indivíduos de terras baixas. É fato conhecido que bebês que nascem em altitude tem menor peso ao nascer (cerca de 102 gramas para cada 1.000 m de elevação) (Moore *et al.*, 2001). A altitude elevada reduz o peso corporal e comprimento ao nascimento. No entanto, este fenômeno não é observado nos andinos, sugerindo uma influência genética para este fenótipo (Soria *et al.*, 2013).

Um gene em particular, relacionado à hipóxia, a subunidade catalítica  $\alpha$ -1 da proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina (*PRKAA1: Protein Kinase AMP-Activated Catalytic Subunit Alpha 1*, também conhecida como AMPK $\alpha$ 1), pode desempenhar um papel importante na adaptação genética para altas altitudes, afetando as

respostas fisiológicas à gravidez que são fundamentais para o crescimento fetal, como o diâmetro da artéria uterina (Bigham *et al.*, 2014).

Avaliando o panorama geral de estudos com abordagem GWAS e adaptação às grandes altitudes, os andinos foram comparativamente menos investigados, em relação aos tibetanos. Apesar disso, muitos genes candidatos foram claramente identificados, sendo os mais importantes aqueles envolvidos na via de HIF, essa última como já visto na presente tese, desempenha um papel importante na resposta à hipóxia (Bigham *et al.*, 2009). O gene *EGLN1* foi reportado, como um gene comum aos andinos e tibetanos, estando sob evolução convergente, mas com ambas as populações exibindo um distinto haplótipo dominante em torno deste gene (Bigham *et al.*, 2009).

O grupo de pesquisa liderado por Laurent Excoffier também relatou um processo de evolução convergente na adaptação à altitude em populações andinas e tibetanas (Foll *et al.*, 2014). Os autores usaram um método hierárquico Bayesiano capaz de detectar seleção positiva mesmo em complexos cenários demográficos. Eles sugerem que pressões seletivas similares nos Andes e no Himalaia provavelmente ativaram respostas adaptativas a pressão da seleção natural nas mesmas rotas genéticas, especificamente em duas vias que atuam na contenção da toxicidade promovida pela hipóxia. Um dos genes com maior destaque é o *EPAS1* (também conhecido como HIF-2 $\alpha$ ), localizado no cromossomo humano 2, na região 2p21, sendo constituído por aproximadamente 93Kb (kilobases), compreendendo um total de 16 éxons (<http://atlasgeneticsoncology.org/>). *EPAS1* também foi reportado por Excoffier e colaboradores como sendo uma região gênica sugestiva de adaptação convergente em andinos e tibetanos. Devido à natureza poligênica da resposta adaptativa às altas altitudes, é muito provável que vários *loci* genéticos estejam envolvidos em uma ou mais redes gênicas, podendo ou não estar interconectadas. Portanto, cada *locus* geralmente possui uma pequena, mas significativa contribuição para o fenótipo complexo envolvido na adaptação a ambientes extremos. Além disso, o estudo reforça a idéia de que tais fenótipos surgiram de maneira concomitante e independente em diferentes continentes, como aqueles encontrados na América (Andes) e na Ásia (Himalaia) (Foll *et al.*, 2014).

Interessantemente, nos andinos, o produto do gene *FAM213A* (*Family With Sequence Similarity 213, Member A*), encontrado com sinal de seleção positiva, pode atuar como um potente antioxidante a fim de diminuir o estresse oxidativo e auxiliar na

manutenção da massa óssea. Outro gene detectado com sinal de seleção nos andinos é o *SFTPD* (*Surfactant Protein D*), que codifica uma proteína associada ao surfactante pulmonar envolvida na respiração normal e na defesa imunológica inata do hospedeiro. Esses dados identificam dois novos genes candidatos e vias associadas que podem estar envolvidos na adaptação às grandes altitudes em populações andinas. (Valverde *et al.*, 2015).

Crawford e colaboradores (2017), mais recentemente, descreveram sinal de seleção em uma via até então não identificada em andinos. Os genes com evidências mais fortes de seleção - *BRINP3* (*Bone Morphogenetic Protein/Retinoic Acid Inducible Neural-Specific 3*), *NOS2* (*Nitric Oxide Synthase 2*) e *TBX5* (*T-Box 5*) - estão associados ao desenvolvimento e função cardiovascular, mas não atuam na via de resposta à hipóxia.

O aumento da quantidade de hemácias (policitemia) devido à hipóxia pode aumentar o risco de mortalidade por insuficiência cardíaca, causa comumente observada na doença crônica das montanhas (Mal das Montanhas). Além disso, as respostas fisiológicas à hipóxia estão associadas à redução de *fitness* adaptativo. Interessantemente, os tibetanos se adaptaram às grandes altitudes, em parte por meio da seleção de variantes genéticas associadas à redução da resposta fisiológica à policitemia. Em contraste, os nativos do Altiplano Andino apresentam uma elevada contagem de hemácias. Assim, é esperado que eles exibam outras características adaptativas que possam suprir os altos níveis de hemoglobina e células vermelhas. Por exemplo, haplótipos descritos para os três genes - citados previamente: *BRINP3*, *NOS2* e *TBX5* - podem estar associados às variações fenotípicas relacionadas à saúde cardiovascular dessas populações, a fim de mitigar os efeitos deletérios da policitemia em vez de reduzir a policitemia *per se* (Crawford *et al.*, 2017)

Apesar de inúmeros genes e diferentes vias estarem implicadas na adaptação genética às altas altitudes, um número crescente de evidências sugere que apenas a genética não seria capaz de explicar a variação nos fenótipos adaptativos observados nessas populações. Para caracterizar se as respostas adaptativas nos andinos possuem um componente epigenético, Childebayeva e colaboradores avaliaram o padrão de metilação do DNA na região promotora do *EPAS1* e no elemento repetitivo *LINE-1* (*Long Interspersed Element-1*) em indivíduos Quechua do Altiplano Andino (4.388m acima do nível do mar) e indivíduos residentes de baixas altitudes do Peru. Nesse estudo, os autores

sugerem que os indivíduos nativos do Altiplano Andino (Quechua) têm um padrão de metilação do DNA menor no gene *EPAS1* e maior no *LINE-1*. Além disso, foram descritos quatro SNPs na via do metabolismo 1C (One Carbon) nos genes: *MTHFD1* (*Methylene Tetra Hydro Folate Dehydrogenase 1*) rs2236225, (*Thymidylate Synthetase*) rs502396, (*Folate Hydrolase 1*) rs202676, (*Glycine Decarboxylase*) rs1097568, os quais foram associados a diferenças na metilação de *LINE-1*. Os genes na via 1C estão envolvidos na geração de grupos metil para metilação do DNA, e, juntos explicam quase 12% da variação no padrão de metilação dos indivíduos que vivem em terras altas. Tomados em conjunto esses resultados indicam que a exposição à hipóxia afeta o padrão de metilação de *EPAS1* e *LINE-1* nos indivíduos que vivem nas terras altas da América do Sul, sugerindo que modificações epigenéticas podem ter um papel importante na adaptação em altas altitudes (Childebayeva *et al.*, 2019).

#### **1.4 O gene *TP53* e sua *Network***

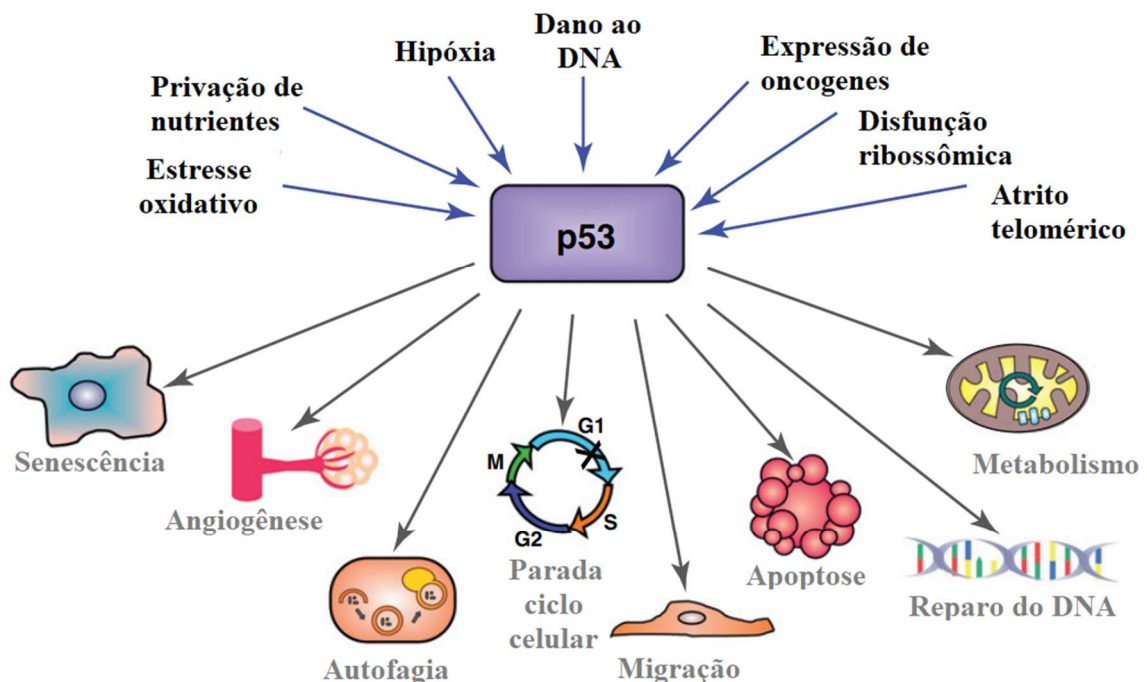
Um gene que recentemente vem se destacando na adaptação para vida em altas altitudes é o gene *TP53* (*Tumor Protein P53*), codificador da proteína p53. Eichstaedt e colaboradores (2015) foram os primeiros a reportarem a associação de *TP53* com a adaptação à altitude em populações nativas do Altiplano Andino. Através de abordagem GWAS, eles avaliaram a população de Colla (Andes, Argentina) e identificaram um sinal de seleção natural em diversos genes, inclusive no *TP53*. No entanto, à época, os autores apenas citaram o fato de *TP53* estar envolvido na via de resposta à hipóxia (Eichstaedt *et al.*, 2015), sem dar o devido destaque a esse achado.

Em outros mamíferos não humanos, alterações mutacionais em *TP53* foram descritas como tendo um papel importante na adaptação ambiental. Zhao *et al.*, (2013) compararam os genomas de roedores de terras altas (*Myospalax baileyi* e *Microtus oeconomus*) com roedores de terras baixas (*Myospalax cansus*), e observaram variações no códon 104 de p53 potencialmente funcionais. Estudos *in vitro* demonstraram como essas variantes respondem aos estímulos de hipóxia, frio e a regulação do pH. A presença de Ácido Glutâmico nesta posição em p53 de *Microtus oeconomus* é relacionada à tolerância a hipóxia, enquanto a presença de uma Asparagina na mesma posição em *Myospalax baileyi* poderia ser uma adaptação tanto a hipóxia quanto a hipercapnia (estresse ácido, alto CO<sub>2</sub>) relacionado às altas altitudes (~3,000–4,500 m) que essa espécie habita (Zhao *et al.*, 2013).



Os resultados indicam que as variações de p53 observadas nestes animais de altitude não são aleatórias, mas provavelmente são produtos da seleção natural, o que explicaria parcialmente a sobrevivência às tensões ambientais características do planalto Tibetano (Zhao *et al.*, 2013).

Conhecida como "guardiã do genoma", a proteína p53 funciona como um fator de transcrição, e desempenha um papel crítico nas respostas às diversas fontes estressoras a fim de manter a estabilidade genômica (**Figura 7**) (Chao, 2015). A quantidade de p53 nas células é determinada principalmente pela taxa na qual ela é degradada, ao invés da taxa pela qual é produzida. A proteína é constitutivamente expressa em todas as células nucleadas e é mantida em níveis basais devido à sua rápida degradação via proteassomo (Nag *et al.*, 2013; Jovanović *et al.*, 2005). No entanto, em resposta a diferentes sinais celulares ocorre um acúmulo de p53, além de modificações pós-transcricionais na proteína, que vão gerar uma resposta adequada a tais estímulos. Esses sinais incluem elementos que causam danos ao DNA (estresse genotóxico, como a radiação UV), estresse oncogênicos, depleção de ribonucleotídeos ou hipóxia (Chen, 2012; Yamamoto e Iwakuma, 2018).

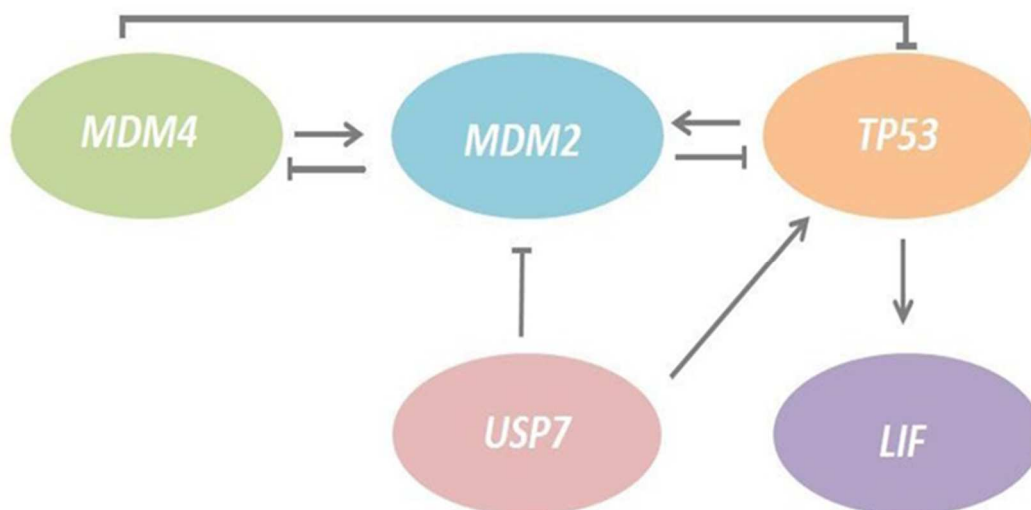


TRENDS in Cell Biology

**Figura 7.** Mecanismos que podem ativar p53 e as possíveis respostas celulares desencadeadas. Adaptado e traduzido de Bieging e Attardi 2012.

A principal proteína que regula os níveis e atividade de p53 é a MDM2 (*Mouse Double Minute 2 Homolog*). MDM2 regula a atividade de p53 tanto no núcleo quanto no citoplasma. No núcleo ela é responsável por manter baixos níveis de p53 em homeostase normal. Em condições de estresse celular, MDM2 rapidamente ativa p53 através de mecanismos que bloqueiem a sua interação com p53, resultando num aumento da quantidade de p53 na célula. No citoplasma, MDM2 atua como uma E3-ubiquitina-ligase tornando p53 alvo da degradação pelo proteassomo. As proteínas p53 e MDM2 são reguladas através de um sistema de *feedback* autorregulado: p53 regula positivamente MDM2, estimulando a transcrição do gene, enquanto MDM2 regula negativamente p53 (Kohn e Pommier, 2005; Nag *et al.*, 2013).

A resposta transcricional apropriada de p53 depende ainda de outros genes que compõem a via clássica de *TP53* (**Figura 8**), tais como *MDM2*, *MDM4*, *USP7* e *LIF*.



**Figura 8.** Rede clássica dos genes que interagem com *TP53* (Adaptado de Kang *et al.*, 2009).

Entre as variantes polimórficas mais bem caracterizadas do gene *TP53*, uma em especial tem destaque: uma mutação não-sinônima que consiste na troca de uma prolina (Pro: alelo C) por uma arginina (Arg: alelo G) no códon 72 do éxon 4 (rs1042522). O Alelo Arg72 é mais ativo na indução de apoptose e supressão da transformação celular (Dumont *et al.*, 2003).

O alelo Pro72 também é observado em outros primatas (incluindo o chimpanzé), enquanto o Arg72 está presente apenas em humanos, sugerindo que o alelo Pro72 seja o

alelo ancestral. Devido a funcionalidade dos diferentes alelos de p53 Pro72Arg e suas diferentes distribuições ao longo dos continentes, sugere-se que este fato não seria decorrente apenas de eventos aleatórios (Beckman *et al.*, 1994 e Sjalander *et al.*, 1996). Shi e colaboradores (2009) sugeriram que a ocorrência em altas frequências do alelo Arg72 em climas frios seria devido a ação da pressão seleção positiva, o que denota que dificilmente a variação hoje encontrada em *TP53*, bem como em outros genes da rede, não esteja sendo mediada pela ação seleção natural (Shi *et al.*, 2009).

Recentemente, um estudo correlacionando a incidência de câncer ao redor do mundo e variáveis ambientais (tais como média de temperatura), sugeriu que a redução do potencial apoptótico seja ocasionado por variantes específicas na proteína p53, que são benéficas em ambientes de altitude, mas poderiam levar a susceptibilidade ao câncer nos dias atuais, pelo menos em populações andinas e tibetanas (Voskarides, 2018). Além disso, tem sido descrito o papel de genes da rede clássica de *TP53* na reprodução humana (Paskulin *et al.*, 2012; Fraga *et al.*, 2014), fator crítico para uma trajetória evolutiva de sucesso.

Estudos do polimorfismo no gene humano *MDM2* (T > G; rs2279744), por sua vez, indicam que o alelo derivado cria um sítio para o fator de transcrição Sp1. Como resultado, homozigotos para o alelo G expressam mais RNA mensageiro, e, conseqüentemente, níveis elevados de *MDM2* são produzidos quando comparado aos homozigotos para o alelo T. Em situações de maior expressão de *MDM2* há uma diminuição na expressão de p53 celular, o que diminuiria a resposta celular ao estresse, resultando em uma maior taxa de mutação, devido à prejuízos no processo de reparo do DNA. Tal redução na atividade apoptótica e senescência aumentaria o risco para tumorigênese (Atwal *et al.*, 2007).

Vale destacar ainda que EPAS1 (*HIF-2 $\alpha$* ) - que pertencente à família HIF - tem importante atuação na rede de *TP53* (Bertout *et al.*, 2009). Os genes da via de HIF foram primeiramente descritos devido a sua conexão com células cancerosas, uma vez que *HIF-1 $\alpha$*  induz a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e eritropoietina, os quais promovem a angiogênese e a eritropoiese, respectivamente (Chen *et al.*, 2003). A subunidade  $\alpha$  de HIF (*HIF-1 $\alpha$* ) regula a atividade de p53, através da estabilidade frente a danos celulares, além da sua exportação nuclear através de interações com *MDM2* (Chen *et al.*, 2003; Schmid *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2015). Durante a hipóxia, há um acúmulo de *HIF-1 $\alpha$* . Em contrapartida, quando as células são reoxigenadas, *HIF-1 $\alpha$*  é rapidamente

degradada via proteassomo, mediado por VHL. Deste modo, a proteína p53 só é aumentada sob hipóxia severa. Sendo assim, HIF desempenha um papel fundamental na proteção celular em hipóxia moderada (Fels e Koumenis, 2006).

Considerando o impacto de alterações da via de *TP53* na expressão de p53, bem como os estudos que indicam correlação entre essas alterações genéticas e variações climáticas (Kang *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2009; Sucheston *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2013) somado ao papel de p53 na via de hipóxia, podemos pensar que variações gênicas nesta rota podem desempenhar um papel na adaptação humana mediada pelo clima, e assim ter um papel relevante nas adaptações a altas altitudes nos Andes.

Sendo assim, *TP53* e outros genes da mesma rede tornam-se extraordinários genes candidatos para estudos que buscam desvendar o repertório genético por trás da adaptação às altas altitudes. Este tema será adequadamente abordado e aprofundado no capítulo 3: “*Genetic Variations in the TP53 Pathway in Native Americans Strongly Suggest Adaptation to the High Altitudes of the Andes*” e capítulo 4: “*Selection Scan Reveals Three New Loci Related to High Altitude Adaptation in Native Andeans*”.

## 1.5 O gene HLA-G

O Antígeno Leucocitário Humano G (HLA-G) é uma molécula não clássica do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe 1, que possui uma expressão restrita às células do trofoblasto extraviloso na interface materno-fetal durante a gestação. A expressão de HLA-G tem sido associada à tolerância imunológica materna em relação às células fetais, além de estimular a liberação de importantes fatores angiogênicos pelas células imunes maternas, sendo essencial para o sucesso da reprodução humana e manutenção da nossa espécie. É importante ressaltar que a expressão do HLA-G varia em condições patológicas e pode ter efeitos tanto prejudiciais (doenças infecciosas, neoplasias malignas) ou benéficos (autoimunidade e distúrbios inflamatórios) dependendo do contexto biológico (Alegre *et al.*, 2014).

Notavelmente, a expressão de HLA-G é modulada *in vitro*, após a exposição à hipóxia. Além disso, os níveis de HLA-G são claramente relacionados à gestação e progressão de tumores, ambas condições caracterizadas por ambientes sob hipóxia (Nagamatsu *et al.*, 2004; Yaghi *et al.*, 2016).

A região 3' UTR não traduzida do *HLA-G* desempenha um papel importante na regulação pós-transcricional do gene. Os polimorfismos de nucleotídeo único no *HLA-G* 3'UTR são relatados como influenciadores da expressão de HLA-G através de mecanismos relacionados à estabilidade do mRNA ou repressão traducional através da ligação de miRNA (Castelli *et al.*, 2010).

Apesar do curto comprimento desta região [~358 pares de base (pb)], o *HLA-G* 3'UTR abriga inúmeras variantes. São elas: 14-bp indel (rs371194629), +3001 C/T (rs567747015), +3003 T/C (rs1707), +3010 C/G (rs1710), +3027 C/A (rs17179101), +3032 G/C (rs146339774), +3035 C/T (rs17179108), +3052 C/T (rs569057854), +3092 G/T (rs180827037), +3107 C/G (rs não disponível), +3111 G/A (rs554784083), +3121 T/C (rs138249160), +3142 G/C (rs1063320), +3177 G/T (rs554076817), +3183A/G (rs187320344), +3187 A/G (rs9380142), +3196 C/G (rs1610696), +3227 G/A (rs1233331), +3289 C/T (rs541542414). Até o momento, diversos haplótipos já foram caracterizados através da análise destes sítios polimórficos em diferentes populações. No entanto, apenas 8 haplótipos são observados em uma frequência acima de 1% (UTR-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -18). Além disso, a UTR-1, a UTR-2 e a UTR-3 são as mais frequentes e representam cerca de 70% da variação observada em todo o mundo (Sabbagh *et al.*, 2014).

É descrito que os haplótipos de HLA-G 3'UTR possam influenciar os níveis de HLA-G solúvel (sHLA-G). O haplótipo UTR-1 geralmente é associado a níveis plasmáticos mais elevados de sHLA-G, uma vez que é constituído pela maioria das variantes independentemente associadas à maior expressão proteica. Por outro lado, a UTR-5 e a UTR-7 estariam associados aos níveis mais baixos de sHLA-G, enquanto UTR-2, 3, 4 e 6 exibiram níveis intermediários solúveis (Martelli-Palomino *et al.*, 2013).

No contexto da alta altitude, avaliando o sangue periférico de alpinistas no Monte Everest (planalto do Tibete) Bourguignon e colaboradores (2010) evidenciaram que os níveis de sHLA-G são regulados positivamente durante a escalada até o cume da montanha, indicando que HLA-G pode ser um mecanismo relevante na adaptação as altas altitudes, pelo menos considerando adaptação fisiológica, transiente e reversível (*short-term*). Os autores também reforçaram o papel da hipóxia como um fator importante na regulação da expressão de HLA-G (Bourguignon *et al.*, 2010).

A região *HLA-G* 3'UTR foi caracterizada na população brasileira do estado de São Paulo (Castelli *et al.*, 2010). Neste estudo, 8 polimorfismos foram descritos - caracterizando 7 haplótipos, UTR-1 a UTR-7. Posteriormente, outros grupos populacionais brasileiros foram explorados, indicando que o padrão da diversidade dos haplótipos da região 3'UTR do *HLA-G* observado em São Paulo também é observado em outras regiões do país (Mendes *et al.*, 2007; Lucena-Silva *et al.*, 2012). A variação genética da região *HLA-G* 3'UTR já foi estudada na Europa, África Subsaariana, Ásia Oriental e América (populações miscigenadas), avaliadas em um total de 21 populações. Desse modo, a diversidade e a caracterização dessa região gênica em Nativos Americanos, e, na adaptação à alta altitude ainda é desconhecida.

Evolutivamente, Castelli e colaboradores (2011) descreveram evidências de seleção purificadora atuando sobre a região codificadora do *HLA-G* (Castelli *et al.*, 2011), enquanto que as duas regiões regulatórias, 5'-UTR e 3'-UTR, apresentam evidências de seleção balanceadora em diferentes populações (Tan *et al.*, 2005; Mendes *et al.*, 2007; Castelli *et al.*, 2011; Donadi *et al.*, 2011; Veit *et al.*, 2012; Mendes-Junior *et al.*, 2013).

Tomados em conjunto, esses dados sugerem que o *HLA-G* pode ser um gene candidato bastante interessante para ser avaliado no contexto da adaptação para a vida em altitude no Altiplano Andino. Desta forma, no capítulo 5 é apresentado através do manuscrito, em preparação, intitulado “*Characterization of HLA-G 3'UTR in Native Americans– altitude as a selection factor influencing population frequencies of HLA-G haplotypes*”.

## **1.6 A Busca por Genes e suas variantes através das varreduras genômicas**

Como visto nos itens anteriores, parte dos estudos que identificaram até aqui as bases genéticas por trás da adaptação humana as altas altitudes se deu por uso das estratégias de genes candidatos. Nesse caso, concentra-se em associações entre a variação genética em gene(s) pré-especificado(s) e com já conhecido (ou sugerido) papel funcional nos fenótipos sob investigação (Zhu e Zhao, 2007). Esse tipo de abordagem se contrapõe aos estudos de associação com dados genéticos de varredura genômica (*genome-wide association studies*, GWAS), que usa como estratégia um grande conjunto de polimorfismos comuns, para identificar distribuições alélicas significativamente diferentes entre os conjuntos populacionais investigados. Dessa forma, novos genes e variantes

podem ser identificados como membros de um repertório genético associado a um determinado fenótipo. Tal estratégia foi basicamente desenvolvida para se identificar fatores de risco genéticos para doenças comuns e complexas, como esquizofrenia e diabetes tipo II (Bush *et al.*, 2012). Não obstante, estudos que usam GWAS vêm sendo útil também na identificação do conjunto de variantes comuns que podem estar relacionados com traços adaptativos.

Já foi visto em itens anteriores várias referências à estudos de GWAS que são pertinentes a temática da presente tese. Usamos essa estratégia para desenvolver um trabalho que faz parte da presente tese e que já foi publicado: “*Selection scan reveals three new loci related to high altitude adaptation in Native Andeans*”.

## 1.7 Referências Bibliográficas

Acuña-Alonzo V, Flores-Dorantes T, Kruit JK, Villarreal-Molina T, Arellano-Campos O, Hünemeier T, Moreno-Estrada A, Ortiz-López MG, Villamil-Ramírez H, León-Mimila P *et al.*, (2010) A functional ABCA1 gene variant is associated with low HDL-cholesterol levels and shows evidence of positive selection in Native Americans. *Hum Mol Genet* 19:2877-2885.

Aldenderfer M (2011) Peopling the Tibetan plateau: insights from archaeology. *High Alt Med Biol* 12:141-147.

Alegre E, Rizzo R, Bortolotti D, Fernandez-Landazuri S, Fainardi E, Gonzalez A, (2014) Some basic aspects of HLA-G biology. *J Immunol Res* 2014:657625.

Alkorta-Aranburu G, Beall CM, Witonsky DB, Gebremedhin A, Pritchard JK, Di Rienzo A (2012) The genetic architecture of adaptations to high altitude in Ethiopia. *PLoS Genet* 8:e1003110.

Amorim CE, Nunes K, Meyer D, Comas D, Bortolini MC, Salzano FM, Hünemeier T (2017) Genetic signature of natural selection in first Americans. *Proc Natl Acad Sci USA* 114:2195-2199.

Atwal GS, Kirchhoff T, Bond EE, Montagna M, Menin C, Bertorelle R, Scaini MC, Bartel F, Böhnke A, Pempe C *et al.*, (2007) Haplotype structure and selection of the MDM2 oncogene in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4524-4529.

Beall CM, Cavalleri GL, Deng L, Elston RC, Gao Y, Knight J, Li C, Li JC, Liang Y, McCormack M *et al.*, (2010) Natural selection on EPAS1 (HIF2alpha) associated with low hemoglobin concentration in Tibetan highlanders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:11459-11464.

Beall CM, Decker MJ, Brittenham GM, Kushner I, Gebremedhin A, Strohl KP (2002) An Ethiopian pattern of human adaptation to high-altitude hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:17215-17218.

Beall CM, Laskowski D, Erzurum SC (2012) Nitric oxide in adaptation to altitude. *Free Radic Biol Med* 52:1123-1134.

Beckman G, Birgander R, Sjölander A, Saha N, Holmberg PA, Kivelä A, Beckman L (1994) Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered* 44:266–270.

Bieging KT, Attardi LD (2012) Deconstructing p53 transcriptional networks in tumor suppression. *Trends Cell Biol* 22(2):97-106.

Bertout JA, Majmundar AJ, Gordan JD, Lam JC, Ditsworth D, Keith B, Brown EJ, Nathanson KL, Simon MC (2009) HIF2alpha inhibition promotes p53 pathway activity, tumor cell death, and radiation responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(34):14391-6.

Bigham A, Bauchet M, Pinto D, Mao X, Akey JM, Mei R, Scherer SW, Julian CG, Wilson MJ, López Herráez D (2010) Identifying signatures of natural selection in Tibetan and Andean populations using dense genome scan data. *PLoS Genet* 6:e1001116.

Bigham AW, Julian CG, Wilson MJ, Vargas E, Browne VA, Shriver MD, Moore LG (2014) Maternal PRKAA1 and EDNRA genotypes are associated with birth weight, and PRKAA1 with uterine artery diameter and metabolic homeostasis at high altitude. *Physiol Genomics* 46:687-697.

Bigham AW and Lee FS (2014) Human high-altitude adaptation: forward genetics meets the HIF pathway. *Genes Dev* 28:2189-2204.

Bigham AW, Mao X, Mei R, Brutsaert T, Wilson MJ, Julian CG, Parra EJ, Akey JM, Moore LG, Shriver MD (2009) Identifying positive selection candidate loci for high-altitude adaptation in Andean populations. *Hum Genomics* 4:79-90.

Bigham AW (2016) Genetics of human origin and evolution: high-altitude adaptations. *Curr Opin Genet Dev* 41:8-13.

Borradale DC and Kimlin MG (2012) Folate degradation due to ultraviolet radiation: Possible implications for human health and nutrition. *Nutr Rev* 70:414-422.

Bortolini MC, González-José R, Bonatto SL, Santos FR (2014) Reconciling pre-Columbian settlement hypotheses requires integrative, multidisciplinary, and model-bound approaches. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E213-214.

Bortolini MC, Salzano FM, Thomas MG, Stuart S, Nasanen SPK, Bau CHD, Hutz MH, Layrisse Z, Petzl-Erler ML, Tsuneto LT *et al.*, (2003) Y-Chromosome for differing ancient demographic histories in the Americas. *Am J Hum Genet* 73:524-539.

Bourguignon M, Yaghi L, Flajollet S, Radanne-Krawice I, Rouas-Freiss N, Lugin D, Richalet JP, Carosella ED, Moreau P, (2010) Increased soluble human leukocyte antigen-G levels in peripheral blood from climbers on Mount Everest. *Hum Immunol* 71: 1105–1108.

Bush WS, Moore JH (2012) Lewitter F, Kann M, eds. "Chapter 11: Genome-wide association studies". *PLoS Computational Biology* 8 (12): e1002822.

Castelli EC, Mendes-Junior CT, Veiga-Castelli LC, Roger M, Moreau P, Donadi EA (2011) A comprehensive study of polymorphic sites along the HLA-G gene: implication for gene regulation and evolution. *Mol Biol Evol* 28:3069-86.

Castelli EC, Mendes-Junior CT, Deghaide NH, de Albuquerque RS, Muniz YC, Simões RT, Carosella ED, Moreau P, Donadi EA (2010) The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. *Genes Immun* 11:134-141.

Chala-Aldana D, Bocherens H, Miller C, Moore K, Hodgins G, Rademaker K (2017) Investigating mobility and highland occupation strategies during the Early Holocene at the Cuncaicha rock shelter through strontium and oxygen isotopes. *J Archaeol Sci Rep* 19:811-827.

Chao CC (2015) Mechanisms of p53 degradation. *Clin Chim Acta* 438:139-147.

Chen D, Li M, Luo J, Gu W (2003) Direct interactions between HIF-1 alpha and Mdm2 modulate p53 function. *J Biol Chem* 278:13595–13598.

Chen J (2012) The Roles of MDM2 and MDMX Phosphorylation in Stress Signaling to p53. *Genes Cancer* 3:274-282.



Childebayeva A, Jones TR, Goodrich JM, Leon-Velarde F, Rivera-Chira M, Kiyamu M, Brutsaert TD, Dolinoy DC, Bigham AW (2019) LINE-1 and EPAS1 DNA Methylation Associations with High-Altitude Exposure. *Epigenetics* 14(1):1-15.

Crawford JE, Ricardo Amaru R, Song J, Julian CG, Racimo F, Cheng JY, Guo X, Yao J, Ambale-Venkatesh B, Lima JA (2017) Natural Selection on Genes Related to Cardiovascular Health in High-Altitude Adapted Andeans. *Am J Hum Genet* 101:752-767.

Cueto M (1986) Andean biology in Peru: scientific styles on the periphery. *Isis* 80: 640–658.

Donadi EA, Castelli EC, Arnaiz-Villena A, Roger M, Rey D, Moreau P (2011) Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cell Mol Life Sci* 68:369-395.

Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC 3rd, George DL, Murphy M (2003) The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 33:357–365.

Eichstaedt CA, Antão T, Pagani L, Cardona A, Kivisild T, Mormina M (2014) The Andean adaptive toolkit to counteract high altitude maladaptation: genome-wide and phenotypic analysis of the Collas. *PLoS One* 9:e93314.

Eichstaedt CA, Pagani L, Antao T, Inchley CE, Cardona A, Mörseburg A, Clemente FJ, Sluckin TJ, Metspalu E, Mitt M *et al.*, (2017) Evidence of Early-Stage Selection on EPAS1 and GPR126 Genes in Andean High Altitude Populations. *Sci Rep* 7:13042.

Eichstaedt CA, Antao T, Cardona A, Pagani L, Kivisild T, Mormina M (2015) Positive selection of AS3MT to arsenic water in Andean populations. *Mutat Res Mol Mech Mutagen* 780:97-102.

Fagundes NJR, Kanitz R, Eckert R, Valls ACS, Bogo MR, Salzano FM, Smith DG, Silva Jr WA, Zago MA, Ribeiro-dos-Santos AK *et al.*, (2008) Mitochondrial population genomics supports a single pre-Clovis origin with a coastal route for the peopling of the Americas. *Am J Hum Genet* 82:583-592.

Fan S, Hansen ME, Lo Y, Tishkoff SA (2016) Going global by adapting local: A review of recent human adaptation. *Science* 354: 54-59.

Fehren-Schmitz L and Georges L (2016) Ancient DNA reveals selection acting on genes associated with hypoxia response in pre-Columbian Peruvian Highlanders in the last 8500 years. *Sci Rep* 6:23485.

Fels DR and Koumenis C (2006) The PERK/eIF2alpha/ATF4 module of the UPR in hypoxia resistance and tumor growth. *Cancer Biol Ther* 5(7):723-8.

Foll M, Gaggiotti OE, Daub JT, Vatsiou A, Excoffier L (2014) Widespread signals of convergent adaptation to high altitude in Asia and America. *Am J Hum Genet* 95:394-407.

Fraga LR, Dutra CG, Boquett JA, Vianna FS, Gonçalves RO, Paskulin DD, *et al.*, (2014) p53 signaling pathway polymorphisms associated to recurrent pregnancy loss. *Mol Biol Rep* 41:1871-1877.

Frisancho AR (2013) Developmental functional adaptation to high altitude: Review. *Am J Hum Biol* 25:151-168.

Fort M, de Stefano GF, Cambon-Thomsen A, Giraldo-Alvarez P, Dugoujon JM, Ohayon E, Scano G, Abbal M (1998) HLA class II allele and haplotype frequencies in Ethiopian Amhara and Oromo populations. *Tissue Antigens* 1:327-336.

Fumagalli M, Moltke I, Grarup N, Racimo F, Bjerregaard P, Jørgensen ME, Korneliussen TS, Gerbault P, Skotte L, Linneberg A *et al.*, (2015) Greenlandic Inuit show genetic signatures of diet and climate adaptation. *Science* 349:1343-1347.

González-José R, Bortolini MC, Santos FR and Bonatto SL (2008) The peopling of America: craniofacial shape variation on a continental scale and its interpretation from an interdisciplinary view. *Am J Phys Anthropol* 137:175-187.

Greer SN, Metcalf JL, Wang Y, Ohh M (2012) The updated biology of hypoxia-inducible factor. *EMBO J* 31:2448-2460.

Henry JP (2019) Genetics and origin of *Homo sapiens*. *Med Sci Paris* 35:39-45.

Hu H, Petousi N, Glusman G, Yu Y, Bohlender R, Tashi T, Downie JM, Roach JC, Cole AM, Lorenzo FR *et al.*, (2017) Evolutionary history of Tibetans inferred from whole-genome sequencing. *PLoS Genet* 13:e1006675.

Hublin JJ, Ben-Ncer A, Bailey SE, Freidline SE, Neubauer S, Skinner MM, Bergmann I, Le Cabec A, Benazzi S, Harvati K *et al.*, (2017) New fossils from Jebel Irhoud, Morocco and the pan-African origin of *Homo sapiens*. *Nature* 546:289-292.

Huerta-Sánchez E, Jin X, Asan, Bianba Z, Peter BM, Vinckenbosch N, Liang Y, Yi X, He M, Nielsen R *et al.*, (2014) Altitude adaptation in Tibetans caused by introgression of Denisovan-like DNA. *Nature* 512:194-7.

Hünemeier T, Amorim CE, Azevedo S, Contini V, Acuña-Alonzo V, Rothhammer F, Dugoujon JM, Mazières S, Barrantes R, Villarreal-Molina MT *et al.*, (2012) Evolutionary responses to a constructed niche: ancient Mesoamericans as a model of gene-culture coevolution. *PLoS One* 7(6):e38862.

Jeong C, Witonsky DB, Basnyat B, Neupane M, Beall CM, Childs G, Craig SR, Novembre J, Di Rienzo A (2018) Detecting past and ongoing natural selection among ethnically Tibetan women at high altitude in Nepal. *PLoS Genet* 14:e1007650.

Jovanović I, Todorović V, Milosavljević T, Micev M, Pesko P, Bjelović M, Mouzas Y, Tzardi M (2005) Expression of p53 protein in Barrett's adenocarcinoma and adenocarcinoma of the gastric cardia and antrum. *Vojnosanit Pregl* 62:879-885.

Kang HJ, Feng Z, Sun Y, Atwal G, Murphy ME, Rebbeck TR, Rosenwaks Z, Levine AJ, Hu W (2009) Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway regulate fertility in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:9761-9766.

Keith B, Johnson RS, Simon MC (2011) HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$ : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer* 12:9-22.

Kohn KW and Pommier Y (2005) Molecular interaction map of the p53 and Mdm2 logic elements, which control the Off-On switch of p53 in response to DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* 331:816-827.

Lanikova L, Reading NS, Hu H, Tashi T, Burjanivova T, Shestakova A, Siwakoti B, Thakur BK, Pun CB, Sapkota A *et al.*, (2017) Evolutionary selected Tibetan variants of HIF pathway and risk of lung cancer. *Oncotarget* 8:11739-11747.

Lee FS and Percy MJ (2011) The HIF pathway and erythrocytosis. *Annu Rev Pathol* 6:165-92.

Lindo J, Haas R, Hofman C, Apatá M, Moraga M, Verdugo RA, Watson JT, Viviano Llave C, Witonsky D, Beall C *et al.*, (2018) The genetic prehistory of the Andean highlands 7000 years BP through European contact. *Sci Adv* 4:eaau4921.

Lorenzo FR, Huff C, Myllymäki M, Olenchock B, Swierczek S, Tashi T, Gordeuk V, Wuren T, Ri-Li G, McClain DA, *et al.*, (2014) A genetic mechanism for Tibetan high-altitude adaptation. *Nat Genet* 46:951-6.

Lou H, Lu Y, Lu D, Fu R, Wang X, Feng Q, Wu S, Yang Y, Li S, Kang L *et al.*, (2015) A 3.4-kb copy-number deletion near EPAS1 is significantly enriched in high-altitude Tibetans but absent from the Denisovan sequence. *Am J Hum Genet* 97:54-66.

Lucena-Silva N, Monteiro AR, de Albuquerque RS, Gomes RG, Mendes-Junior CT, Castelli EC, Donadi EA (2012) Haplotype frequencies based on eight polymorphic sites at the 3' untranslated region of the HLA-G gene in individuals from two different geographical regions of Brazil. *Tissue Antigens* 79(4):272-278.

Martelli-Palomino, G., Pancotto, J.A., Muniz, Y.C., Mendes-Junior, C.T., Castelli, E.C., Massaro, J.D., Krawice-Radanne, I., Poras, I., Rebmann, V., Carosella, E.D *et al.*, (2013) Polymorphic Sites at the 3' Untranslated Region of the HLA-G Gene Are Associated with Differential HLA-G Soluble Levels in the Brazilian and French Population. *PLoS One* 8, e71742.

Monge CM (1948) *Acclimatization in the Andes: Historical Confirmations of 'Climatic Aggression' in the Development of Andean Man.* Johns Hopkins Press, 1948.

Mendes-Junior CT, Castelli EC, Simões RT, Simões AL, Donadi EA (2007) HLA-G 14-bp polymorphism at exon 8 in Amerindian populations from the Brazilian Amazon. *Tissue Antigens* 69:255-260.

Miyazaki K, Kawamoto T, Tanimoto K, Nishiyama M, Honda H, Kato Y (2002) Identification of functional hypoxia response elements in the promoter region of the DEC1 and DEC2 genes. *J Biol Chem* 277:47014-47021.

Moore LG (2001) Human genetic adaptation to high altitude. *High Alt Med Biol.* 2:257-79.

Moore LG (2017) Measuring high-altitude adaptation. *J Appl Physiol* 123:1371-1385.

Moreno-Mayar JV, Potter BA, Vinner L, Steinrücken M, Rasmussen S, Terhorst J, Kamm JA, Albrechtsen A, Malaspina AS, Sikora M *et al.*, (2018) Terminal Pleistocene Alaskan genome reveals first founding population of Native Americans. *Nature* 553:203-207.

Nag S, Qin J, Srivenugopal KS, Wang M, Zhang R (2013) The MDM2-p53 pathway revisited. *J Biomed Res* 27:254-271.

Nagamatsu T, Fujii T, Yamashita T, Miki A, Kanai T, Kusumi M, Osuga Y, Kozuma S, Taketani Y (2004) Hypoxia does not reduce HLA-G expression on extravillous cytotrophoblasts. *J Reprod Immunol* 63:85-95.

Paskulin, Paixão-Côrtes VR, Hainaut P, Bortolini MC, Ashton-Prolla P (2012) The TP53 fertility network. *Genet Mol Biol* 35:939-946.

Pena SD, Santos FR, Bianchi NO, Bravi CM, Carnese FR, Rothhammer F, Gerelsaikhan T, Munkhtuja B and Oyunsuren T (1995) A major founder Y-chromosome haplotype in Amerindians. *Nat Genet* 11:15-16.

Peng Y, Cui C, He Y, Ouzhuluobu, Zhang H, Yang D, Zhang Q, Bianbazhuoma, Yang L, He Y *et al.*, (2017) Down-Regulation of EPAS1 Transcription and Genetic Adaptation of Tibetans to High-Altitude Hypoxia. *Mol Biol Evol* 34:818-830.

Peng Y, Yang Z, Zhang H, Cui C, Qi X, Luo X, Tao X, Wu T, Ouzhuluobu Basang *et al.*, (2011). Genetic variations in Tibetan populations and high-altitude adaptation at the Himalayas. *Mol Biol Evol* 28:1075-1081.

Pinotti T, Bergström A, Geppert M, Bawn M, Ohasi D, Shi W, Lacerda DR, Solli A, Norstedt J, Reed K *et al.*, (2019) Y Chromosome Sequences Reveal a Short Beringian Standstill, Rapid Expansion, and early Population structure of Native American Founders. *Curr Biol* 29:149-157.e3.

Posth C, Nakatsuka N, Lazaridis I, Skoglund P, Mallick S, Lamnidis TC, Rohland N, Nägele K, Adamski N, Bertolini E *et al.*, (2018) Reconstructing the Deep Population History of Central and South America. *Cell* 175:1185-1197.e22.

Rademaker K, Hodgins G, Moore K, Zarrillo S, Miller C, Bromley GR, Leach P, Reid DA, Álvarez WY, Sandweiss DH (2014) Paleoindian settlement of the high-altitude Peruvian Andes. *Science*. 24;346:466-9.

Ray N, Wegmann D, Fagundes NJ, Wang S, Ruiz-Linares A and Excoffier L (2009) A statistical evaluation of models for the initial settlement of the American continent emphasizes the importance of gene flow with Asia. *Mol Biol Evol* 27:337-345.

Reich D, Patterson N, Campbell D, Tandon A, Mazieres S, Ray N, Parra MV, Rojas W, Duque C, Mesa N *et al.*, (2012) Reconstructing Native American population history. *Nature* 488:370-374.

Sabbagh A, Luisi P, Castelli EC, Gineau L, Courtin D, Milet J, Massaro JD, Laayouni H, Moreau P, Donadi EA *et al.*, (2014) Worldwide genetic variation at the 3' untranslated region of the HLA-G gene: balancing selection influencing genetic diversity. *Genes Immun* 15:95-106.

Santos FR, Bonatto SL and Bortolini MC (2007) Molecular evidence from contemporary indigenous populations to the Peopling of America. Recent advances in molecular biology and evolution: Applications to biological anthropology. *Research Signpost, Kerala*, pp 1-13.

Scheinfeldt LB, Soi S, Thompson S, Ranciaro A, Woldemeskel D, Beggs W, Lambert C, Jarvis JP, Abate D, Belay G *et al.*, (2012) Genetic adaptation to high altitude in the Ethiopian highlands. *Genome Biol* 13: R1.

Scheinfeldt LB, Soi S and Tishkoff SA (2010) Colloquium paper: working toward a synthesis of archaeological, linguistic, and genetic data for inferring African population history. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2:8931-8938.

Scheinfeldt LB and Tishkoff SA (2010) Living the high life: high-altitude adaptation. *Genome Biol* 11:133.

Schlebusch CM, Gattepaille LM, Engström K, Vahter M, Jakobsson M, Broberg K (2015) Human adaptation to arsenic-rich environments. *Mol Biol Evol* 32:1544-55.

Schmid T, Zhou J and Brüne, B (2004) HIF-1 and p53: communication of transcription factors under hypoxia. *J Cell Mol Med* 8:423-431.

Schroeder KB, Schurr TG, Long JC, Rosenberg NA, Crawford MH, Tarskaia LA, Osipova LP, Zhadanov SI and Smith DG (2007) A private allele ubiquitous in the Americas. *Biol Lett* 3:218-223.

Scortegagna M, Ding K, Zhang Q, Oktay Y, Bennett MJ, Bennett M, Shelton JM, Richardson JA, Moe O, Garcia JA (2005) HIF-2 $\alpha$  regulates murine hematopoietic development in an erythropoietin-dependent manner. *Blood* 105:3133-3140.

Semenza GL (1999) Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible Factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:551-578.

Shi H, Tan SJ, Zhong H, Hu W, Levine A, Xiao CJ, Peng Y, Qi XB, Shou WH, Ma RL *et al.*, (2009) Winter temperature and UV are tightly linked to genetic changes in the p53 tumor suppressor pathway in Eastern Asia. *Am J Hum Genet* 84:534-541.

Shimoda LA and Laurie SS (2014) HIF and pulmonary vascular responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 116:867-74.

Simonson TS, Huff CD, Witherspoon DJ, Prchal JT, Jorde LB (2015) Adaptive genetic changes related to haemoglobin concentration in native high-altitude Tibetans. *Exp Physiol* 100:1263-1268.

Simonson TS, McClain DA, Jorde LB, Prchal JT (2012) Genetic determinants of Tibetan high-altitude adaptation. *Hum Genet* 131:527-533.

Simonson TS, Yang Y, Huff CD, Yun H, Qin G, Witherspoon DJ, Bai Z, Lorenzo FR, Xing J, Jorde LB *et al.*, (2010) Genetic evidence for high-altitude adaptation in Tibet. *Science*. 329:72-5.

Simonson TS, Huff C D, Witherspoon DJ, Prchal JT, Jorde LB (2015) Adaptive genetic changes related to haemoglobin concentration in native high-altitude Tibetans. *Exp Physiol* 100:1263-1268.

Själänder A, Birgander R, Saha N, Beckman L, Beckman G (1996) p53 polymorphisms and haplotypes show distinct differences between major ethnic groups. *Hum Hered* 46:41–48.

Skoglund P, Mallick S, Bortolini MC, Chennagiri N, Hünemeier T, Petzl-Erler ML, Salzano FM, Patterson N, Reich D (2015) Genetic evidence for two founding populations of the Americas. *Nature* 525:104-108.

Song D, Li LS, Arsenault PR, Tan Q, Bigam AW, Heaton-Johnson KJ, Master SR, Lee FS (2014) Defective Tibetan PHD2 binding to p23 links high altitude adaptation to altered oxygen sensing. *The Journal of biological chemistry* 289:14656-14665.

Soria R, Julian CG, Vargas E, Moore LG, Giussani DA (2013) Graduated effects of high-altitude hypoxia and highland ancestry on birth size. *Pediatr Res* 74:633-638.

Sucheston L, Witonsky DB, Hastings D, Yildiz O, Clark VJ, Di Rienzo A, Onel K (2011) Natural selection and functional genetic variation in the p53 pathway. *Hum Mol Genet* 20:1502-1508.

Tan Z, Shon A, Ober C (2005) Evidence of balancing selection at the HLA-G promoter region. *Hum Mol Genet* 14:3619-3628.

Tashi T, Scott Reading N, Wuren T, Zhang X, Moore LG, Hu H, Tang F, Shestakova A, Lorenzo F, Burjanivova T *et al.*, (2017) Gain-of-function EGLN1 prolyl hydroxylase (PHD2 D4E:C127S) in combination with EPAS1 (HIF-2 $\alpha$ ) polymorphism lowers hemoglobin concentration in Tibetan highlanders. *J Mol Med* 95:665-670.

Valverde G, Zhou H, Lippold S, de Filippo C, Tang K, López Herráez D, Li J, Stoneking M (2015) A novel candidate region for genetic adaptation to high altitude in Andean populations. *PLoS One* 10:e0125444.

Veit TD, Cazarolli J, Salzano FM, Schiengold M, Chies JA (2012) New evidence for balancing selection at the HLA-G locus in South Amerindians. *Genet Mol Biol* 35:919-923.

Voskarides K (2018) Combination of 247 Genome-Wide Association Studies Reveals High Cancer Risk as a Result of Evolutionary Adaptation. *Mol Biol Evol* 35:473-485.

Wang B, Zhang YB, Zhang F, Lin H, Wang X, Wan N, Ye Z, Weng H, Zhang L, Li X *et al.*, (2011) On the origin of Tibetans and their genetic basis in adapting high-altitude environments. *PLoS One* 6:e17002.

Wang GL and Semenza GL (1995) Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 270:1230-1237.

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

Winslow RM and Monge C (1987) *Hypoxia, Polycythemia, and Chronic Mountain Sickness*, Johns Hopkins Univ Press, Baltimore.

Woyessa A, Deressa W, Ali A, Lindtjörn B (2013) Malaria risk factors in Butajira area, south-central Ethiopia: a multilevel analysis. *Malar J* 12:273

Yaghi L, Poras I, Simoes RT, Donadi EA, Tost J, Daunay A, de Almeida BS, Carosella ED, Moreau P (2016) Hypoxia inducible factor-1 mediates the expression of the immune checkpoint HLA-G in glioma cells through hypoxia response element located in exon 2. *Oncotarget* 7: 1-18.

Yamamoto S and Iwakuma T (2018) Regulators of Oncogenic Mutant TP53 Gain of Function. *Cancers (Basel)* 20:11.

Yang D, Peng Y, Ouzhuluobu, Bianbazhuoma, Cui C, Bianba, Wang L, Xiang K, He Y, Zhang H *et al.*, (2016) HMOX2 Functions as a Modifier Gene for High-Altitude Adaptation in Tibetans. *Hum Mutat* 37:216-223.

Yang J, Jin ZB, Chen J, Huang XF, Li XM, Liang YB, Mao JY, Chen X, Zheng Z, Bakshi A *et al.*, (2017) Genetic signatures of high-altitude adaptation in Tibetans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:4189-4194.

Yi X, Liang Y, Huerta-Sanchez E, Jin X, Cuo ZX, Pool JE, Xu X, Jiang H, Vinckenbosch N, Korneliussen TS, *et al.*, (2010) Sequencing of 50 human exomes reveals adaptation to high altitude. *Science* 329, 75–78.

Zhao Y, Ren JL, Wang MY, Zhang ST, Liu Y, Li M, Cao YB, Zu HY, Chen XC, Wu CL, *et al.*, 2013. Codon 104 variation of p53 gene provides adaptive apoptotic responses to extreme environments in mammals of the Tibet plateau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:20639-20644.

Zhou CH, Zhang XP, Liu F, Wang W (2015) Modeling the interplay between the HIF-1 and p53 pathways in hypoxia. *Sci Rep* 5:13834.

Zhu M and Zhao S (2007) Candidate gene identification approach: progress and challenges. *Int J Biol Sci* 3 (7): 420–427.

#### **Internet resources section**

Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, <http://atlasgeneticsoncology.org/> (January, 2019).

Altitude: <http://www.altitude.org/home.php> (January,2019).

Center for International Earth Science Information Network (CIESIN), <http://www.ciesin.org/> (January, 2019).

**CAPÍTULO 2**  
**OBJETIVOS, MÉTODOS E RESULTADOS**

## 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel de variantes genéticas em populações ameríndias sul americanas, oriundas de ecossistemas distintos, considerando inicialmente a comparação de nativos americanos que habitam duas regiões geográficas distintas, quanto a vários parâmetros climáticos: terras altas, Andes (acima de 2.500 metros do nível do mar) e terras baixas (abaixo de 500 metros). Com isso, buscou-se inferir se as variantes (ou uma combinação delas), bem como o padrão geral de diversidade encontrados, considerando os *loci* sob investigação, poderiam ser explicados pela ação da seleção natural.

## 2.2 Objetivos Específicos

- Estimar a variabilidade de cinco genes da rede clássica de *TP53* através da investigação dos SNPs: rs1042522 (*TP53*), rs929271 (*LIF*), rs2279744 (*MDM2*), rs1563828 (*MDM4*), rs15229916 (*USP7*) nas populações alvo do estudo;
- Estimar a diversidade da região promotora 3'UTR do gene *HLA-G* nas populações alvo do estudo;
- A partir de uma varredura genômica, identificar genes e variantes genéticas associadas a adaptação a altas altitudes, considerando as populações alvo do estudo;
- Correlacionar as frequências genotípicas e alélicas encontradas nas três abordagens da presente tese (genes candidatos da rede do *TP53*, região candidata 3'UTR do *HLA-Ge* GWAS) nas diferentes populações alvo com as variáveis geográficas, ambientais e climáticas;
- Identificar padrões e sinais que possam ser explicados pela ação da seleção natural;
- Montar um cenário evolutivo que explique os achados considerando a história evolutiva e demográfica das populações investigadas.

## 2.3. Métodos

Os métodos específicos para atingir os objetivos descritos acima, encontram-se descritos, em detalhes, na sessão de resultados considerando cada um dos artigos e o manuscrito (Capítulos 3, 4 e 5).



## **2.4. RESULTADOS**

Nos capítulos 3, 4 e 5 pode-se encontrar os resultados da presente tese. Os mesmos foram reunidos em dois artigos (já publicados) e um manuscrito em preparação.

Além disso, um capítulo especial (6), relativo ao desenvolvimento de um trabalho específico durante o transcurso desse doutorado, também é apresentado.

**CAPÍTULO 6**  
**DISCUSSÃO GERAL, REFERÊNCIAS E ANEXOS**

## 6.1 Discussão geral

O estudo da adaptação para vida em altas altitudes é um tema bastante abordado na literatura científica mundial. Inserindo os termos “*high altitude AND human adaptation*” no PubMed encontramos 2.403 artigos científicos, sendo que o primeiro deles encontra-se publicado no ano de 1946, e já aborda o tema da hipóxia como um importante fator estressor do ambiente de altitude (Vannotti *et al.*, 1946). Se restringirmos a busca às adaptações genéticas “*high altitude AND human genetic adaptation*” encontramos ainda 244 publicações, divididas entre as três populações de altitude do mundo, e alguns poucos estudos funcionais.

É importante salientar que mesmo com mais de duas centenas de publicações relativas à adaptação genética às altas altitudes, há consenso de que muito ainda precisa ser descoberto sobre genes e rotas envolvidas nesse fenômeno. Além disso, é imprescindível a necessidade de identificar as consequências funcionais das variantes genéticas identificadas em estudos com genes candidatos ou com varredura genômica (GWAS). Em recente revisão, Moore (Moore, 2017) destaca a necessidade de maior interdisciplinaridade para que haja um efetivo avanço no que tange a metodologia dos estudos de GWAS. Além disso, estudos com o objetivo de desvendar os mecanismos bioquímicos, fisiológicos e moleculares por trás de eventuais variantes genéticas funcionais precisam ser desenvolvidos (Bigham *et al.*, 2014; Lorenzo *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2014).

Nesta tese, são apresentados, inicialmente, dados a partir de uma abordagem de genes candidatos (Jacovas *et al.*, 2015). Avaliando a diversidade dos cinco polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) localizados nos genes da via *TP53* (*TP53*, rs1042522; *MDM2*, rs2279744; *MDM4*, rs1563828; *USP7*, rs1529916; e *LIF*, rs929271) em 282 indivíduos Nativos Americanos oriundos de terras altas do Peru (Altiplano Andino,  $\geq 2.500\text{m}$ ) e terras baixas da América do Sul e Mesoamérica ( $<2.500\text{m}$ ) identificamos os alelos ancestrais *USP7-G*, *LIF-T* e *MDM2-T* com evidências de que foram evolutivamente cooptados para o sucesso da colonização humana dos Andes.

Nossos resultados sugerem que uma regulação adequada da via *TP53* esteja relacionada à adaptação de altas altitudes nas populações andinas, mostrando que uma interação alélica específica permite não apenas a sobrevivência, mas principalmente, o sucesso reprodutivo dessas populações em ambientes hostis (Jacovas *et al.*, 2015).

Partindo para uma abordagem exploratória mais ampla em um conjunto populacional mais extenso e heterogêneo, no artigo apresentado no capítulo 2 desta tese, realizamos a busca por regiões gênicas com sinal de seleção em populações do Altiplano Andino. Através de análises de dados de genomas (um total de 213.987 SNPs) de 322 Nativos Americanos oriundos de populações de terras altas (Altiplano Andino) e de terras baixas (Mesoamérica e Amazônia) nós identificamos cinco genes candidatos *TMEM38B* (*Transmembrane Protein 8B*), *AS3MT* (*Arsenite Methyltransferase*), *SP100* (*SP100 Nuclear Antigen*), *DUOX2* (*DualOxidase 2*) e *CLC* (*Charcot-Leyden Crystal Galectin*) que apresentavam sinal de seleção positiva em nativos dos Andes, Aymara e Quechua, sendo os três últimos (*SP100*, *DUOX2* e *CLC*) descritos pela primeira vez no nosso trabalho (Jacovas *et al.*, 2018). Estes genes estão envolvidos na rede de *TP53*, e estão relacionados a rotas fisiológicas importantes para a resposta à hipóxia em grandes altitudes, como aquelas ligadas às adaptações do músculo esquelético e cardíaco, aumento da angiogênese e funções imunes na interface feto-materna.

Por exemplo, a proteína Sp100, codificada pelo gene *SP100*, está envolvida na condensação da cromatina e regulação transcricional com efeito estimulador na expressão gênica dependente de p53. Nós identificamos três SNPs com forte sinal de seleção natural neste gene, baseado na análise de PBS (*Population Branch Specific*). PBS basicamente estima, a partir das distâncias genéticas (medidas por  $F_{ST}$ ) entre os três grupos populacionais considerados, se existe alelo(s) com frequência(s) extrema(s) no grupo andino em relação aos outros dois (Yi *et al.*, 2010). Além disso, de acordo com nossas previsões de expressão protéica *in silico*, um desses SNPs, rs13411586, causa uma expressão diferencial da proteína em humanos. Indivíduos homocigotos para o alelo selecionado (C) teriam sua produção Sp100 aumentada (Jacovas *et al.*, 2018). Pode-se facilmente observar que a diferença na frequência média desse alelo é surpreendentemente grande entre dos grupos populacionais: andinos (frequência do alelo C=40%), mesoamericanos (4.5%) e amazônicos (5%), os dois últimos caracterizados por habitarem terras baixas.

Interessantemente, o gene *SP100* é diferencialmente expresso nos músculos esqueléticos. Estudos revelaram que um membro da via do HIF, HIF-1 $\alpha$ , além de responder ao insulto promovido pela hipóxia, induzindo vários mecanismos de tolerância, como estabilização, angiogênese e autofagia (Zonneveld *et al.*, 2019), desempenha um

papel importante na regulação da homeostase do oxigênio, incluindo tanto adaptações fisiológicas do músculo esquelético quanto do músculo cardíaco, em situações de redução de oxigênio devido ao esforço muscular. A exposição a grandes altitudes leva à redução da massa e do desempenho muscular (por exemplo, menor capacidade de trabalho e fadiga permanente), exceto quando se está evolutivamente adaptado a ela (Jacovas *et al.*, 2018).

HIF-1 $\alpha$  protege a sobrevivência celular durante o baixo suprimento de oxigênio, enquanto p53 promove a morte celular sob hipóxia. A razão para esses papéis aparentemente antagônicos pode estar na diferença da quantidade de oxigênio disponível; em uma condição normal, os níveis de p53 e HIF-1 $\alpha$  são baixos, mas em hipóxia moderada, o nível de p53 permanece baixo, enquanto o nível de HIF-1 $\alpha$  aumenta, protegendo as células ainda relativamente saudáveis da destruição. Em hipóxia severa, o acúmulo de p53 promove a repressão ou degradação de proteínas anti-apoptóticas como o HIF-1 $\alpha$ , induzindo a apoptose das células sob estresse (Obacz *et al.*, 2013 e Zhou *et al.*, 2015). A proteína Sp100 é conhecida como moduladora da atividade da p53 e, sob hipóxia tecidual, isquemia, é regulada negativamente, levando à instabilidade genômica. Os andinos apresentam uma frequência relativamente alta do alelo C (rs13411586) que, em homozigose, aumentam a produção de Sp100 de acordo com o nosso teste de predição. Nosso resultado sugere então que houve uma solução evolutiva para manter Sp100 em um nível adequado em um ambiente com constante baixo nível de oxigênio (Jacovas *et al.*, 2018).

Além disso, é possível especular que existe um equilíbrio intrincado no nível de expressão dos genes *SP100*, *TP53* e *HIF-1 $\alpha$* . No entanto, os exatos mecanismos celulares e moleculares pelos quais se dão essa adaptação, e como ocorre esse balanço ainda precisa ser investigado. Levando em conta seu relevante papel na via de hipóxia, os genes *SP100*, *TP53* e *HIF-1 $\alpha$*  aparecem como ótimos alvos para estudo dos mecanismos moleculares e funcionais de resposta à hipóxia em populações nativas americanas que habitam há séculos as altas altitudes encontradas no Altiplano Andino.

Já o *DUOX2*, expresso em células epiteliais de vários tecidos participa da via do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que é necessária nas etapas finais da produção de hormônios tireoidianos. Ela também está envolvida formação das espécies reativas de oxigênio (ROS), um subproduto do metabolismo do oxigênio, mesmo sob condições fisiológicas normais. No entanto, diferentes condições estressoras podem aumentar a

produção de ROS, por exemplo, exposição a altas altitudes (hipóxia e altos índices de radiação ultravioleta) além de condições patológicas como o câncer. Salmeen e colaboradores forneceram evidências de que o DUOX2 desempenha um papel em um mecanismo de checkpoint dependente de p53 para a entrada no ciclo celular (Salmeen *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2012).

Adicionalmente, foi demonstrada que as espécies reativas de oxigênio desempenham um importante papel na angiogênese, o processo de formação de novos vasos sanguíneos. A angiogênese é um dos eventos principais na resposta à hipóxia (tolerância) e, portanto, pode ter um importante papel na adaptação à altitude dos nativos de terras altas, a fim de compensar uma plausível alteração na microcirculação (Ge *et al.*, 2011; Buroker *et al.*, 2012; Kim e Byzova *et al.*, 2015).

O *CLC* codifica uma galectina que é reconhecida como uma lisofosfolipase e expressa em eosinófilos e basófilos (Ackerman *et al.*, 2002). O único estudo funcional sobre essa proteína mostrou que em estado de hipóxia há o acúmulo de eosinófilos e de *CLC*, concomitante com um atraso na apoptose constitutiva, antagonizando o efeito pró-apoptótico normal de agentes que normalmente induzem a apoptose de eosinófilos (Porter *et al.*, 2017). Ainda, a expressão alterada de genes da família das galectinas, incluindo *CLC*, foi implicada na emergência e progressão do câncer, destacando o papel das galectinas na proliferação celular através de programas de morte celular (Than *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2018). Estudo avaliando parálogos da galectina em placenta ovina, mostraram que galectina-1 preveniu processos inflamatórios que prejudicam o feto, enquanto galectina-13, que tem a maior homologia à *CLC*, é um membro do grupo das chamadas "proteínas relacionadas à gravidez", devido às suas funções imunes especiais na interface feto-materna. Essas funções celulares fundamentais, já descritas para humanos e outros mamíferos placentários, podem indicar o caminho que conecta nossos achados de *CLC* e a pressão de seleção no clima hostil andino (Iglesias *et al.*, 1998).

No entanto, mais estudos são necessários para confirmar o papel desses genes e variantes na adaptação às altas altitudes e o impacto funcional dessas na rede de *TP53*. Com este objetivo, ainda no ano de 2018, propomos um projeto intitulado "Caracterização dos Mecanismos Moleculares de Variante Envolvida na Adaptação à Vida em Altitude nos Andes". Neste projeto, em parceria com a Profa. Úrsula Matte, propomos a investigação e o impacto da variante encontrada com maior sinal de seleção (Jacovas *et al.*, 2018) -

rs13411586 no gene *SP100* - e desvendar as implicações funcionais em níveis transcricionais e traducionais na expressão de Sp100, p53 e HIF-1 $\alpha$  *in vitro*, em condições de hipóxia, a fim de elucidar e compreender os seus mecanismos moleculares subjacentes. No momento, estratégias para o desenvolvimento dos experimentos estão sendo estabelecidas.

Outra molécula que nos despertou interesse de estudo no contexto de adaptações genéticas à vida em altas altitudes foi o HLA-G. Conforme apresentado inicialmente no Capítulo 1. tópico 1.5. desta tese, o HLA-G desempenha, reconhecidamente, um papel de suma importância na gestação humana (Nagamatsu *et al.*,2004). Além disso, já foi descrito níveis plasmáticos alterados de HLA-G em alpinistas do Monte Everest, sugerindo um papel desta molécula na adaptação a altas altitudes (Bourguignon *et al.*,2010), pelo menos num contexto de curto-tempo e com reversibilidade. Vários autores tem também indicado seu papel no câncer (Garziera *et al.*, 2017). Em comum, esses microambientes seja normal (gestação) ou patológico (câncer), bem como o aqui chamado “macro-ambiente” de altas altitudes, tem a hipóxia. Uma cascata de mecanismos de tolerância a hipoxia (angiogênese, por exemplo) tem sido descritos, dentro os quais vários desencadeados por HLA-G.

Assim, sequenciamos a região regulatória 3'UTR do *HLA-G* de 301 Nativos Americanos, divididos em populações localizadas em altas altitudes (>2.500m) e terras baixas (<2.500m). Um total de 11 haplótipos foram observados, sendo que nenhum haplótipo novo foi descrito. Destes, encontramos três (UTR-8. -18 e -30) exclusivos em indivíduos de terras altas e outros três (UTR-9. -13 e -21) exclusivamente encontrados em terras baixas. Com relação à estruturação populacional, interessante observamos que a variância observada entre os grupos ( $F_{CT}$ ) é marcadamente maior (11%) para o UTR-5, um haplotipo ancestral e ligado a baixa produção de HLA-G, indicando uma notável e significativa diferença entre as distribuições haplotípicas de UTR-5 entre populações de terras altas e baixas. Análises adicionais nos mostraram correlação estatística entre UTR-2 com diversas variáveis climáticas, demonstrando que este haplótipo pode estar relacionado à proteção contra o ambiente hostil das altas altitudes. A presença alta de UTR-5 nas terras baixas precisa ser ainda melhor investigada. Vimos ainda que uma parte importante dos polimorfismos na região promotora do HLA-G estão também presentes em neandertais e no espécime de Denisova. Esse resultado indica que estes são polimorfismos ancestrais

(trans-SNPs), mantidos a milhares de anos, possivelmente por seleção balanceadora, não obstante não termos conseguido sinal desse fenômeno com o teste aqui empregado.

Tendo em vista os aspectos associados às adaptações genéticas para a vida nas altas altitudes do Altiplano Andino, nossos dados corroboram a ideia de que não há somente uma única resposta adaptativa ao estresse devido às altas altitudes. Apesar disto, sugerimos aqui que combinações alélicas que promovem uma regulação adequada da via *TP53* (vários genes), bem como de *HLAG-G*, desencadeiem cascatas de eventos e sinalizações relacionadas à adaptação (sobrevivência e reprodução) às altas altitudes, pelo menos nas populações andinas (Jacovas et al., 2015, 2018 e capítulo V da presente tese). Algumas dessas variantes, inclusive, são antigas, possivelmente presente em espécies de hominínios ancestrais dos *Homo sapiens* e arcaicos (neandertal e Denisova), sendo mantidas por seleção balanceadora até os dias atuais, pelo menos nos humanos modernos.

Interessantemente em Jacovas et al. (2015), referimos relatórios do governo peruano que mostra que a taxa de complicações gestacionais e pós-parto no povo andino Aymara chega a ser 5 vezes menor do que a média nacional. No entanto, estes também teriam mais susceptibilidade a uma doença comum nos dias atuais, o câncer (Volskarides et al. 2018). Baseado nessas informações e nos achados da presente tese, uma hipótese pode ser sugerida: um repertório genético complexo, envolvendo uma delicada combinação de antigos e derivados alelos tem permitido a tolerância a hipóxia em nível macro ambiental (alta altitude) e microambiental normal (placenta e outras condições correlacionadas à gestação). Como resultado, os andinos estão bem adaptados a uma longa vida em altas altitudes. Por outro lado, esse mesmo repertório genético pode ser desfavorável a esses indivíduos nos dias atuais, considerando um contexto microambiental patológico específico, uma vez que fornece ferramentas para a célula cancerígena, normalmente sob hipóxia, sobreviver e se multiplicar. Vale ressaltar que, mesmo considerando um sistema de reparo supostamente mais eficiente nos indivíduos que vivem em terras altas, necessário para evitar muitos danos ao DNA e as células devido à alta incidência de UV e temperaturas frias, este é relativamente ineficiente para controlar a incidência de câncer, também associada a muitas mutações tumorais somáticas, subsequentes à mutação de origem (Petljak et al., 2019). Isso faz sentido, considerando que a grande maioria dos casos de câncer humano surge após o período reprodutivo, tornando essa doença, como a conhecemos hoje, irrelevante em um contexto evolutivo.



No entanto, vale destacar que os exatos mecanismos sejam eles moleculares, celulares ou fisiológicos envolvidos nessa tipo de adaptação ainda merecem ser melhor investigados. Assim, estudos funcionais são chaves para corroborar ou descartar as hipóteses aqui sugeridas. Nossos próximos passos serão neste sentido.

## 6.2 Referências bibliográficas

Ackerman SJ, Liu L, Kwatia MA, Savage MP, Leonidas DD, Swaminathan GJ, Acharya KR (2002) Charcot-Leyden crystal protein (galectin-10) is not a dual function galectin with lysophospholipase activity but binds a lysophospholipase inhibitor in a novel structural fashion. *J Biol Chem* 277:14859-14868.

Ashur-Fabian O, Avivi A, Trakhtenbrot L, Adamsky K, Cohen M, Kajakaro G, Joel A, Amariglio N, Nevo E, Rechavi G (2004) Evolution of p53 in hypoxia-stressed *Spalax* mimics human tumor mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 10133:12236-12241.

Bigham AW, Julian CG, Wilson MJ, Vargas E, Browne VA, Shriver MD, Moore LG (2014) Maternal PRKAA1 and EDNRA genotypes are associated with birth weight. and PRKAA1 with uterine artery diameter and metabolic homeostasis at high altitude. *Physiol Genomics* 46:687-697.

Bourguignon M, Yaghi L, Flajollet S, Radanne-Krawice I, Rouas-Freiss N, Lugin D, Richalet JP, Carosella ED, Moreau P (2010) Increased soluble human leukocyte antigen-G levels in peripheral blood from climbers on Mount Everest. *Hum Immunol* 71: 1105-1108.

Buroker NE, Ning XH, Zhou ZN, Li K, Cen WJ, Wu XF, Zhu WZ, Scott CR, Chen SH (2012) AKT3, ANGPTL4, eNOS3, and VEGFA associations with high altitude sickness in Han and Tibetan Chinese at the Qinghai-Tibetan Plateau. *Int J Hematol* 96:200-213.

Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC 3rd, George DL, Murphy M (2003) The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 33:357-365.

Garziera M, Scarabel L, Toffoli G. Hypoxic Modulation of HLA-G Expression through the Metabolic Sensor HIF-1 in Human Cancer Cells (2017) *J Immunol Res* 4587520.

Ge RL, Mo VY, Januzzi JL, Jin G, Yang Y, Han S, Wood MJ, Levine BD (2011) B-type natriuretic peptide, vascular endothelial growth factor, endothelin-1, and nitric oxide synthase in chronic mountain sickness. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300:H1427-1433.

Gupta SC, Hevia D, Patchva S, Park B, Koh W, Aggarwal BB (2012) Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention. and therapy. *Antioxid Redox Signal* 16:1295-1322.

Iglesias MM, Rabinovich GA, Ivanovic V, Sotomayor C, Wolfenstein-Todel C (1998) Galectin-1 from ovine placenta, Amino-acid sequence, physicochemical properties and implications in T-cell death. *Eur J Biochem* 252: 400-407.

Jacovas VC, Couto-Silva CM, Nunes K, Lemes RB, de Oliveira MZ, Salzano FM, Bortolini MC, Hünemeier T (2018) Selection scan reveals three new loci related to high altitude adaptation in Native Andeans. *Sci Rep* 8:12733.

Jacovas VC, Rovaris DL, Pérez O, de Azevedo S, Macedo GS, Sandoval JR, Salazar-Granara A, Villena M, Dugoujon JM, Bisso-Machado R *et al.*, (2015) Genetic

Variations in the TP53 Pathway in Native Americans Strongly Suggest Adaptation to the High Altitudes of the Andes. PLoS One 10:e0137823

Kim MJ, Ryu JC, Kwon Y, Lee S, Bae YS, Yoon JH, Ryu JH (2014) Dual oxidase 2 in lung epithelia is essential for hyperoxia-induced acute lung injury in mice. *Antioxid Redox Signal* 21:1803-1818.

Kim Y and Byzova TV (2015) Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood* 123:625–632.

Lorenzo FR, Huff C, Myllymäki M, Olenchock B, Swierczek S, Tashi T, Gordeuk V, Wuren, Ri-Li G, McClain DA *et al.*, (2014) A genetic mechanism for Tibetan high-altitude adaptation. *Nat Genet* 46:951–956.

Moore LG (2017) Human Genetic Adaptation to High Altitudes: Current Status and Future Prospects. *Quat Int* 461:4-13.

Nagamatsu T, Fujii T, Yamashita T, Miki A, Kanai T, Kusumi M, Osuga Y, Kozuma S, Taketani Y (2004) Hypoxia does not reduce HLA-G expression on extravillous cytotrophoblasts. *J Reprod Immunol* 63:85–95.

Obacz J, Pastorekova S, Vojtesek B and Hrstka R (2013) Cross-talk between HIF and p53 as mediators of molecular responses to physiological and genotoxic stresses. *Mol Cancer* 12:93.

Petljak M, Alexandrov LB, Brammeld JS, et al (2019) Characterizing Mutational Signatures in Human Cancer Cell Lines Reveals Episodic APOBEC Mutagenesis. *Cell*. 176:1282-1294.e20.

Porter LM, Cowburn AS, Farahi N, Deighton J, Farrow SN, Fiddler CA, Juss JK, Condliffe AM, Chilvers ER (2017) Hypoxia causes IL-8 secretion, Charcot Leyden crystal formation, and suppression of corticosteroid-induced apoptosis in human eosinophils. *Clin Exp Allergy* 47:770-784.

Salmeen A, Park BO and Meyer T (2010) The NADPH oxidases NOX4 and DUOX2 regulate cell cycle entry via a p53-dependent pathway. *Oncogene* 29:4473-4484.

Song D, Li LS, Arsenault PR, Tan Q, Bigham AW, Heaton-Johnson KJ, Master SR, Lee FS (2014) Defective Tibetan PHD2 binding to p23 links high altitude adaption to altered oxygen sensing. *The Journal of biological chemistry* 289:14656-14665.

Su J, Wang Y, Si Y, Gao J, Song C, Cui L, Wu R, Tai G, Zhou Y (2018) Galectin-13, a different prototype galectin. does not bind  $\beta$ -galactosides and forms dimers via intermolecular disulfide bridges between Cys-136 and Cys-138. *Sci Rep* 8:980.

Than NG, Pick E, Bellyei S, Szigeti A, Burger O, Berente Z, Janaky T, Boronkai A, Kliman H, Meiri H *et al.*, (2004) Functional analyses of placental protein 13/galectin-13. *Eur J Biochem* 271:1065-1078.

Vannotti A (1946) The adaptation of the cell to effort. altitude and to pathological oxygen deficiency. *Schweiz Med Wochenschr* 76:899-903.

Voskarides K (2018) Combination of 247 Genome-Wide Association Studies Reveals High Cancer Risk as a Result of Evolutionary Adaptation. *Mol Biol Evol* 35:473-485.

Yi X, Liang Y, Huerta-Sanchez E, Jin X, Cuo ZX, Pool JE, Xu X, Jiang H, Vinckenbosch N, Korneliussen TS *et al.*, (2010) Sequencing of 50 human exomes reveals adaptation to high altitude. *Science* 329:75-78.

Zhao Y, Ren JL, Wang MY, Zhang ST, Liu Y, Li M, Cao YB, Zu HY, Chen XC, Wu CI., *et al.*, 2013. Codon 104 variation of p53 gene provides adaptive apoptotic responses to extreme environments in mammals of the Tibet plateau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 11051:20639-20644.

Zhou CH, Zhang XP, Liu F and Wang W (2015) Modeling the interplay between the HIF-1 and p53 pathways in hypoxia. *Sci Rep* 5:13834.

**Internet resources section**

[http://www.dge.gob.pe/publicaciones/pub\\_asis/asis26.pdf](http://www.dge.gob.pe/publicaciones/pub_asis/asis26.pdf), p. 165;

<http://www.dge.gob.pe/portal/docs/intsan/asis2012.pdf>, p. 76;

### 6.3 ANEXOS

#### 6.4 Outras publicações científicas

##### 6.4.1 *Novel genetic associations and gene-gene interactions of chemokine receptor and chemokine genetic polymorphisms in HIV/AIDS*

Publicado como: Valverde-Villegas JM, de Medeiros RM, de Andrade KP, **Jacovas VC**, Dos Santos BR, Simon D, de Matos Almeida SE, Chies JAB. Novel genetic associations and gene-gene interactions of chemokine receptor and chemokine genetic polymorphisms in HIV/AIDS. AIDS. 2017 Jun 1;31(9):1235-1243. doi: 10.1097/QAD.0000000000001491. PubMed PMID: 28358741.

#### **Abstract:**

Objective: To investigate the influence of candidate polymorphisms on chemokine receptor/ligand genes on HIV infection and AIDS progression (HIV/AIDS). Design: Fifteen polymorphisms of the CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR8, CXCR3, CXCR6, CCL20, CCL22 and CXCL10 genes were analysed in 206 HIV-positive patients classified as rapid progressors (n=40), or nonrapid progressors (n=166), and in 294 HIV-seronegative patients. Methods: The polymorphisms were genotyped using minisequencing. Genetic models were tested using binomial logistic regression; nonparametric multifactor dimensionality reduction (MDR) was used to detect gene-gene interactions. Results: The CCR3 rs3091250 [TT. adjusted odds ratio (AOR): 2.147, 95% confidence interval (CI) 1.076-4.287, P=0.030], CCR8 rs2853699 (GC/CC. AOR: 1.577. 95% CI 1.049-2.371. P=0.029). CXCL10 rs56061981 (CT/TT. AOR: 1.819. 95% CI 1.074-3.081. P=0.026) and CCL22 rs4359426 (CA/AA. AOR: 1.887. 95% CI 1.021-3.487. P=0.043) polymorphisms were associated with susceptibility to HIV infection. The CCL20 rs13034664 (CC. OR: 0.214. 95% CI 0.063-0.730. P=0.014) and CCL22 rs4359426 (CA/AA. OR: 2.685. 95% CI 1.128-6.392. P=0.026) variants were associated with rapid progression to AIDS. In MDR analyses revealed that the CXCL10 rs56061981 and CCL22 rs4359426 combination was the best model. with 57% accuracy (P=0.008) for predicting susceptibility to HIV infection. Conclusion: Our results provide new insights into the influence of candidate chemokine receptor/ligand polymorphisms and significant evidence for gene-gene interactions on HIV/AIDS susceptibility.

#### **6.4.2 *A tale of agriculturalists and hunter-gatherers: Exploring the thrifty genotype hypothesis in native South Americans***

Publicado como: Reales G, Rovaris DL, **Jacovas VC**, Hünemeier T, Sandoval JR, Salazar-Granara A, Demarchi DA, Tarazona-Santos E, Felkl AB, Serafini MA, Salzano FM, Bisso-Machado R, Comas D, Paixão-Côrtes VR, Bortolini MC. A tale of agriculturalists and hunter-gatherers: Exploring the thrifty genotype hypothesis in native South Americans. *Am J Phys Anthropol.* 2017 Jul;163(3):591-601. doi: 10.1002/ajpa.23233. Epub 2017 May 2. PubMed PMID: 28464262.

#### **Abstract:**

**Objectives:** To determine genetic differences between agriculturalist and hunter-gatherer southern Native American populations for selected metabolism-related markers and to test whether Neel's thrifty genotype hypothesis (TGH) could explain the genetic patterns observed in these populations. **Materials and Methods:** 375 Native South American individuals from 17 populations were genotyped using six markers (APOE rs429358 and rs7412; APOA2 rs5082; CD36 rs3211883; TCF7L2 rs11196205; and IGF2BP2 rs11705701). Additionally, APOE genotypes from 39 individuals were obtained from the literature, AMOVA, main effects, and gene-gene interaction tests were performed. **Results:** We observed differences in allele distribution patterns between agriculturalists and hunter-gatherers for some markers. For instance, between-groups component of genetic variance (FCT) for APOE rs429358 showed strong differences in allelic distributions between hunter-gatherers and agriculturalists ( $p=0.00196$ ). Gene-gene interaction analysis indicated that the APOE E4/CD36 TT and APOE E4/IGF2BP2 A carrier combinations occur at a higher frequency in hunter-gatherers. but this combination is not replicated in archaic (Neanderthal and Denisovan) and ancient (Anzick, Saqqaq, Ust-Ishim, Mal'ta) hunter-gatherer individuals. **Discussion:** A complex scenario explains the observed frequencies of the tested markers in hunter-gatherers. Different factors, such as pleiotropic alleles, rainforest selective pressures, and population dynamics, may be collectively shaping the observed genetic patterns. We conclude that although TGH seems a plausible hypothesis to explain part of the data, other factors may be important in our tested populations.

### **6.4.3 *Melanoma Research: Skin Pigmentation Polymorphisms Associated with Increased Risk of Melanoma in Individuals from Southern Brazil***

Artigo submetido à revista científica *Melanoma Research*. Autores: Larissa Brussa Reis, Renato Marchiori Bakos, Fernanda Sales Luiz Vianna, Gabriel de Souza Macedo, **Vanessa Cristina Jacovas**, André Santos, Sidney Santos, Lúcio Bakos, Patricia Ashton- Prolla.

#### **Abstract:**

Melanoma is the most aggressive type of skin cancer, associated with several environmental and genetic risk factors, and it originates in melanocytes, the pigment-producing skin cells. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in pigmentation genes have been described in melanoma risk modulation but our knowledge in the field is still limited. This investigation was based on the effect of SNPs in four pigmentation genes – TYR (rs1126809), HERC2 (rs1129038), SLC24A5 (rs1426654), and SLC45A2 (rs16891982) on risk for melanoma using a multivariate logistic regression and a Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) analysis. in a case-control approach with individuals from Southern Brazil. with and without population substructure. Our results show three of the four SNPs studied was associated, two in dominant model: HERC2 rs1129038AA or a SCL24A5 rs1426654AA increased the risk of melanoma [OR= 2.094 (95% CI: 1.106 - 3.966). P= 2.3x10<sup>-2</sup>], and [OR= 7.126 (95% CI: 1.873 – 27.110). P= 4x10<sup>-3</sup>], respectively, and the SLC45A2 rs16891982 in an additive model with protection for melanoma twice higher when two allele C is inherited [OR= 0.081 (95% CI: 0.008 – 0.782). P= 3x10<sup>-2</sup>]. In addition, the MDR analyze found that the combination of rs1426654 AA and rs16891982 GG genotypes is associated with higher risk for melanoma (P=3x10<sup>-3</sup>). These results contribute to the current knowledge indicating that SNPs in pigmentation genes can reflect the risk of melanoma.