UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

NADIA CAROLINA DE AGUIAR FRACASSO

DIVERSIDADE DO GENE SLC45A2 NA POPULAÇÃO URBANA BRASILEIRA: ASSOCIAÇÕES ENTRE SNPs E FENÓTIPOS DA PIGMENTAÇÃO

Ribeirão Preto
2014

NADIA CAROLINA DE AGUIAR FRACASSO

DIVERSIDADE DO GENE SLC45A2 NA POPULAÇÃO URBANA BRASILEIRA: ASSOCIAÇÕES ENTRE SNPs E FENÓTIPOS DA PIGMENTAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração:
Genética

Orientador:
Prof. Dr. Celso Teixeira Mendes Junior

Ribeirão Preto
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Fracasso, Nadia Carolina de Aguiar.
Diversidade do gene SLC45A2 na população brasileira: associação entre SNPs e fenótipos da pigmentação / Nádia Carolina de Aguiar Fracasso. Ribeirão Preto, 2014.
97 f. : il. 22; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo. Área de concentração: Genética.
Orientador: Mendes-Junior, Celso Teixeira.

1. SLC45A2, 2. Haplótipos, 3. SNPs, 4. Pigmentação, 5. População brasileira

FICHA DE APROVAÇÃO

Nome: FRACASSO, Nadia Carolina de Aguiar

Título: Diversidade do gene SLC45A2 na população urbana brasileira: associações entre SNPs e fenótipos da pigmentação

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Genética.

Aprovado em: ___ / ___ / ___

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof. Dr. _____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof. Dr. _____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Dedico esta dissertação aos meus pais José Francisco e Enide, aos meus irmãos Maria Paula e Gustavo, aos meus sobrinhos Theo e Lucas, a minha família maravilhosa e aos meus amigos. Obrigada pelo amor, apoio e por sempre acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, pelo apoio moral e financeiro, por aguentar meu mau humor nas horas difíceis, pelo amor e paciência. Obrigada por estar sempre ao meu lado.

A minha mãe, que me tornou um ser humano melhor com seus bons exemplos e que me faz refletir todos os dias sobre as coisas mais importantes na vida. Obrigada por sempre olhar por mim, sei que nos encontraremos de novo.

A minha irmã, por compartilhar sua sabedoria, pelo incentivo, por sempre acreditar em mim e por ter me presenteado com sobrinhos tão maravilhosos.

Ao meu irmão, por se tornar um exemplo para mim de que as pessoas sempre podem ser melhores. Você é meu orgulho!

Ao Prof. Dr. Celso Teixeira Mendes Júnior, pela orientação neste trabalho, por acreditar na minha capacidade, pelos inúmeros incentivos e estímulos, pela compreensão, paciência, atenção e boa vontade.

Aos meus familiares pelo amor, carinho, estímulo e pelas infinitas horas de alegria que passamos juntos.

Ao Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões por me acolher em seu laboratório e por todo conhecimento compartilhado.

As amigas Marcela (Marida) e Sabrina, por compartilharem o conhecimento, pelos ensinamentos, conselhos, paciência, conversas, diversão, jogatinas e, principalmente, pela ajuda nos momentos finais dessa dissertação.

Aos amigos da genética: Edna, Maria, Ana, Natália, Fernanda, Ayling, Flávia (japa), Leonardo Barcelos, Rosana, pela amizade, companheirismo, ajuda e excelente ambiente de trabalho. Obrigada pelo auxílio que me ofereceram, laboratorial ou por meio de proveitosas conversas (acadêmicas e pessoais).

Além do companheirismo e amizade, agradeço a Cláudia Wiezel, Edilene, Cláudia Caixeta, Lídia, Mateus e Paulo pela ajuda nas genotipagens e ao Leonardo pela extração do DNA de nossas amostras.

As amigas araraquarenses (Giovanna, Mari, Bela, Flávia, Lívia e Chéu), amigas de faculdade (Veronica, Monica e Ludmila) e a amiga Vanessa por estarem sempre presentes mesmo longe, por dividirem anos e momentos incríveis comigo, pelo apoio e carinho sempre.

Aos professores membros da banca examinadora, pela disponibilidade para avaliar este trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Genética, pelos ensinamentos, paciência, e apoio.

Ao Prof. Dr. Rick Sturm, por me receber em seu laboratório na Universidade de Queensland (Australia), pela disposição em me ensinar e compartilhar conhecimento.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro recebido para o desenvolvimento do trabalho.

A todos os doadores voluntários, sem os quais essa pesquisa não poderia ser desenvolvida.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, MUITO OBRIGADA!

“Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito. Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver”.

Dalai Lama

RESUMO

FRACASSO, N. C. A. **Diversidade do gene SLC45A2 na população urbana brasileira: associações entre SNPs e fenótipos da pigmentação.** 2014. 97 páginas. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

O gene SLC45A2 codifica a proteína transportadora associada à membrana (MATP), que está envolvida na síntese da melanina através do transporte da tirosinase e/ou de prótons para dentro dos melanossomos. Uma vez que a determinação da cor dos olhos, dos cabelos e da pele de amostras encontradas em cenas de crime seria de grande valor em casos forenses, o presente estudo teve como objetivo investigar os polimorfismos do gene SLC45A2 e seus alelos, genótipos e haplótipos e suas associações com tais características da pigmentação em uma amostra miscigenada da população brasileira. Para atingir este objetivo, 12 SNPs do gene SLC45A2 foram avaliados em 296 indivíduos não aparentados na região de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, Brasil. O DNA foi extraído pelo método *salting-out* e os SNPs foram genotipados por PCR-RFLP ou PCR alelo-específica, seguido por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e corados com nitrato de prata. Para averiguar a existência de associações entre as frequências dos alelos, genótipos, haplótipos ou variantes proteicas e um determinado fenótipo o teste exato de Fisher foi aplicado com uso do programa GraphPad InStat 3.06. Os haplótipos para cada indivíduo foram inferidos por dois métodos computacionais independentes: PHASE and PL-EM. Alelos e genótipos de 8 SNPs apresentaram associações significativas com pelo menos uma das quarto características morfológicas consideradas (presença de sardas, cor dos olhos, cabelos e pele). Os alelos rs181832*T, rs2287949*G, rs250417*G e 374Phe (rs16891982) estavam associados com características claras da pigmentação, enquanto os alelos rs181832*C, rs2287949*A, rs250417*C e 374Leu se mostraram associados com características escuras. Considerando-se 270 indivíduos que tiveram seus haplótipos inferidos com sucesso, foram identificados 34 (18 novos) haplótipos diferentes. Este conjunto de haplótipos resulta na codificação de quatro variantes proteicas distintas, determinadas pelos SNPs rs26722, rs16891982 e rs3733808. O haplótipo hp9 foi o mais frequente (58,3%) e se mostrou associado com a presença de cabelos loiros, olhos azuis, pele clara e presença de sardas, e também com a ausência de olhos castanho escuros, cabelos pretos e pele escura. Em termos de proteínas distintas, a proteína A, codificada por dez haplótipos distintos, incluindo o hp9, foi a mais frequente (61,48%) e também se mostrou

associada com características claras da pigmentação, enquanto que a proteína B, codificada por doze haplótipos distintos foi a segunda mais frequente (24,28%) e se mostrou associada com características escuras da pigmentação. O presente estudo permitiu constatar associações significativas entre alelos/genótipos/haplótipos/proteínas com diferentes características de pigmentação e a variação nas frequências alélicas de alguns SNPs na presente amostra é consistente com a existência de mistura inter-étnica na população de Ribeirão Preto.

Palavras-chave: SLC45A2, SNPs, Haplótipos, Pigmentação, População brasileira.

ABSTRACT

FRACASSO, N. C. F. **SLC45A2 gene diversity in the Brazilian urban population: association between SNPs and pigmentation phenotypes.** 2014. 97 pages. Dissertation (Master's Degree) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

The SLC45A2 gene encodes the Membrane-Associated Transporter Protein (MATP), which mediates melanin synthesis by tyrosinase trafficking and/or proton transportation to melanosomes. Since the determination of eye, hair and skin pigmentation of unknown samples found in crime scenes would be of great value for forensic caseworks, the present study aimed to further investigate the polymorphisms of the SLC45A2 gene and the association of their alleles, genotypes or haplotypes with such pigmentation traits in an admixed Brazilian population sample. To achieve this goal, 12 SLC45A2 SNPs were evaluated in 296 unrelated individuals from the Ribeirão Preto area, São Paulo State, Brazil. DNA was extracted by *salting-out* and SNPs were genotyped by PCR-RFLP or Allele-Specific PCR, followed by 10% Polyacrylamide Gel Electrophoresis colored by silver staining. To investigate the associations between the frequencies of alleles, genotypes, haplotypes or protein variants and a given phenotype the Fisher exact test was applied by means of the GraphPad InStat 3.06 program. Haplotypes of each individual were inferred by two independent computational methods: PHASE and PL-EM. Alleles and genotypes from 8 SNPs presented statistically significant associations with at least one of the four considered morphological features (presence of freckles and eye, hair and skin pigmentation). Alleles rs181832*T, rs2287949*G, rs250417*G and 374Phe (rs16891982) were observed in association with fair pigmentation features, while alleles rs181832*C, rs2287949*A, rs250417*C and 374Leu are associated with dark pigmentation. Considering the 270 individuals with successful haplotype inferences, 34 different (18 new) haplotypes were identified. This set of haplotypes encodes four distinct protein variants, determined by SNPs rs26722, rs3733808 and rs16891982. The hp9 haplotype was the most frequent (58.3%) and was associated with the presence of blond hair, blue eyes, fair skin and presence of freckles, and with the absence of dark brown eyes, black hair and dark skin. In terms of distinct proteins, the protein A encoded by ten distinct haplotypes, including hp9, was the most common (61.48%) and was also associated with light pigmentation characteristics, while protein B encoded by 12 distinct haplotypes, was the second most common (24,28%) and was

associated with dark pigmentation characteristics. This work has found significant associations between alleles/genotypes/haplotypes/proteins with different pigmentation characteristics and variation in allele frequencies of some SNPs in this sample is consistent with the existence of inter-ethnic admixture of the population of Ribeirão Preto.

Keywords: SLC45A2, SNPs, Haplotypes, Pigmentation, Brazilian population.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Esquema da estrutura da pele humana: tipos de pigmentação clara e escura. De cima para baixo: UV = radiação ultravioleta; SC = estrato córneo; G = estrato granuloso; S = estrato espinhoso; B = estrato basal; BM = membrana basal; D = derme. Tipos celulares: K = queratinócitos; M = melanócitos; F = fibroblastos; grânulos ovais = melanossomos contendo melanina (Yamaguchi, et al. 2007) _____ 22

FIGURA 2. Modelo dos quatro estágios de maturação do melanossomo juntamente com as principais proteínas necessárias em cada passo (Sturm, 2006)_____23

FIGURA 3. Esquema da melanogênese. (A) o hormônio estimulante do a-melanócito (a-MSH) se liga ao gene MC1R, desencadeando um aumento de adenosina monofosfato cíclica (cAMP) intracelular e ativação do fator de transcrição da microftalmia (MITF). Este ativa a tirosinase (TYR), que age na conversão da tirosina formando dopaquinona e, desde que esteja presente no meio, ocorre a adição de cisteína. O produto desta reação é oxidado formando a feomelanina. Se os níveis de cAMP são limitados, esta forma de melanina é favorecida e os feomelanossomos são formados e transportados para os queratinócitos adjacentes. (B) O MITF também estimula a produção da proteína relacionada a tirosina 1 (TYRP1) e a dopacromo tautomerase (DCT), que em condições ideais (dentre elas, a ausência de cisteína), produzem eumelanina. Em tais condições, as proteínas Pmel17, MATP, P e SLC24A5 favorecem a produção de eumelanina e a consequente maturação dos eumelanossomos (Tully, 2007)_____ 24

FIGURA 4. Localização cromossômica do gene SLC45A2 (Genetics Home Reference, 2007)_____27

FIGURA 5. Diagrama esquemático do gene SLC45A2, mostrando a localização dos 7 exons e dos 12 SNPs estudados. A seta abaixo do nome do gene indica a direção da transcrição (Baseada em Yuasa, et al. 2006)_____ 42

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - SNPs do gene SLC45A2 analisados e suas respectivas regiões e mutações__ 43

TABELA 2 - Reagentes e concentrações utilizados no preparo da mistura para amplificação dos segmentos contendo os 12 SNPs_____ 44

TABELA 3 - Descrição dos primers utilizados para amplificação por PCR_____ 45

TABELA 4 - Reagentes e concentrações utilizados nas reações de restrição dos 11 SNPs_ 47

TABELA 5 - Enzimas de restrição e tamanhos dos fragmentos gerados para genotipagem dos 11 SNPs analisados por PCR-RFLP_____ 47

TABELA 6 - Descrição da população amostral composta por 288 indivíduos_____ 53

TABELA 7 - Frequências alélicas distribuídas na amostra total e nos grupos classificados pela cor dos cabelos_____ 54

TABELA 8 - Frequências alélicas distribuídas em grupos classificados pela cor dos olhos_ 56

TABELA 9 - Frequências alélicas distribuídas em grupos classificados pela cor da pele e pela presença ou ausência de sardas_____ 58

TABELA 10 - Probabilidade do teste de razão de verossimilhança para avaliação de desequilíbrio de ligação entre os pares de loci polimórficos detectados no gene SLC45A2. Os valores significativos ($p < 0,05$) estão destacados em negrito. O desvio padrão foi menor do que 0,005 para todos os pares analisados_____ 60

TABELA 11 - Sequência de DNA dos 34 haplótipos gerados (hp1 a hp50) a partir dos 12 loci analisados. A identificação dos SNPs é a mesma apresentada na Tabela 1. Os SNPs rs26722 (6), rs16891982 (9) e rs3733808 (12) geram mutações não-sinônimas, resultando em proteínas distintas. O locus rs3733808 (12) não apresentou variação_____ 62

TABELA 12 - Diversidade haplotípica e frequências dos 34 haplótipos e 4 proteínas inferidas na amostra total e nos grupos classificados pela cor dos cabelos_____ 63

TABELA 13 - Diversidade haplotípica e frequências dos 34 haplótipos e 4 proteínas inferidas nos grupos classificados pela cor dos olhos_____ 64

TABELA 14 - Diversidade haplotípica e frequências dos 34 haplótipos e 4 proteínas inferidas nos grupos classificados pela cor da pele e pela presença ou ausência de sardas_____ 65

TABELA 15 - Pares de SNPs analisados (SNP1 e SNP2), seus respectivos alelos em desequilíbrio de ligação, valores de D', r^2, χ^2 e p_____ 66

TABELA 16 - Alelos e genótipos dos SNPs do gene SLC45A2 associados com as características fenotípicas avaliadas. Com o objetivo de simplificar a tabela, somente as associações significativas e com valores de OR maiores que 1 estão relacionadas_____ 68

TABELA 17 - Haplótipos e proteínas do gene SLC45A2 associados com as características fenotípicas avaliadas. Com o objetivo de simplificar a tabela, somente as associações significativas e com valores de OR maiores que 1 estão relacionadas_____72

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 17
1.1 IDENTIFICAÇÃO HUMANA NA PRATICA FORENSE 17
1.2 BIOLOGIA DA PIGMENTAÇÃO 21
1.3 GENÉTICA DA PIGMENTAÇÃO 25
1.3.1 O GENE SLC45A2 E A PIGMENTAÇÃO HUMANA 26
1.4 POPULAÇÃO BRASILEIRA 30
2. JUSTIFICATIVA 34
3. HIPÓTESE 36
4. OBJETIVOS 38
4.1 OBJETIVO GERAL 38
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 38
5. MATERIAL E MÉTODOS 40
5.1 AMOSTRA POPULACIONAL 40
5.2 DETERMINAÇÃO FENOTÍPICA DOS INDIVÍDUOS 40
5.3 ANÁLISE LABORATORIAL 41
5.3.1 EXTRAÇÃO DE DNA 41
5.3.2 AMPLIFICAÇÃO POR PCR DOS 12 POLIMORFISMOS DO GENE SLC45A2 42
5.3.3 REAÇÃO DE RESTRIÇÃO ENVOLVENDO 11 POLIMORFISMOS DO GENE SLC45A2 46
5.3.4 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA PARA GENOTIPAGEM DOS 12 POLIMORFISMOS 48
5.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS 49
5.4.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, HETEROZIGOSE E EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG 49
5.4.2 DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO E INFERÊNCIA COMPUTACIONAL DE HAPLÓTIPOS 49
5.4.3 ASSOCIAÇÕES DE FENÓTIPOS AOS GENÓTIPOS 51
6. RESULTADOS 53
6.1 AMOSTRA POPULACIONAL 53
6.2 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, HETEROZIGOSE E EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG 54
6.3 DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO E INFERÊNCIA COMPUTACIONAL DE HAPLÓTIPOS 59
6.4 ASSOCIAÇÕES ENCONTRADAS 67
7. DISCUSSÃO 75
7.1 ASPECTOS POPULACIONAIS 75
7.2 ASSOCIAÇÕES ENCONTRADAS 79
8. CONCLUSÕES 85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 86
ANEXOS 93

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 IDENTIFICAÇÃO HUMANA NA PRATICA FORENSE

A análise genética é um meio poderoso de estabelecer uma identidade em casos criminais quando vestígios biológicos são encontrados na cena do crime, na identificação de vítimas de desastres em massa e de pessoas desaparecidas e/ou estabelecer uma relação de vínculo biológico em casos de teste de paternidade. Evidências genéticas podem ser derivadas de qualquer material biológico: sangue, sêmen, ossos, cabelos, dentes, saliva, entre outros tecidos e fluidos e também podem ser usadas para caracterização de animais, plantas e microrganismos. O repertório de marcadores genéticos usados para caracterização de materiais biológicos evoluiu substancialmente no campo forense e cada marcador isolado ou em associação a outros contribuiu para o aumento da capacidade de resolução e da sensibilidade de detecção dos métodos (BUDOWLE; VAN DAAL, 2008).

O perfil de DNA, como é conhecido hoje, foi descrito pela primeira vez em 1985 por Alec Jeffreys e causou um enorme impacto na genética forense (CARRACEDO, 2005). Jeffreys e colaboradores encontraram, em um dos íntrons do gene codificador da proteína mioglobina, regiões do DNA que variavam de um indivíduo para o outro, produzindo perfis genéticos que foram denominados “impressão digital do DNA” ou “DNA *fingerprinting*” (JEFFREYS; WILSON; THEIN, 1985). Este método conta com o uso de VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*) e sua análise consiste em uma poderosa ferramenta, mas sofre sérias limitações: é necessária uma quantidade relativamente grande de DNA, não é útil quando o DNA se encontra degradado, as comparações entre laboratórios são difíceis e a análise consome muito tempo (GOODWIN; LINACRE; HADI, 2007). Em consequência disso, são hoje, os STRs (*Short Tandem Repeats*), os elementos de rotina nas investigações forenses, identificação de esqueletos e de vítimas de desastres, apresentando-se como ferramentas bastante informativas para a identificação molecular dos indivíduos por meio da obtenção de perfis de DNA (FBI, 2010). Eles satisfazem todos os requisitos de um marcador forense: são resistentes, permitindo sucesso em análises de uma grande variedade de material biológico; os resultados gerados em diferentes laboratórios podem ser facilmente comparados; são altamente discriminatórios, especialmente quando grande número de *loci* é analisado simultaneamente; são obtidos pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a qual é muito sensível, requerendo apenas algumas células para uma análise bem sucedida; seus perfis são relativamente barato e fáceis de gerar e existe um grande número de STRs

espalhados por todo o genoma (incluindo os 22 cromossomos autossômicos e os cromossomos sexuais X e Y) que parecem não estar sob pressão seletiva (GOODWIN et al., 2007).

Entretanto, existem situações (ossos antigos, desastres de massa) em que o material biológico se encontra tão degradado que o protocolo padrão de genotipagem de STRs não proporciona resultados suficientes para a obtenção de uma identificação confiável. Nesses casos, a análise de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) surge como uma abordagem alternativa para a obtenção de maior quantidade de dados a partir de amostras biológicas degradadas (BUDOWLE; BIEBER; EISENBERG, 2005).

Muitas das dificuldades técnicas com o uso forense de STRs não existem para os SNPs. O uso de *amplicons* de PCR muito curtos (por exemplo, 50 nucleotídeos ou menos) é essencial para o sucesso da análise de pouca quantidade de DNA altamente degradado. Isso não é possível com STRs altamente polimórficos por causa de sua sequência repetitiva. Contudo, como os SNPs são mudanças em uma única base, *amplicons* de PCR muito curtos podem ser empregados, possibilitando um perfil de SNPs bem sucedido a partir de amostras degradadas de DNA, das quais um perfil completo de STRs não poderia ser obtido. Além do mais, devido a variação dos SNPs não envolver sequências repetitivas, perfis de SNPs evitam artefatos "*stutter*" (bandas inespecíficas), o que complica a interpretação dos perfis de STRs, especialmente quando baixas quantidades de DNA são analisadas (KAYSER; DE KNIJFF, 2011).

O uso de SNPs autossômicos para identificação humana nas investigações forenses também apresenta desafios. Obviamente, SNPs bi-alélicos são menos polimórficos do que STRs multi-alélicos, assim, SNPs são menos informativos na análise de misturas de DNA de múltiplos indivíduos. Contudo, o uso de um grande número de SNPs, e/ou talvez o uso de SNPs tri-alélicos, combinado com tecnologias de genotipagem multiplex, possa compensar esse efeito. Já foi demonstrado que conjuntos de 50 a 60 SNPs bi-alélicos autossômicos, cujos alelos menos frequentes possuem frequência entre 0.2 e 0.5, podem alcançar probabilidades de correspondência similares àquelas obtidas com 12 STRs normalmente usados no campo forense (RAPLEY; WHITEHOUSE, 2007).

Outro desafio é selecionar SNPs para identificação humana universal com confiabilidade similar em indivíduos de diversas ascendências biogeográficas. Dois aspectos de genética de

populações são importantes nesse caso: os SNPs escolhidos devem ter altos níveis de diversidade genética nas diferentes populações mundiais e baixo nível de diferenciação populacional entre elas (KIDD et al., 2006). A primeira característica é importante para alcançar altos níveis de similaridade de probabilidade de correspondência entre pessoas de diferentes ascendências biogeográficas; a segunda é crucial para evitar os efeitos de subestrutura populacional quando estima-se a probabilidade de correspondência (KAYSER; DE KNIJFF, 2011).

Além das questões técnicas e biológicas, outro importante aspecto torna o uso potencial de SNPs autossômicos para investigações de cena de crime impopular: todos os bancos de dados forenses são baseados em STRs. Além do mais, a legislação em muitos países proíbe a retenção de amostras de DNA de criminosos condenados. Consequentemente, introduzir uma identificação humana baseada em SNPs para casos forenses de rotina envolveria, para muitos países, começar de novo a estabelecer bancos de dados de DNA forense, uma perspectiva não muito atraente. Contudo, países que mantem as amostras de DNA e aqueles que ainda não estabeleceram um banco de dados forense podem considerar o uso de SNPs para identificação forense uma vez que kits comerciais com marcadores apropriados estejam disponíveis. Uma notável exceção em que bancos de dados de DNA pré-existentes não são requeridos é a identificação de pessoas desaparecidas, incluindo-se vítimas de desastres em massa (KAYSER; DE KNIJFF, 2011). Neste caso, perfis de DNA de amostras da vítima antes da morte ou amostras de referência de parentes da vítima são coletadas e genotipadas e comparadas com o perfil gerado pelos restos mortais da vítima (PRINZ et al., 2007). A substituição de STRs por SNPs é, para esse fim, mais simples e vantajosa, pois o DNA esta quase sempre altamente degradado nesse tipo de situação. O uso de SNPs para a identificação de vítimas de desastres em massa já foi realizado em várias ocasiões, incluindo as análises após os ataques terroristas em 11 de setembro ao *World Trade Center* na cidade de Nova Iorque (BIESECKER et al., 2005). Finalmente, SNPs, por causa de suas taxas de mutação 100.000 vezes mais baixas que as dos STRs, são melhores para testes de identificação e podem substituir os STRs para este propósito uma vez que kits comerciais estejam disponíveis (KAYSER; DE KNIJFF, 2011).

Em geral, a atual abordagem de comparação de perfis de DNA forense, independente do tipo de marcador genético utilizado, somente permite a identificação de suspeitos que já são conhecidos pelas autoridades de investigação, ou cujo material biológico tenha sido previamente analisado e inserido em um banco nacional de perfis de DNA. Na ausência de

um banco de perfis de DNA suficientemente grande, associado aos problemas éticos, legais e econômicos dos exames de DNA em massa, restam algumas abordagens para ajudar as investigações policiais a encontrarem pessoas desconhecidas (KAYSER; SCHNEIDER, 2009).

Na primeira delas, a ascendência biogeográfica de um indivíduo pode indiretamente fornecer algumas informações limitadas sobre a aparência geral de uma pessoa e isto pode ajudar no direcionamento da investigação. Marcadores Informativos de Ancestralidade (AIMs) são polimorfismos (SNPs, por exemplo) distribuídos ao longo do genoma humano que possuem alelos em frequências muito diferentes em diferentes populações mundiais. A ancestralidade genética é descrita em termos de proporção de ancestralidade ou mistura. Este método requer acesso à variação genética que está fortemente relacionada com populações específicas e o desenvolvimento de banco de dados para quantificar a mistura com base em AIMs específicos (BUDOWLE; VAN DAAL, 2008).

A ancestralidade biogeográfica vem sendo estudada no contexto de uma vasta gama de distâncias geográficas graças aos grandes conjuntos de SNPs autossômicos que se tornaram disponíveis através de *microarrays* comerciais. Estudos globais envolvendo todas as maiores regiões continentais e estudos dentro dos continentes (África, Índia, Ásia e Europa) revelaram uma subestruturação genética do genoma de populações em diferentes níveis usando várias abordagens estatísticas. Claramente, isso não sugere que tal resolução geográfica possa ser alcançada em todos os possíveis casos. Embora a ancestralidade em indivíduos com diferentes origens continentais possa ser normalmente determinada por dados de SNPs genômicos, algum nível de sobreposição existe entre regiões continentais específicas (JAKOBSSON et al., 2008). Esta sobreposição genética aumenta com a diminuição da distância geográfica, por exemplo, em regiões dentro do mesmo continente. Embora *microarrays* de SNPs de todo o genoma sejam extremamente poderosos na identificação de ancestralidade biogeográfica, eles não são muito úteis nas análises de amostras forenses, uma vez que os *microarrays* de SNPs atuais necessitam de grandes quantidades de DNA genômico não fragmentado, o que normalmente não é encontrado nas amostras em cenas de crime. Consequentemente, alguns conjuntos de marcadores de DNA autossômicos informativos de ancestralidade foram desenvolvidos para inferência de ancestralidade biogeográfica baseada em DNA em nível de resolução continental (KAYSER; DE KNIJFF, 2011).

A segunda abordagem, ainda mais promissora, é conhecida como fenotipagem de DNA forense (*Forensic DNA phenotyping*) e inclui a inferência de informações de ancestralidade biogeográficas e características físicas externas (CFE) diretamente a partir de uma amostra de DNA. Para cenas de crime, a fenotipagem de DNA deverá reduzir a quantidade de possíveis suspeitos (KAYSER; SCHNEIDER, 2009) e também pode ajudar na identificação de material biológico de supostas pessoas desaparecidas, incluindo-se vítimas de desastres em massa, fornecendo pistas relevantes para que parentes das vítimas possam reconhecer o fenótipo inferido. Devemos ressaltar que a fenotipagem de DNA só deve ser aplicada para amostras desconhecidas no trabalho de inteligência da polícia, de uma maneira similar a que os depoimentos de testemunhas são usados hoje. Contudo, diferente dos depoimentos de testemunhas, os quais possuem sérias taxas de erros, inferências das proporções de ancestralidade e de características fenotípicas serão realizadas de acordo com métodos estatísticos específicos, e estarão sempre acompanhadas de valores de probabilidades relacionados à acurácia da inferência em questão (KAYSER; DE KNIJFF, 2011).

Os recentes avanços em genética parecem promissores o suficiente para se esperar que marcadores de DNA altamente informativos na predição de pelo menos algumas CFE mais amplas, específicas do grupo humano, se tornarão disponíveis num futuro próximo. Dentre estas características, destaca-se a pigmentação da pele, olhos e cabelos. Espera-se que tais marcadores de DNA qualitativos sejam aplicados somente para encontrar pessoas desconhecidas nos casos em que o número potencial de suspeitos não possa ser restringido por outras informações da inteligência policial. Se grupos de potenciais suspeitos são identificados usando a predição de CFE baseadas em DNA, o perfil de DNA convencional usando marcadores individuais específicos irá fornecer uma identificação humana individual (KAYSER; SCHNEIDER, 2009).

1.2 BIOLOGIA DA PIGMENTAÇÃO

A pigmentação visível da pele, cabelos e olhos depende primeiramente das funções dos melanócitos, uma pequena população de células especializadas na síntese e distribuição da melanina. Os melanócitos derivam de células precursoras (melanoblastos) durante o desenvolvimento embrionário. Os melanoblastos são originários da crista neural e, após seu desenvolvimento, migram para locais apropriados e se diferenciam em melanócitos para realizar a função de produzir padrões normais de pigmentação. Na pele humana, os

melanócitos estão localizados na junção entre a derme e a epiderme num padrão característico de dispersão (FIGURA 1). Cada melanócito na camada basal da epiderme está funcionalmente conectado aos fibroblastos subjacentes na derme e aos queratinócitos sobrejacentes na epiderme. Estes três tipos de células são altamente interativos e comunicam-se entre si através de fatores de secreção e seus receptores e através do contato célula-célula para regular processos que acarretarão no fenótipo da pele (YAMAGUCHI; BRENNER; HEARING, 2007).

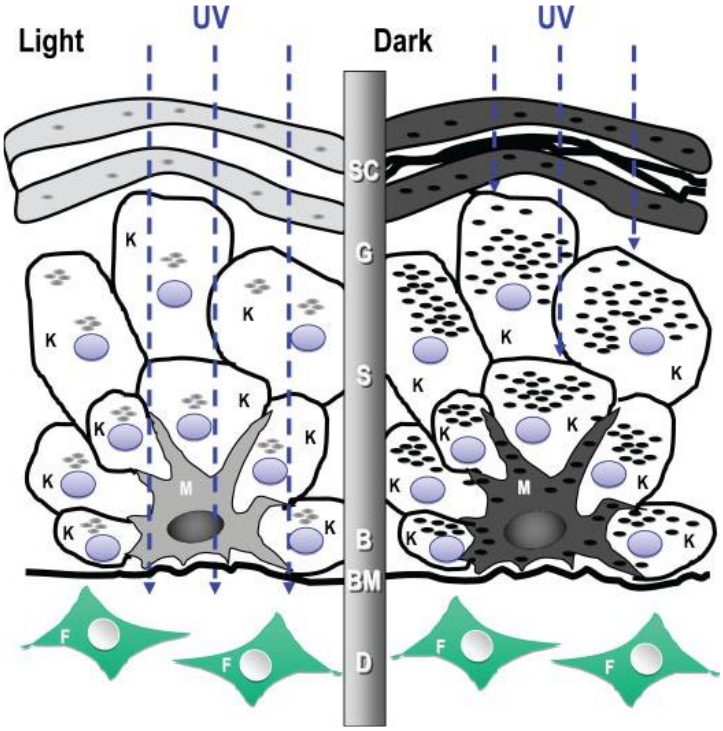

FIGURA 1. Esquema da estrutura da pele humana: tipos de pigmentação clara e escura. De cima para baixo: UV = radiação ultravioleta; SC = estrato córneo; G = estrato granuloso; S = estrato espinhoso; B = estrato basal; BM = membrana basal; D = derme. Tipos celulares: K = queratinócitos; M = melanócitos; F = fibroblastos; grânulos ovais = melanossomos contendo melanina.
Fonte: Yamaguchi, et al. 2007.

A melanina é sintetizada e empacotada nos melanossomos, compartimentos subcelulares especializados do Complexo de Golgi. Estas estruturas possuem mesma origem celular que os lisossomos, com os quais compartilham muitas proteínas, e tornam-se maduras em quatro estágios que foram morfologicamente caracterizados em nível estrutural (FIGURA 2). No primeiro estágio, os melanossomos são vacúolos vazios que brotam do reticulo endoplasmático e não conseguem sintetizar melanina. Somente a partir do estagio II, quando proteínas estruturais e enzimáticas são transportadas para dentro do melanossomo é que este

torna-se capaz de começar a sintetizar melanina. E só quando está totalmente maduro, consistindo em uma partícula escura preenchida pela melanina que produziu durante sua maturação, é que ele é transportado para os queratinócitos da pele e folículos capilares. Nos humanos, duas formas independentes de melanossomos que diferem em tamanho, formato, estrutura e composição química já foram descritos como representantes dos diferentes estágios de maturação da mesma organela. O eumelanossomo é uma partícula de formato oval, opaca e local da síntese da eumelanina (pigmento escuro, castanho/preto). Já a feomelanina (pigmento claro, vermelho/amarelo) deriva de etapas conjugativas envolvendo grupos sulfidrilo e cisteínas que ocorrem nos feomelanossomos esféricos (FIGURA 3). A forma, o conteúdo, a transferência e o acumulo desses melanossomos na vizinhança dos queratinócitos é que determina a cor dos cabelos e da pele, ao passo que, nos olhos, os melanossomos são retidos nos melanócitos da íris. Além disso, o grau de melanização (quantidade de eumelanina e feomelanina produzida pelos melanossomos) e distribuição dos melanossomos varia quantitativamente entre indivíduos de diversas origens étnicas (STURM, 2006).

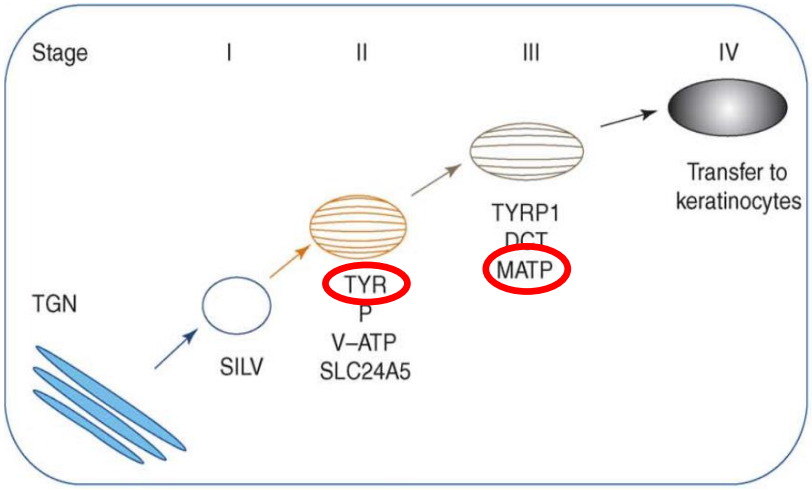

FIGURA 2. Modelo dos quatro estágios de maturação do melanossomo juntamente com as principais proteínas necessárias em cada passo.
Fonte: Sturm, 2006.

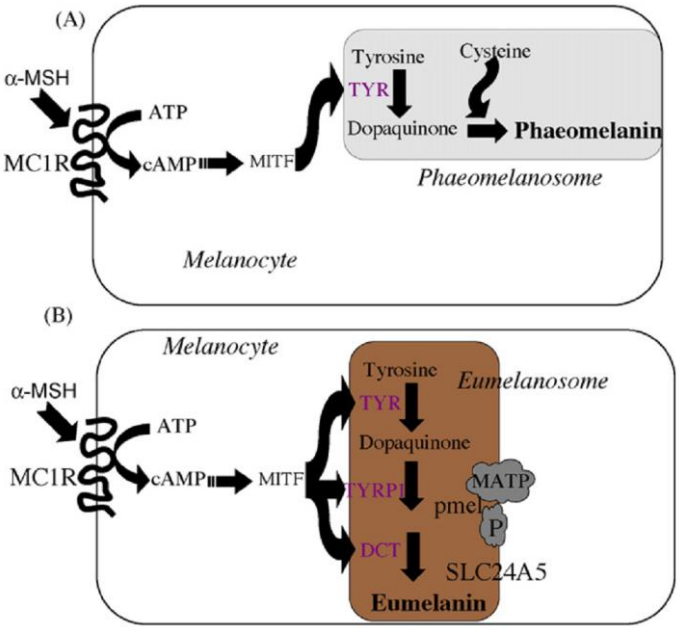

FIGURA 3. Esquema da melanogênese. **(A)** o hormônio estimulante do a-melanócito (a-MSH) se liga ao gene MC1R, desencadeando um aumento de adenosina monofosfato cíclica (cAMP) intracelular e ativação do fator de transcrição da microftalmia (MITF). Este ativa a tirosinase (TYR), que age na conversão da tirosina formando dopaquinona e, desde que esteja presente no meio, ocorre a adição de cisteína. O produto desta reação é oxidado formando a feomelanina. Se os níveis de cAMP são limitados, esta forma de melanina é favorecida e os feomelanossomos são formados e transportados para os queratinócitos adjacentes. **(B)** O MITF também estimula a produção da proteína relacionada a tirosina 1 (TYRP1) e a dopacromo tautomerase (DCT), que em condições ideais (dentre elas, a ausência de cisteína), produzem eumelanina. Em tais condições, as proteínas Pmel17, MATP, P e SLC24A5 favorecem a produção de eumelanina e a consequente maturação dos eumelanossomos.
Fonte: Tully, 2007.

A evolução da pigmentação da pele em humanos foi determinada por muitos fatores. De longe, a radiação de luz ultravioleta (UVR) tem sido o principal fator seletivo influenciando a evolução da biossíntese da melanina na pele. Atualmente, o número de fatores influenciando a evolução da pigmentação da pele em humanos tem aumentado, e a cultura claramente reduziu a influência da ação da seleção natural neste contexto. Comportamentos culturais, tais como a utilização de roupas e abrigos, se tornaram mais comuns em algumas populações, o que contribuiu para a redução da exposição de um indivíduo à UVR. A exposição da pele humana a UVR resulta numa profunda alteração do metabolismo, estrutura e função das células epidermais. Estas atividades incluem aumento da ativação dos melanócitos, aumento na produção de melanossomos, aumento no tamanho dos complexos melanossomais incorporados pelos queratinócitos e iniciação da síntese de vitamina D (JABLONSKI, 2004).

Na maioria dos humanos, uma exposição casual a luz do sol leva a conversão do 7-dehidrocolesterol na pele para pré-vitamina D3 pelos fótons UV e subsequente isomerização dessa última para vitamina D3 em temperatura corporal. Conforme a quantidade de melanina na pele aumenta, aumenta o tempo necessário de exposição à luz UV para síntese de pré-

vitamina D3. Peles extremamente pigmentadas tornam-se pouco adaptadas para permitir que quantidades suficientes do precursor de vitamina D3 sejam sintetizadas em ambientes de baixa intensidade de UVR. Se a duração da exposição não for suficiente para catalisar a síntese de pré-vitamina D3, os indivíduos estarão sob um risco bem maior de deficiência de vitamina D3 e de suas manifestações (raquitismo, osteomalácia e osteoporose), como ficou demonstrado pelas migrações de indivíduos oriundos da Etiópia para Israel (ano de 1991) ou da Índia para o Reino Unido (décadas de 70 e 80) (JABLONSKI; CHAPLIN, 2000).

A dieta também teve o seu papel na evolução da pigmentação da pele na recente história evolutiva humana, como pode ser bem ilustrado pela população de esquimós do nordeste da Ásia e do Ártico norte americano. Os esquimós apresentam pigmentação mais escura do que seria esperado em função da incidência de UVR em seu habitat. Diante disso, a habitação destes nessas elevadas latitudes seria impossível sem a dependência em uma dieta muito rica em vitamina D. Os principais componentes da dieta dos esquimós (animais marinhos, peixe e caribu) fornecem vitamina D em abundância. Neste mesmo contexto, a manutenção da pigmentação escura representa proteção apropriada contra a fotodegradação do folato (ácido fólico), elemento vital para síntese, reparo e expressão do DNA e, consequentemente, para todos os processos envolvendo divisão celular e homeostase. Deste modo, a pigmentação mais escura conferiu a proteção necessária em um ambiente no qual os altos níveis de UVA resultantes da radiação solar direta são intensificados por sua reflexão na neve e no gelo (JABLONSKI, 2004).

1.3 GENÉTICA DA PIGMENTAÇÃO

É surpreendente que em poucos anos nosso entendimento sobre a genética molecular da pigmentação humana tenha progredido da investigação de aspectos simples, tais como quais tipos e quantos genes estão relacionados com a diversidade da cor da pele, dos cabelos e dos olhos, para aspectos de alta complexidade, vislumbrando inclusive a identificação dos *loci* e polimorfismos de elevado valor preditivo. As recentes descobertas de importantes genes determinantes da pigmentação foram feitas por meio da combinação de abordagens genéticas, bioquímicas e celulares, mas indubitavelmente foi o pronto acesso a sequência completa do genoma humano e a documentação de um vasto número de SNPs em varias populações os maiores responsáveis pela expansão do conhecimento (STURM, 2009).

Até agora, foram identificados mais de 125 genes distintos relacionados à pigmentação, direta ou indiretamente. Muitos deles afetam processos críticos ao desenvolvimento dos melanoblastos (células precursoras dos melanócitos), outros regulam a diferenciação e sobrevivência dos melanócitos, e ainda, outros regulam processos distintos que influenciam a pigmentação. Mais de 25 genes desses 125 relacionados à pigmentação estão envolvidos na biogênese e funcionamento dos melanossomos. Por exemplo, genes que codificam enzimas críticas incluem o gene da tirosinase (TYR), TYRP1 e DCT, cujas mutações afetam drasticamente a quantidade e qualidade da melanina sintetizada. Genes de proteínas estruturais críticas incluem Pmel17 e MART1, ambas necessárias para a maturação estrutural do melanossomo. Existem ainda, genes que codificam proteínas envolvidas na distribuição e transporte de proteínas/íons aos melanossomos (SLC45A2 e SLC24A5) e proteínas envolvidas no processo de sinalização (MC1R). Todas as formas de albinismo resultam de disfunções de enzimas e proteínas melanogênicas, o que leva a uma pigmentação da pele, cabelos e olhos comprometida. Até agora, cinco tipos de albinismo foram definidos mapeando-se cinco diferentes loci relacionados à pigmentação, por afetar a atividade da TYR direta ou indiretamente. Mutações nos genes TYR (albinismo oculocutâneo tipo 1 - OCA1) e TYRP1 (OCA3) podem conduzir à degradação proteossomal da tirosinase. Mutações nos genes P (OCA2) e SLC45A2 (OCA4) podem influenciar a distribuição de tirosinase funcional para os melanossomos. Por fim, mutações no gene GPR143 (*G protein-coupled receptor 143*), anteriormente conhecido como OA1 (albinismo ocular tipo 1), podem comprometer a biogênese do melanossomo e a pigmentação através de um mecanismo ainda desconhecido e dessa forma perturbar a produção de melanina (YAMAGUCHI et al., 2007).

Assim sendo, podemos observar o quão complexa é a pigmentação e quantos receptores, ligantes e outros fatores atuam de forma complexa na regulação da pigmentação, quantas vias devem funcionar perfeitamente para não ocorrerem danos e também quantas possibilidades de mutações que podem não necessariamente causar danos, mas sim a variação normal nas cores da pele, olhos e cabelos.

1.3.1 O GENE SLC45A2 E A PIGMENTAÇÃO HUMANA

O gene SLC45A2 (*solute carrier family 45, member 2*) codifica a proteína MATP (*membrane associated transport protein*) que está envolvida na síntese de melanina através do processamento e transporte intracelular da tirosinase e/ou transporte de prótons para dentro do melanossomo (TULLY, 2007). Quando mutada, esta proteína é responsável pelo OCA4 (LIU;

WEN; KAYSER, 2013). O gene MATP está localizado na região cromossômica 5p13.2 (FIGURA 4) e tem 7 éxons abrangendo mais de 40 Kb (GRAF; HODGSON; VAN DAAL, 2005).

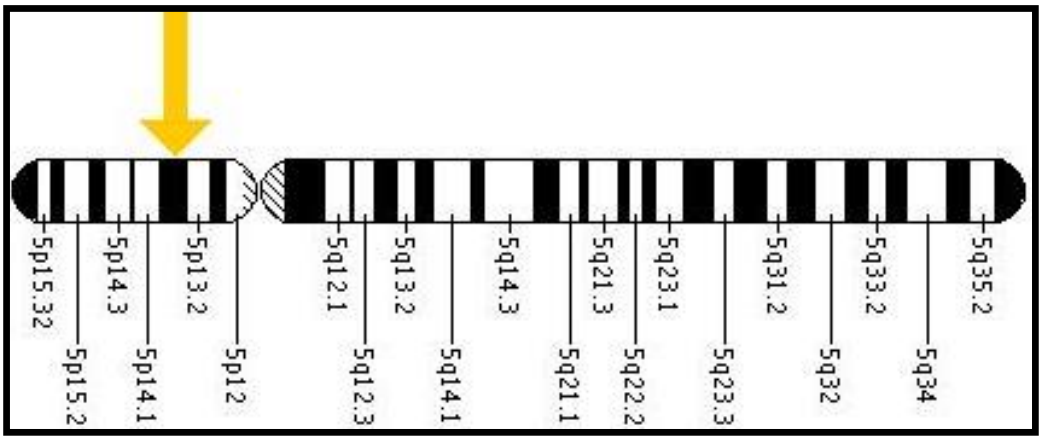

FIGURA 4. Localização cromossômica do gene SLC45A2.
Fonte: (Genetics Home Reference, 2007).

Este gene foi primeiro identificado como produtor de antígeno em melanoma e denominado gene do antígeno humano em melanoma 1 (*Human antigen in melanoma-1*, AIM-1) (HARADA et al., 2001). A proteína codificada por ele é um polipeptídio com 530 aminoácidos e se distribui ao longo da bicamada lipídica da membrana melanossomal. Posteriormente, o *locus* humano do gene AIM-1 foi identificado por outro grupo de pesquisadores e denominado MATP (em seguida, ele foi denominado oficialmente SLC45A2 pelo HGNC - *HUGO Gene Nomenclature Committee*). Esse mesmo grupo também identificou uma transição homozigota G>A no éxon 2 do gene MATP em um paciente turco com OCA, o que acarretou no reconhecimento do gene SLC45A2 como sendo o quarto gene patológico de OCA (OCA4) (NEWTON et al., 2001). Além da mutação patogênica, também foram identificados dois polimorfismos no gene MATP, Leu374Phe e Thr329Thr, em diversas populações da América do Norte, Ásia, Europa e África (SOEJIMA et al., 2006).

Nos anos seguintes, pesquisadores australianos relataram 2 SNPs (rs16891982 e rs26722) no SLC45A2 que não estavam associados com doenças mas sim com a variação normal da pigmentação dentro e entre populações. O alelo Leu374 estava presente com uma frequência significativamente maior em asiáticos (0,887), afro-americanos (0,586) e aborígenes australianos (0,725) do que em caucasianos (0,066). Caucasianos com o alelo Leu374 tendem a ter a pigmentação mais escura, com as maiores frequências em indivíduos com cabelos

pretos [*Odds Ratio* (OR) = 25,6], pele morena (OR = 28,6) e olhos escuros (OR = 3,5) (GRAF et al., 2005). Um padrão similar foi observado com o polimorfismo Glu272Lys, onde caucasianos com o alelo 272Lys tendem a ter cabelos pretos (OR = 43,23), pele morena (OR = 8,27) e olhos escuros (OR = 6,57). No entanto, a substituição 272Lys pode não ser uma mutação causal e as associações com a pigmentação podem estar refletindo, ao invés disso, um desequilíbrio de ligação com o Leu374. A importância funcional destas mutações ainda não foi completamente elucidada, mas visto que o gene SLC45A2 esta supostamente envolvido no tráfego da tirosinase e no transporte de prótons, proteínas com as mutações 374Phe e Leu374, respectivamente, podem estar influenciando este processo, sendo que, evidências sugerem que Leu374 possa estar contribuindo para um pH intramelanossomal ótimo para a produção de eumelanina (TULLY, 2007).

Estes dois polimorfismos não-sinônimos (Leu374Phe e Glu272Lys) também foram estudados em indivíduos, aleatoriamente selecionados, na África do Sul (caucasianos), Gana, Japão e Nova Guiné. O alelo 272Lys foi encontrado nas populações do Japão e Nova Guiné e o alelo Phe374 foi encontrado somente nos sul africanos com uma frequência alélica de 0,89 (NAKAYAMA et al., 2002). Outros trabalhos (YUASA et al., 2004), também mostraram que o alelo Phe374 estava presente em alta frequência (0,96) em alemães, enquanto que estava completamente ausente em japoneses. Todos estes resultados sugerem que o alelo Phe374 é comum em populações de ancestralidade europeia e levantam a possibilidade de que exista uma seleção direcional favorecendo este alelo em ambientes com baixa incidência de radiação solar, garantido aos indivíduos que o possuem uma vantagem adaptativa na síntese de vitamina D em altas latitudes (SOEJIMA et al., 2006). O Projeto 1000 Genomas corrobora esses dados mostrando uma frequência do alelo Phe374 muito maior em europeus (96,7% em finlandeses e 97,7% em britânicos) do que em outras populações estudadas (33,3% em colombianos, 20,4% em americanos de ancestralidade africana, 1% em chineses e completa ausência em nigerianos e quenianos) (1000_*GENOMES_PROJECT*, 2012).

Outros trabalhos recentes continuam a evidenciar a importância do gene SLC45A2 na pigmentação humana, tanto em termos de diagnóstico pré-natal e descoberta de novas mutações associadas ao OCA4 (MAURI et al., 2014; PANG et al., 2011; SIMEONOV et al., 2013; XU et al., 2012) ou predisposição ao melanoma (IBARROLA-VILLAVA et al., 2011; IBARROLA-VILLAVA et al., 2012; PHO; LEACHMAN, 2010), quanto nas descobertas de mutações relacionadas à variação normal da pigmentação e na predição de características físicas externas relacionadas à pigmentação humana (BELEZA et al., 2013; CERQUEIRA et

al., 2012; KASTELIC et al., 2013; POSPIECH et al., 2012; RUIZ et al., 2013; SPICHENOK et al., 2011; VALENZUELA et al., 2010; WALSH et al., 2011; WALSH et al., 2012).

Dentre as mutações (SNPs) mais estudadas no gene SLC45A2 está o polimorfismo Leu374Phe (rs16891982), já mencionado anteriormente. Este SNP vem sendo sistematicamente relacionado à predição da cor da pele e dos olhos em diversas populações. Pietroni et al. (2013) estudaram uma forma de medir objetivamente [quantitativamente, *Pixel Index of the Eye* (*PIE-score*)] a cor dos olhos em função de 32 SNPs da pigmentação em 230 indivíduos italianos e encontraram uma associação estatisticamente significante entre o *PIE-score* e o SNP rs16891982, demonstrando que este SNP seria um bom preditor para cor dos olhos. Este mesmo SNP também é um dos 6 SNPs utilizados no sistema multiplex denominado *Irisplex*, desenvolvido para a predição da cor dos olhos castanhos e azuis (WALSH et al., 2011). O sistema *Irisplex* foi utilizado em vários estudos de predição da cor dos olhos, incluindo estudo em eslovenos onde mostrou grande acurácia e eficácia para inferência de olhos azuis e castanhos, mas não para olhos de tonalidades intermediárias (KASTELIC et al., 2013). Ruiz et al. (2013) desenvolveram método de mini-sequenciamento (extensão de uma única base) para a genotipagem de 37 SNPs (entre eles o rs16891982) em genes associados à pigmentação para avaliar a capacidade de predição da variação nas cores da pele, olhos e cabelos. Foram avaliados o desempenho dos diferentes conjuntos de marcadores para cor dos olhos em indivíduos europeus e concluíram que a adição de dois SNPs ao sistema *Irisplex* o torna mais vantajoso. Walsh et al. (2013) adequaram o sistema *Irisplex* para a predição da cor dos olhos e cabelos por meio de 24 SNPs, dois dos quais pertencentes ao gene SLC45A2 (rs28777 e rs16891982). Estes sistema passou a ser denominado *HIrisplex*.

Spichenok et al. (2011) e Hart et al. (2013) também estudaram com sucesso a predição da cor da pele e dos olhos utilizando sete e oito SNPs, respectivamente, incluindo o rs16891982. Por outro lado, Andersen et al. (2011) não encontraram associações significativas ao analisarem 33 SNPs, dentre eles o SNP rs16891982, com relação a medidas objetivas de refletância espectrofotométricas da parte interior do braço e da nádega em 188 dinamarqueses não relacionados. Entretanto, diferenças significativas nas frequências alélicas deste polimorfismo foram observadas entre dinamarqueses e somalianos, sugerindo, assim, alguma participação na constituição da pigmentação da pele.

O estudo da diversidade haplotípica é fundamental no entendimento da estrutura populacional, podendo proporcionar uma melhor compreensão sobre a diversidade dos genes (no caso, o SLC45A2) envolvidos na determinação de características fenotípicas, por exemplo, a pigmentação humana. Mutações de ponto no DNA são ocasionais e geralmente não recorrentes, levando a um padrão de associação entre alelos de SNPs existentes em um mesmo cromossomo, tal que a presença de uma variante fornece informações sobre a presença de outra variante. Esta associação é denominada desequilíbrio de ligação (DL) e regiões genômicas com altos níveis de DL também tem um número reduzido de haplótipos. O DL pode ser desfeito por conversão gênica e recombinação e a quantidade de DL depende da idade das mutações envolvidas e da história, estrutura e tamanho da população. Se um aumento substancial no risco de se desenvolver uma doença é causado por um único SNP, uma associação pode ser vista entre tal doença e outros SNPs em DL com o SNP causal. SNPs comuns (frequência do alelo mais raro superior a 30%), localizados próximos em um mesmo cromossomo e encontrados globalmente, podem ser arranjados em um pequeno número de haplótipos comuns que também são encontrados em múltiplas populações juntamente com vários haplótipos mais raros (WEISS; CLARK, 2002). Yuasa et al. (2006) analisaram as frequências alélicas e a diversidade haplotípica de 12 SNPs do gene SLC45A2 em amostra populacional de africanos, japoneses e alemães. A análise de haplótipos revelou uma menor diversidade haplotípica nos alemães (0,261 ± 0,043) do que nos africanos (0.815 ± 0.051) e japoneses (0,881 ± 0,017) e evidenciou que a mutação L374F teria ocorrido apenas uma vez no ancestral dos Caucasianos. Apenas um dos 32 haplótipos observados foi compartilhado pelas três populações. Eles também avaliaram o desequilíbrio de ligação (DL) par a par dos SNPs entre as populações de japoneses e alemães através dos valores de D' e r^2. Os valores de D' foram geralmente muito maiores do que os valores de r^2, pois os valores de D' iguais a 1,0 são causados pela presença de três dos quatro haplótipos possíveis para um par de *loci*. Embora alelos raros com frequências menores do que 5% não tenham poder estatístico suficiente para detecção de DL (LEWONTIN, 1995), os valores par a par entre os SNPs rs2722 e rs35394 foram relativamente altos em ambas as populações, sugerindo que esta região de 15kb forma um bloco de haplótipos.

1.4 POPULAÇÃO BRASILEIRA

A população brasileira é uma das mais heterogêneas em todo o mundo, resultado de cinco séculos de mistura inter-étnica envolvendo Nativos Americanos, Europeus (principalmente

Portugueses) e Africanos (RIBEIRO-RODRIGUES et al., 2009). Estima-se que antes da chegada dos colonizadores, por volta de 2,5 milhões de indígenas já habitavam o território brasileiro (SANTOS, N. P. et al., 2010). Os nativos sofreram então uma drástica redução populacional tanto devido aos conflitos com os colonizadores quanto às doenças trazidas por eles, tais como varíola e sarampo (SANTOS; COIMBRA JR., 1994). Nos três primeiros séculos, aproximadamente 500.000 indivíduos vieram de Portugal (SANTOS, N. P. et al., 2010). Entre 1820 e 1975, a grande maioria dos 6 milhões de imigrantes europeus que chegaram ao Brasil era de origem predominantemente portuguesa e italiana (70% do total), tendo ocorrido também a entrada de espanhóis, alemães, sírios e japoneses. Entre os séculos XVI e XIX, aproximadamente 3,5 milhões de africanos foram trazidos como escravos para o Brasil, vindos principalmente das regiões Oeste, Centro-Oeste e Sudeste da África (FERREIRA et al., 2006).

Isso pode ser verificado nos resultados do estudo realizado por Pena et al. (2011) em que a maior contribuição relativa de ancestralidade observada nos brasileiros é predominantemente de europeus (com as proporções variando de 60,6% no Nordeste, 69,7% no Norte, 73,7% no Sudeste até 77,7% no Sul do Brasil), seguida de africanos (30,3% no Nordeste, 18,9% no Sudeste, 12,7% no Sul e 10,9% no Norte) e ameríndios (19,4% no Norte e aproximadamente 9% nas outras três regiões).

De acordo com o censo realizado em 2010 (IBGE, 2010), o Brasil possui 191 milhões de habitantes, dos quais 47,7% se autodeclararam "brancos", 43,1% "pardos", 7,6% "negros" e 1,5% disseram pertencer a outras categorias. Estas proporções variam consideravelmente nas diferentes regiões geográficas brasileiras devido aos aspectos particulares de suas colonizações, houve uma contribuição mais pronunciada dos nativos americanos no Norte, uma alta contribuição africana no Nordeste e uma contribuição relativamente baixa de ambas no Sul (SANTOS, N. P. et al., 2010). No estado de São Paulo (com aproximadamente 41 milhões de habitantes), as proporções foram de 63,9%, 29,1%, 5,5% e 1,5% respectivamente. Na cidade de Ribeirão Preto, que conta com 604.602 habitantes, as frequências de “brancos”, “pardos” e “negros” relatadas foram de 69,8%, 22,8% e 6,4% respectivamente (IBGE, 2010).

Atualmente, estudos baseados em marcadores genéticos consideram que a população urbana de Ribeirão Preto é altamente miscigenada, sendo os brancos caracterizados por contribuições 79% de Europeus, 14% de Africanos e 7% de Ameríndios (FERREIRA et al., 2006); os

mulatos, por contribuições 62% de Europeus, 26% de Africanos e 12% de Ameríndios e os negros, por contribuições 37% de Europeus e 63% de Africanos (MUNIZ et al., 2008).

Neste contexto, Parra et al. (2003) chama a atenção para o risco de equalizarmos cor ou raça com ascendência geográfica visto que os resultados obtidos de um grupo de 173 indivíduos brasileiros, classificados de acordo com a cor da pele em brancos, negros ou intermediários, demonstraram sobreposição significativa de valores do índice de ancestralidade africana (AAI) entre os grupos. Por exemplo, um indivíduo classificado como negro obteve o quarto menor valor de AAI enquanto que outro indivíduo, classificado como intermediário, obteve o maior valor de AAI observado.

Todos estes dados demonstram que a população brasileira possui uma elevada taxa de miscigenação, representada pelas contribuições de indivíduos de origens étnicas distintas, como europeus de diversas regiões, africanos vindos de diversas regiões subsaarianas e populações ameríndias nativas. Tal heterogeneidade étnica se reflete na alta diversidade fenotípica vista nos brasileiros. Dessa forma, podemos considerar que a população brasileira apresenta condições propícias para a identificação de novos alelos e haplótipos em genes de pigmentação e para avaliação genética relacionada aos fenótipos morfológicos (MARANO, 2011).

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A habilidade de prever a aparência física de um indivíduo diretamente do material da cena de um crime pode ajudar as investigações policiais a limitar o número de suspeitos a um grupo reduzido de indivíduos, particularmente nos casos em que outras informações relacionadas ao criminoso são desconhecidas pelas autoridades policiais envolvidas. Neste caso, a polícia poderia prosseguir as investigações com interrogatórios mais direcionados e, posteriormente, requisitar, para o uso no tribunal, um perfil de STRs padrão somente para individualizar o suspeito correspondente as características físicas externas (CFE) encontradas (WALSH et al., 2013). A predição de CFE de um indivíduo poderá vir a incluir informações advindas da análise de polimorfismos e haplótipos do gene SLC45A2, juntamente com marcadores genéticos de outros genes envolvidos na biossíntese de melanina. Para que seja possível a utilização de haplótipos do gene SLC45A2 no processo de fenotipagem de DNA forense, estudos populacionais visando correlacionar alelos, genótipos e haplótipos específicos com determinadas características de pigmentação devem ser conduzidos. Este é o primeiro estudo que visa correlacionar haplótipos do gene SLC45A2 com presença de sardas e intensidade de pigmentação da pele, olhos e cabelos.

Embora eventualmente a predição de características fenotípicas como cor da pele, cabelos ou olhos não venha contribuir significativamente no processo de identificação humana em algumas populações mais homogêneas, tais características seriam amplamente informativas no caso da população brasileira (altamente heterogênea), composta por indivíduos que apresentam fenótipos bastante diversos.

HIPÓTESE

3. HIPÓTESE

Existe correlação entre a intensidade de pigmentação dos olhos, pele e cabelos em populações urbanas brasileiras e os alelos, genótipos e haplótipos compostos por polimorfismos localizados no gene SLC45A2, decorrente do papel desempenhado pela proteína por ele codificada (MATP) no processo de biossíntese de melanina.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral consistiu em levantar frequências alélicas de 12 SNPs presentes no gene SLC45A2 em amostras de 296 indivíduos da população do Estado de São Paulo.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- avaliar o desequilíbrio de ligação entre os 12 SNPs analisados ao longo do gene SLC45A2;
- identificar haplótipos envolvendo SNPs do gene SLC45A2;
- investigar a existência de alelos, genótipos, haplótipos ou proteínas que estejam associados a fenótipos morfológicos (cor da pele, olhos e cabelos e ocorrência de sardas) em indivíduos da população urbana brasileira.

MATERIAL E MÉTODOS

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 AMOSTRA POPULACIONAL

Foram coletadas amostras de sangue (10ml) de um total de 296 voluntários não aparentados dos sexos feminino e masculino dos diferentes grupos étnicos que compõe a população brasileira, com idade variando de 18 a 75 anos, recrutados, em sua grande maioria, no Hemocentro de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP). Por meio de questionário (ANEXO 1), os indivíduos foram classificados em grupos de acordo com a cor dos olhos, cabelos e pele, bem como quanto a presença ou ausência de efélides (sardas).

Cada indivíduo participante assinou um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO 2) permitindo o uso de seu material biológico (amostra de sangue) para estudo. O material coletado foi armazenado em tubos rotulados de modo que o doador não pudesse ser diretamente identificado, mantendo, assim, o caráter confidencial da informação.

O projeto de pesquisa do presente trabalho, juntamente com o questionário sobre características étnicas e morfológicas foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Instituição (FFCLRP-USP) de acordo com o processo CEP-FFCLRP nº 433/2008 - 2008.1.2316.59.4 (ANEXO 3).

5.2 DETERMINAÇÃO FENOTÍPICA DOS INDIVÍDUOS

A classificação dos indivíduos de acordo com a pigmentação da pele foi realizada segundo o sistema proposto por Fitzpatrick (FITZPATRICK, 1988). Essa classificação se baseia nas características do indivíduo associadas à reação do mesmo à exposição ao sol, resultando na determinação do tipo de pele em seis grupos:

Tipos de pele	Descrição
I	Pele extremamente clara, sempre se queima, nunca bronzeia
II	Pele clara, sempre se queima, bronzeia às vezes
III	Pele média, algumas vezes se queima, sempre bronzeia
IV	Pele morena clara, raramente se queima, sempre bronzeia
V	Pele morena moderadamente pigmentada, nunca se queima, sempre bronzeia
VI	Pele negra marcadamente pigmentada, nunca se queima, sempre bronzeia

A cor dos olhos foi caracterizada e dividida em categorias compreendendo azul, verde, mel, castanho claro e castanho escuro. A cor dos cabelos, por sua vez, foi caracterizada e dividida em categorias compreendendo ruivo, loiro, castanho e preto.

5.3 ANÁLISE LABORATORIAL

5.3.1 EXTRAÇÃO DE DNA

Após a coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas e o sobrenadante (plasma) armazenado em frascos a -80ºC para eventuais usos futuros.

A extração do DNA das amostras de sangue foi realizada através do protocolo de *salting-out* (MILLER; DYKES; POLESKY, 1988) como descrito a seguir. Aproximadamente 10mL de sangue foram coletados em cada tubo contendo EDTA como anticoagulante. Transferiu-se o sangue para um tubo de 50mL e adicionou-se tampão de lise I (Tris-HCl 0,01M pH 7,5; Sacarose 0,3M; $MgCl_2$ 0,005M; Triton 1%; H_2O qsp) gelado até completar o volume final. O conteúdo do tubo foi misturado delicadamente por inversão e os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 3300 RPM a 4ºC. Dessa forma, os glóbulos vermelhos da amostra são lisados nesta etapa.

As hemácias lisadas (sobrenadante) foram descartadas e a extração prosseguiu com o pellet de células retido no fundo do tubo. Este pellet foi ressuspendido em 4,5mL de tampão lise II (NaCl 0,075M; NaEDTA 0,024M), 125µL de SDS 10% e 1,1mL de perclorato de sódio 5M. Tal mistura foi agitada num Vortex durante 10 segundos em temperatura ambiente. Os glóbulos brancos da amostra são lisados nesta etapa. Para a lise das proteínas, adicionou-se 2mL de NaCl 6M saturado e o tubo foi agitado no Vortex por 15 segundos em temperatura ambiente.

Posteriormente, o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 3300 RPM em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido cuidadosamente para um novo tubo de 50mL, ao qual foi adicionado 5mL de isopropanol absoluto. Em seguida, homogeneizou-se até que o DNA se precipitasse.

Finalmente, o DNA foi retirado com o auxílio de uma pipeta estéril e colocado em um tubo de 1,5mL contendo 1mL de etanol 75% gelado. O tubo foi centrifugado por 10 minutos a 4ºC e o sobrenadante foi descartado posteriormente. Após este processo, o tubo foi colocado numa centrífuga a vácuo por 10 minutos para a remoção do restante do etanol. O DNA do fundo do tubo foi dissolvido em 400µL de água estéril e armazenado em freezer a -20ºC.

5.3.2 AMPLIFICAÇÃO POR PCR DOS 12 POLIMORFISMOS DO GENE SLC45A2

Um conjunto de 12 SNPs distribuídos ao longo da região codificadora do gene SLC45A2 foram selecionados para o presente estudo (YUASA et al., 2006). A FIGURA 5 mostra a localização dos 12 SNPs que foram analisados ao longo do gene SLC45A2. Suas respectivas regiões e mutações estão descritas na TABELA 1.

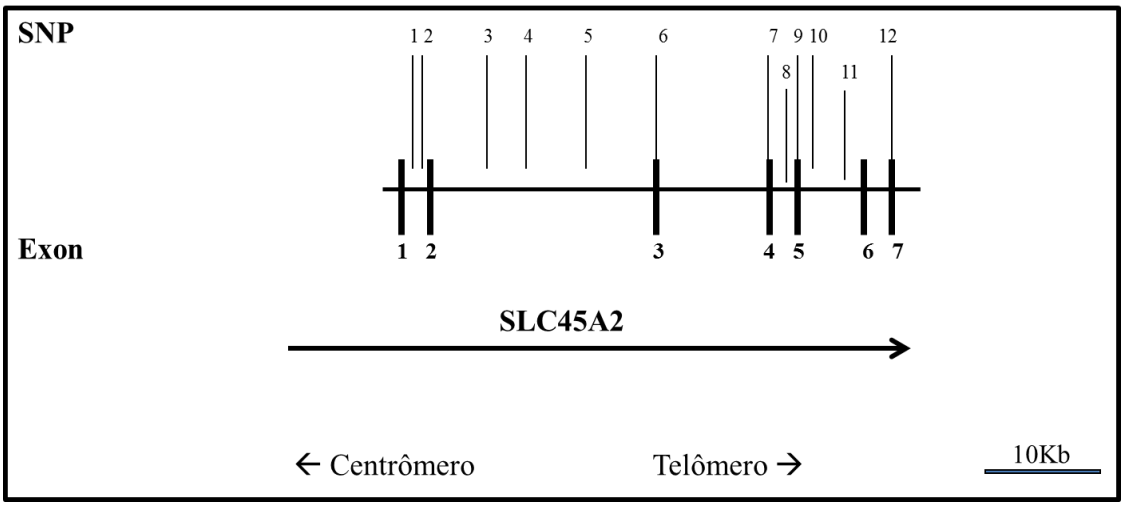

FIGURA 5. Diagrama esquemático do gene SLC45A2, mostrando a localização dos 7 exons e dos 12 SNPs estudados. A seta abaixo do nome do gene indica a direção da transcrição.
Fonte: Baseada em Yuasa, et al. 2006.

Para a amplificação dos segmentos de DNA contendo os 12 SNPs do gene SLC45A2 foram utilizados os seguintes reagentes nas concentrações descritas na TABELA 2: DNA genômico extraído das amostras coletadas; água destilada e deionizada (H_2O); desoxirribonucleosídeos trifosfatados (dNTPs); DNA polimerase (*Taq*), cujo *kit* vem acompanhado de tampão

(Tris/HCl 75mM pH9,0; KCl 50mM; $(NH_4)_2SO_4$ 20mM) e cloreto de magnésio ($MgCl_2$ 2,0mM), que podem estar juntos em um mesmo tubo ou separados em tubos diferentes e uma mistura contendo os *primers forward* (F) e *reverse* (R). A TABELA 3 mostra as sequências dos *primers* utilizados para amplificação.

TABELA 1 - SNPs do gene SLC45A2 analisados e suas respectivas regiões e mutações.

Número do SNP	Identificação no dbSNP	Região	Mutação
1	rs732740	intron 1	T > C
2	rs250413	intron 1	C > T
3	rs181832	intron 2	T > C
4	rs3776549	intron 2	G > A
5	rs3756462	intron 2	T > C
6	rs26722	exon 3	G > A (E272K)
7	rs2287949	exon 4	G > A (T329T)
8	rs250417	intron 4	G > C
9	rs16891982	exon 5	G > C (L374F)
10	rs40132	intron 5	T > C
11	rs35394	intron 5	A > G
12	rs3733808	exon 7	G > C (V507L)

Para a amplificação da região codificadora que contém o polimorfismo Leu374Phe (L374F) (exon 5) foi realizada PCR alelo-específica, seguindo orientações descritas na literatura (NAKAYAMA et al., 2002). Para cada amostra eram feitas duas misturas diferentes de reagentes para amplificação por PCR com *primers forward* específicos para cada mutação (L374-F e F374-F) e um *primer reverse* universal (L374F-R). Uma delas continha os *primers* L374-F e L374F-R (denominada *mix* 1) e a outra, os *primers* F374-F e L374F-R (denominada *mix* 2). Como controle interno de amplificação para esta técnica foi usado um par de *primers* que amplifica um fragmento de 110pb do gene da beta-globina, *primer forward* (PC03; 5'-ACACAACTGTGTTCACTAGC-3') e *primer reverse* (PC04; 5'-CAACTTCATCCACCTTCACC-3') (TAKARA, 2014). Este controle foi utilizado para garantir que a ausência de amplificação do fragmento que contém o polimorfismo em um dos *mixes* seja um resultado válido, indicando que aquele indivíduo é homozigoto para um dos alelos.

TABELA 2 - Reagentes e concentrações utilizados no preparo da mistura para amplificação dos segmentos contendo os 12 SNPs.

	rs732740 (1) rs3756462 (5)	**rs 250413 (2)**	**rs181832 (3) rs2287949 (7)**	**rs3776549 (4) rs 250417 (8) rs40132 (10)**	**rs26722 (6) rs35394 (11)**	**rs16891982 (9)**	**rs3733808 (12)**
DNA genômico	3µL	3µL	2µL	3µL	2µL	2µL	3µL
H_2O	14,75µL	14,75µL	16,75µL	16,15µL	14,75µL	12,5µL	15,75µL
Tampão	2,5µL	2,5µL	2,5µL	2,5µL	2,5µL	2,5µL	2,5µL
$MgCl_2$ (2,0 mM)	1µL	1,5µl	1µL	*	1µL	0,75µL	*
mistura de *primers* F e R (2,5µM)	2µL	2µL	1µL	2µL	2µL	2µL	2µL
mistura de *primers* F e R (β-globina)	-	-	-	-	-	1µL	-
dNTPs (20mM)	0,25µL	0,25µL	0,25µL	0,25µL	0,25µL	0,25µL	0,25µL
Taq (1U/µL)	0,5µL	0,5µL	0,5µL	-	0,5µL	0,5µL	0,5µL
Taq (5U/µL)	-	-	-	0,1µL	-	-	-
Volume total da reação	24µL	24,5µL	24µL	24µL	23µL	21,5µL	24µL

(*) Para estas análises, foi utilizado tampão contendo cloreto de magnésio ($MgCl_2$) na concentração de 2mM.

TABELA 3 – Descrição dos *primers* utilizados para amplificação por PCR.

SNP	Nome do *primer*	Sequência do *primer* (5' → 3')	Referências
rs732740 (1)	MATPY1-F2 MATPY1-R2	GTTCAAAGATGTGGCCTCTGAC GTAGTCAAACGCAGTGCTTCTC	Yuasa et al 2006
rs250413 (2)	MATPY1-F MATPY1-R	TTGTGTTTTCTGGACATTCGCT CTTCCTCCTTGGGTTAGCAATC	Yuasa et al 2006
rs181832 (3)	MATPY2-F6 MATPY2-R6	TATGTCCAACACCTCCCTTCTC TCTAAGGCCTCCAACTGACTG	Yuasa et al 2006
rs3776549 (4)	MATPY2-F2 MATPY2-R2	ACTGTGGTATCCTCACTCTG TGCTTCAAGTGGAATGCTG	Yuasa et al 2006
rs3756462 (5)	MATPY2-F3 MATPY2-R3	AAACGCTTCACGGTGTGCTGA ATTTCCTGGTCAGACCCCATGGA	Yuasa et al 2006
rs26722 (6)	E272K-F E272K-R	CTGAAGGGGAGTGTCTATGC CCCCATGAAACTCTTCTCGT	Nakayama et al 2002
rs2287949 (7)	E4-F E4-R	CTTTGTGTGATGGCTGACTG GAGGATAGCCCAGAAGAACC	Nakayama et al 2002
rs250417 (8)	MATPY4-F MATPY4-R	AGCAATCATGGCAGGCTTCA AGTCATAGGTCACCGCATCCT	Yuasa et al 2006
rs16891982 (9)	L374-F F374-F L374F-R universal	TTGGATGTTGGGGCTTG TTGGATGTTGGGGCTTC TCCCTTTCATTTTCCAGAGA	Nakayama et al 2002
rs40132 (10)	MATPY5-F MATPY5-R	ACCATTCTCAGGAGGACTCA GTGCTATGGCTAGGTAAAGGG	Yuasa et al 2006
rs35394 (11)	MATPY5-F2 MATPY5-R2	AGCCAAGTTGACCTGCTAGA TGAAATCACCCAGCTTAATGCC	Yuasa et al 2006
rs3733808 (12)	E7-F E7-R	TTTGCTGACCTGTGCCCTAA GCAGATTCCACGGCTGAAAT	Nakayama et al 2002

Com relação ao regime de temperaturas empregado na reação de PCR, o número de ciclos, os tempos utilizados nas temperaturas de desnaturação (94°C) e extensão (72°C) e as temperaturas de pareamento variaram consideravelmente em 3 dos 12 SNPs analisados em relação aos demais. Para os SNPs rs16891982, rs26722 e rs35394 o número de ciclos foi de 30, 28 e 35, respectivamente, enquanto que para os outros 9 SNPs foi de 32. Já as temperaturas de pareamento desses 3 SNPs foram de 56°C, 52°C e 50°C, respectivamente, enquanto que para os outros 9 SNPs, foi de 55°C. O tempo utilizado nas temperaturas de desnaturação, pareamento e extensão foi de um minuto para os três SNPs já mencionados e de trinta segundos para os nove SNPs restantes. Para todos os SNPs foi utilizado um passo inicial de cinco minutos a 94ºC, com exceção do SNP rs35394, no qual foi utilizado um tempo de 10 minutos nessa etapa.

5.3.3 REAÇÃO DE RESTRIÇÃO ENVOLVENDO 11 POLIMORFISMOS DO GENE SLC45A2

Com exceção do SNP rs16891982, que foi analisado através de PCR alelo-específica, os outros 11 SNPs foram submetidos ao tratamento com enzimas de restrição específicas para genotipagem. Antes do tratamento com as enzimas, todas as amostras nos 11 SNPs foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida para verificação de amplificação de acordo com condições que serão descritas posteriormente em outro item.

A quantidade de cada enzima utilizada, de água destilada e deionizada (H_2O), de tampão e também a temperatura e tempo de incubação para cada SNP estão descritos na TABELA 4. As enzimas utilizadas para genotipagem de cada SNP e o tamanho dos fragmentos gerados estão detalhados na TABELA 5.

TABELA 4 – Reagentes e concentrações utilizados nas reações de restrição dos 11 SNPs.

	rs732740 (1)	**rs 250413 (2) rs 250417 (8)**	**rs181832 (3) rs2287949 (7)**	**rs3776549 (4) rs40132 (10) rs3733808 (12)**	**rs3756462 (5)**	**rs26722 (6)**	**rs35394 (11)**
Produto de PCR	5uL	5uL	3uL	5uL	5uL	5uL	5uL
H_2O	8,5uL	4,25uL	4,25uL	4,25uL	4,25uL	4uL	4,2uL
Enzima	0,5uL	0,3uL	0,25uL	0,25uL	0,25uL	0,3uL	0,5uL
Tampão	1uL	0,5uL	0,5uL	0,5uL	0,5uL	0,7uL	0,3uL
Temperatura de incubação	37ºC	37ºC	37°C	37ºC	65°C	65°C	37°C
Tempo de incubação	15min	10-15min	5-15min	15min	5min	5min	5min

TABELA 5 - Enzimas de restrição e tamanhos dos fragmentos gerados para genotipagem dos 11 SNPs analisados por PCR-RFLP.

	Enzima	**Alelo clivado**	**Fragmentos gerados**	**Alelo não-clivado**	**Fragmentos gerados**
rs732740 (1)	*Msp*I	C	65 e 127 pb	T	192 pb
rs 250413 (2)	*Bsh1236*I	C	77 e 138 pb	T	215 pb
rs181832 (3)	*Sty*l (*Eco130*I)	C	44 e 63pb	T	107pb
rs3776549 (4)	*Nla*III	G	22, 40 e 96 pb	A	40 e 118 pb
rs3756462 (5)	*Tsp509*I	T	75 e 106pb	C	181pb
rs26722 (6)	*Taq*I	G	184 e 329pb	A	513pb
rs2287949 (7)	*Hae*III (*Bsu*RI)	G	14, 40 e 58pb	A	14 e 98pb
rs250417 (8)	*Nla*III	C	10, 41 e 80pb	G	10, 41 e 90pb
rs40132 (10)	*Nla*III	C	39 e 69pb	T	108pb
rs35394 (11)	*Msp*I	G	29 e 89pb	A	118pb
rs3733808 (12)	*Mva*I	C	15, 18, 39 e 50pb	G	15, 18 e 89pb

5.3.4 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA PARA GENOTIPAGEM DOS 12 POLIMORFISMOS

Para realizar a genotipagem das amostras, os produtos das reações de PCR foram avaliados através da separação eletroforética em gel de poliacrilamida 10%, a fim de se verificar se houve amplificação adequada. Excluindo-se o SNP rs16891982 (L374F), que foi genotipado por PCR alelo-específica, as amostras que apresentavam amplificação de boa qualidade eram submetidas a clivagem pelas respectivas enzimas de restrição.

Os produtos das reações de PCR alelo-específica e PCR-RFLP também foram avaliados por meio de separação eletroforética em gel de poliacrilamida 10%, preparado através da mistura (*mix*) de 6,66mL de solução de poliacrilamida (acrilamida 29% + bisacrilamida 1%), 9,74mL de água destilada, 2,0mL de TBE 10x, 1,4mL de glicerol, 15µL de TEMED e 500µL de persulfato de sódio. Duas placas de vidro (uma inteira e outra com borda recortada, onde será posicionado o "pente" para formar os poços onde serão colocadas as amostras) são colocadas uma sobre a outra com espaçadores de 7mm entre elas e no espaço formado aplica-se o *mix* de gel. Após a polimerização do gel entre as placas (aproximadamente 20 minutos), retira-se o “pente” e elas são colocadas em uma cuba de eletroforese vertical, adicionando-se tampão TBE 1x até que estejam totalmente cobertas. Em cada poço do gel, aplica-se de 3 a 5µL de produto de PCR, juntamente com 3µL de tampão de carregamento (*loadding buffer* – 12g de sacarose; Bromofenol 2,5%; Xilenocianol 2,5%; EDTA 0,5M pH 8,0; tampão TBE 10X; Ficol 30%). A cuba de eletroforese é conectada a uma fonte de eletroforese de alta voltagem e a separação dos fragmentos é realizada durante 40 a 75 minutos (dependendo dos tamanhos dos fragmentos gerados na PCR) a 250 Volts, com corrente liberada.

Após o término da eletroforese, o gel é retirado da cuba, separado das placas de vidro e corado para ser analisado em um suporte com iluminação. Dessa forma, é possível verificar se houve amplificação e realizar a genotipagem com base no tamanho dos fragmentos gerados. A coloração do gel é realizada mergulhando-se o gel em uma bandeja de vidro contendo solução fixadora (166,7mL de álcool etílico, 6,7mL de ácido acético e água qsp. 1L) mais 2mL nitrato de prata (0,1g/mL). Após 5 minutos de agitação, descarta-se tal solução, enxagua-se o gel com água morna e mergulha-se o gel em uma solução reveladora aquecida (2,25g de NaOH, 1,5mL de formaldeído e água qsp. 100mL) até que as bandas apareçam nitidamente. Retira-se a solução reveladora e acrescenta-se novamente solução fixadora, porém sem nitrato de prata (SANGUINETTI; DIAS NETO; SIMPSON, 1994). Após a análise do gel no suporte

iluminador, o mesmo é submetido a um procedimento de secagem para posteriores confirmações, no qual o gel é colocado entre duas folhas umedecidas de papel celofane transparente e deixado de um dia para o outro para que fique com aspecto plastificado.

5.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

5.4.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, HETEROZIGOSE E EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG

As frequências alélicas de cada SNP (tanto separadas por fenótipo quanto globalmente, por contagem direta) e a heterozigose esperada foram calculadas pelo programa Arlequin 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010).

A aderência das frequências genotípicas ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi verificada de pelo programa Arlequin 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010), usando o método de cadeia de Markov (GUO; THOMPSON, 1992) para estimar probabilidade de aderência com base em um total de 100.000 permutações (100 *batches* de 1.000 permutações), utilizando-se 10.000 passos de desmemorização. O Método de cadeia de Markov é um caminho para gerar uma distribuição de probabilidade exata sob a hipótese nula, que não é afetada por alelos raros ou pequeno tamanho amostral (ROUSSET; RAYMOND, 1995).

5.4.2 DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO E INFERÊNCIA COMPUTACIONAL DE HAPLÓTIPOS

Dada a diminuta distância física entre os SNPs considerados e a presença de desequilíbrio de ligação significativo entre eles (como será visto na seção de resultados), foram utilizados dois programas para a reconstrução dos haplótipos a partir dos dados de SNPs obtidos das amostras: o programa PL-EM (QIN; NIU; LIU, 2002) e o programa PHASE 2.1 (STEPHENS; SMITH; DONNELLY, 2001). Tal análise foi automatizada por meio do programa HaploRunner (castelli-lab.net/haplorunner.php), que facilita o processo de comparação dos resultados de múltiplas análises.

Os dois métodos diferem em termos dos modelos teóricos empregados para a reconstrução dos haplótipos e a intenção no uso de ambos foi baseada no fato de podermos comparar os cálculos realizados entre si. Dessa forma, observando-se os resultados de 10 análises distintas de cada método e fazendo a comparação dos valores de significância de cada reconstrução,

pode-se avaliar se foram bem sucedidas e não diferiram entre si. O programa PL-EM (QIN et al., 2002) utiliza o algoritmo EM (*Expectation-Maximization*) (EXCOFFIER; SLATKIN, 1995) para a reconstrução. Neste algoritmo, um processo probabilístico iterativo é utilizado objetivando-se obter estimativas de máxima verossimilhança das frequências haplotípicas a partir dos dados genotípicos de fase gamética desconhecida. Deste modo, o par de haplótipos mais provável de cada indivíduo é inferido considerando-se apenas aspectos probabilísticos (MARANO, 2011). O método PHASE se baseia em princípios de estatística Bayesiana associados a conceitos da teoria da coalescência. Assim, o par de haplótipos mais provável de cada indivíduo é inferido considerando-se não apenas aspectos probabilísticos, mas também aspectos evolutivos, ao atentar-se para a semelhança entre as sequências de DNA que compõem toda a amostra populacional (MARANO, 2011).

O desequilíbrio de ligação entre os *loci* estudados foi testado, antes da inferência de haplótipos, por meio do teste de razão de verossimilhança (EXCOFFIER; SLATKIN, 1998) implementado no programa Arlequin 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). O teste exato de desequilíbrio de ligação é uma extensão do teste exato de probabilidade de Fisher nas tabelas de contingência. Uma tabela de contingência é construída com as frequências haplotípicas observadas em um par de *loci*. O teste consiste em obter uma probabilidade de encontrar uma tabela com os mesmos totais marginais e que tenha uma probabilidade igual ou menor do que a tabela observada (ROUSSET; RAYMOND, 1995).

Após a reconstrução de haplótipos, com a fase gamética conhecida, coeficientes de medida de desequilíbrio de ligação entre pares de *loci* (D, D' e r^2) foram estimados com uso do programa Arlequin 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Estes coeficientes são computados entre todos os pares de alelos nos diferentes *loci* e sua computação assume que a fase gamética entre os alelos nos diferentes *loci* é conhecida. O coeficiente clássico de desequilíbrio de ligação (D) que mede o desvio da associação aleatória entre alelos nos diferentes *loci* (LEWONTIN; KOJIMA, 1960) é expresso por $D_{ij} = p_{ij} - p_i.p_j$; onde p_{ij} é a frequência do haplótipo tendo o alelo i no primeiro *locus* e j no segundo *locus*; e p_i e p_j são as frequências dos alelos i e j, respectivamente. Já o coeficiente de desequilíbrio de ligação (D'_{ij}) padronizado pelo máximo valor que esse pode assumir ($D_{ij,max}$), dadas as frequências alélicas (LEWONTIN, 1964), é

$$D'_{ij} = \frac{D_{ij}}{D_{ij,\max}},$$

onde $D_{ij,max}$ assume um dos seguintes valores: min ($p_i p_j$, (1-p_i)(1-p_j)) se $D_{ij} < 0$ ou min ((1-p_i) p_j, p_i(1-p_j)) se $D_{ij} > 0$. E, por fim, outra medida do desequilíbrio de ligação entre pares de alelos de diferentes *loci* é o quadrado do coeficiente de correlação entre as frequências alélicas (r^2), que pode ser expresso como uma função da medida *D*:

$$r^2 = \frac{D^2}{p_i(1-p_i)p_j(1-p_j)}.$$

5.4.3 ASSOCIAÇÕES DE FENÓTIPOS AOS GENÓTIPOS

O teste exato de Fisher, calculado pelo programa GraphPad InStat 3.06 (GRAPHPAD SOFTWARE, 2003), foi utilizado para averiguar a existência de associações entre alelos, genótipos ou haplótipos e um determinado fenótipo. Para determinar a intensidade desta associação foi realizado o cálculo de *Odds Ratio* e seu intervalo de confiança (IC) de 95% empregando-se o mesmo programa. Enquanto o teste exato de Fisher permite avaliar a significância estatística de uma determinada associação, o *Odds Ratio* permite quantificar a magnitude da associação entre um genótipo/alelo/haplótipo e determinado fenótipo (intensidade de pigmentação), por meio da razão entre a probabilidade de um indivíduo portador de um determinado genótipo/alelo/haplótipo apresentar uma determinada característica e a probabilidade de um indivíduo portador do mesmo genótipo/alelo/haplótipo não apresentar tal característica.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 AMOSTRA POPULACIONAL

Do total de 296 amostras coletadas, restaram 288 amostras adequadas à análise, após serem desconsideradas aquelas que não geraram dados viáveis, ou seja, não amplificaram mesmo após várias tentativas, incluindo mudanças nas concentrações de reagentes e no regime de temperaturas.

A classificação dos indivíduos quanto à ancestralidade, autoclassificação, cor dos cabelos, cor da pele, cor dos olhos e presença ou ausência de sardas está exposta na TABELA 6.

TABELA 6 - Descrição da população amostral composta por 288 indivíduos.

Ancestralidade	**Europeus**	**Brasileiros**	**Euro-brasileiros**	**Nativo-brasileiros**	**Afro-brasileiros**	**Asiáticos**
n	85	71	67	33	20	12
Autoclassificação	**Brancos**	**Negros**	**Mestiços**	**Asiáticos**	**Indígenas**	
n	210	38	26	13	1	
Cabelos	**Ruivos**	**Loiros**	**Castanhos**	**Pretos**		
n	7	38	147	96		
Olhos	**Azuis**	**Verdes**	**Mel**	**Castanho Claro**	**Castanho Escuro**	
n	25	75	13	68	107	
Pele	**Clara**	**Média**	**Escura**	**Sardas Presentes**	**Sardas Ausentes**	
n	153	94	41	242	46	

Nota. A ancestralidade foi baseada nos relatos de cada indivíduo sobre as origens de seus antepassados (avós e bisavós maternos e paternos). Europeus - indivíduos com os quatro ancestrais possuindo origem europeia (países mais citados: Itália, Portugal e Espanha). Brasileiros - indivíduos com todos os avós brasileiros, sem qualquer menção a uma origem indígena e/ou estrangeira. Euro-brasileiros - indivíduos que possuem avós com origens na Europa e avós cuja origem foi dita brasileira. Afro-brasileiros - indivíduos com no mínimo um avô ou avó de origem africana. Nativo-brasileiros - indivíduos com no mínimo um avô ou avó com ancestralidade indígena e sem qualquer relato de ancestrais de origem africana. Asiáticos - indivíduos que relataram descendência chinesa ou japonesa para os quatro avós.

6.2 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, HETEROZIGOSE E EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG

Considerando a definição de *locus* polimórfico como sendo o *locus* que possui frequência maior que 1% para o alelo menos frequente, dos 12 *loci* selecionados para esta pesquisa, dois deles (rs732740 e rs3733808) não apresentaram variação significativa nas amostras analisadas como um todo. O SNP rs3733808 apresentou apenas um alelo, sendo considerado monomórfico e o SNP rs732740 embora tenha apresentado dois alelos, não se ajustou a definição mencionada (a frequência do alelo menos frequente foi igual a 0,5%) de forma global. Os 10 *loci* restantes apresentaram variabilidade (bi-alélicos) e podem ser considerados polimórficos nesta amostra da população brasileira. Desse total (10 *loci* polimórficos), 8 poderiam ser considerados como variações comuns, já que possuem frequências superiores a 5% no alelo menos frequente.

As distribuições alélicas e genotípicas estão representadas nas TABELAS 7, 8 e 9. Desconsiderando-se o SNP rs3733808 (monomórfico), o menor valor de heterozigose observado (H_O) foi de 0,0111 no *locus* rs732740, enquanto o maior valor foi de 0,3259 no *locus* rs16891982. Já a heterozigose esperada (H_S) variou de 0,0110 até 0,4452 nos mesmos *loci*, respectivamente. Em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, observou-se que alguns sub-grupos populacionais apresentaram desvios do equilíbrio por deficiência de heterozigotos em 9 SNPs [rs732740 (1), rs250413 (2), rs181832 (3), rs3776549 (4), rs3756462 (5), rs2287949 (7), rs250417 (8), rs40132 (10) e rs35394 (11)] (TABELAS 7,8 e 9).

TABELA 7 - Frequências alélicas distribuídas na amostra total e nos grupos classificados pela cor dos cabelos.

SNP		Ruivo	Loiro	Castanho	Preto	Total
rs732740 (1)	C	0,0000	0,0139	0,0036	0,0057	0,0055
	T	1,0000	0,9861	0,9964	0,9943	0,9945
	2*n*	14	72	280	174	540
	*p*EHW	-	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	Ho	-	0,0278	0,0071	0,0115	0,0111
	Hs	-	0,0278	0,0071	0,0115	0,0110
rs250413 (2)	C	0,9286	0,9722	0,9750	0,9713	0,9722
	T	0,0714	0,0278	0,0250	0,0287	0,0278
	2*n*	14	72	280	174	540
	*p*EHW	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	Ho	0,1429	0,0556	0,0500	0,0575	0,0555
	Hs	0,1429	0,0548	0,0489	0,0561	0,0541

rs181832 (3)	C	0,0714	0,0139	0,0714	0,1322	0,0833
	T	0,9286	0,9861	0,9286	0,8678	0,9167
	2*n*	14	72	280	174	540
	*p*EHW	1,0000	1,0000	1,0000	0,3468	0,1470
	Ho	0,1429	0,0278	0,1429	0,2644	0,1666
	Hs	0,1429	0,0278	0,1331	0,2308	0,1530
rs3776549 (4)	A	0,0000	0,0556	0,0643	0,1035	0,0740
	G	1,0000	0,9444	0,9357	0,8966	0,9259
	2*n*	14	72	280	174	540
	*p*EHW	-	1,0000	0,4427	0,5897	0,4893
	Ho	-	0,1111	0,1143	0,2069	0,1407
	Hs	-	0,1064	0,1207	0,1866	0,1374
rs3756462 (5)	C	0,0000	0,0417	0,0357	0,0575	0,0425
	T	1,0000	0,9583	0,9643	0,9425	0,9574
	2*n*	14	72	280	174	540
	*p*EHW	-	1,0000	1,0000	1,0000	0,6094
	Ho	-	0,0833	0,0714	0,1149	0,0851
	Hs	-	0,0810	0,0691	0,1090	0,0817
rs26722 (6)	A	0,2143	0,0833	0,1214	0,1954	0,1425
	G	0,7857	0,9167	0,8786	0,8046	0,8574
	2*n*	14	72	280	174	540
	*p*EHW	1,0000	1,0000	0,2222	0,5092	0,2596
	Ho	0,4286	0,1667	0,2429	0,3448	0,2703
	Hs	0,3626	0,1549	0,2141	0,3163	0,2449
rs2287949 (7)	A	0,0714	0,0000	0,0500	0,1207	0,0666
	G	0,9286	1,0000	0,9500	0,8793	0,9333
	2*n*	14	72	280	174	540
	*p*EHW	1,0000	-	1,0000	0,3509	0,6424
	Ho	0,1429	-	0,1000	0,1954	0,1185
	Hs	0,1429	-	0,0953	0,2135	0,1246
rs250417 (8)	C	0,1429	0,0139	0,1214	0,2759	0,1574
	G	0,8571	0,9861	0,8786	0,7241	0,8425
	2*n*	14	72	280	174	540
	*p*EHW	1,0000	1,0000	1,0000	0,5900	0,8393
	Ho	0,2857	0,0278	0,2143	0,4368	0,2629
	Hs	0,2637	0,0278	0,2141	0,4018	0,2657
rs16891982 (9)	C	0,7857	0,9444	0,7571	0,3966	0,6666
	G	0,2143	0,0556	0,2429	0,6035	0,3333
	2*n*	14	72	280	174	540
	*p*EHW	0,2310	1,0000	1,0000	0,0238	0,0000
	Ho	0,1429	0,1111	0,3714	0,3563	0,3259
	Hs	0,3626	0,1064	0,3691	0,4814	0,4452

rs40132 (10)	C	0,0714	0,0139	0,0679	0,1494	0,0870
	T	0,9286	0,9861	0,9321	0,8506	0,9130
	2*n*	14	72	280	174	540
	*p*EHW	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,5395
	Ho	0,1429	0,0278	0,1357	0,2529	0,1592
	Hs	0,1429	0,0278	0,1270	0,2557	0,1592
rs35394 (11)	A	0,9286	0,9861	0,9321	0,8506	0,9130
	G	0,0714	0,0139	0,0679	0,1494	0,0870
	2*n*	14	72	280	174	540
	*p*EHW	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,3496
	Ho	0,1429	0,0278	0,1357	0,2529	0,1592
	Hs	0,1429	0,0278	0,1270	0,2557	0,1592

Nota. *p*EHW – probabilidade de aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg; *Ho* – Heterozigose Observada; *Hs* – Heterozigose Esperada.

TABELA 8 - Frequências alélicas distribuídas em grupos classificados pela cor dos olhos.

SNP		Azul	Verde	Mel	Castanho claro	Castanho escuro
rs732740 (1)	C	0,0000	0,0143	0,0000	0,0000	0,0051
	T	1,0000	0,9857	1,0000	1,0000	0,9949
	2*n*	48	140	26	130	196
	*p*EHW	-	1,0000	-	-	1,0000
	Ho	-	0,0286	-	-	0,0102
	Hs	-	0,0284	-	-	0,0102
rs250413 (2)	C	0,9792	0,9714	1,0000	0,9539	0,9796
	T	0,0208	0,0286	0,0000	0,0462	0,0204
	2*n*	48	140	26	130	196
	*p*EHW	1,0000	1,0000	-	1,0000	1,0000
	Ho	0,0417	0,0571	-	0,0923	0,0408
	Hs	0,0417	0,0559	-	0,0887	0,0402
rs181832 (3)	C	0,0417	0,0571	0,0000	0,0846	0,1225
	T	0,9583	0,9429	1,0000	0,9154	0,8776
	2*n*	48	140	26	130	196
	*p*EHW	1,0000	1,0000	-	1,0000	0,3501
	Ho	0,0833	0,1143	-	0,1692	0,2449
	Hs	0,0816	0,1085	-	0,1561	0,2160
rs3776549 (4)	A	0,0625	0,0429	0,0769	0,0846	0,0918
	G	0,9375	0,9571	0,9231	0,9154	0,9082
	2*n*	48	140	26	130	196
	*p*EHW	1,0000	1,0000	1,0000	0,3699	1,0000
	Ho	0,1250	0,0857	0,1539	0,1385	0,1837
	Hs	0,1197	0,0826	0,1477	0,1561	0,1677

rs3756462 (5)	C	0,0417	0,0214	0,0769	0,0385	0,0561
	T	0,9583	0,9786	0,9231	0,9615	0,9439
	2*n*	48	140	26	130	196
	*p*EHW	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	Ho	0,0833	0,0429	0,1539	0,0769	0,1122
	Hs	0,0816	0,0422	0,1477	0,0745	0,1065
rs26722 (6)	A	0,0833	0,1857	0,3077	0,0692	0,1531
	G	0,9167	0,8143	0,6923	0,9308	0,8469
	2*n*	48	140	26	130	196
	*p*EHW	1,0000	0,1054	0,2441	1,0000	1,0000
	Ho	0,1667	0,3714	0,6154	0,1385	0,2653
	Hs	0,1560	0,3046	0,4431	0,1299	0,2606
rs2287949 (7)	A	0,0000	0,0429	0,0000	0,0615	0,1122
	G	1,0000	0,9571	1,0000	0,9385	0,8878
	2*n*	48	140	26	130	196
	*p*EHW	-	1,0000	-	1,0000	0,3372
	Ho	-	0,0857	-	0,1231	0,1837
	Hs	-	0,0826	-	0,1164	0,2003
rs250417 (8)	C	0,0000	0,1214	0,1923	0,1154	0,2449
	G	1,0000	0,8786	0,8077	0,8846	0,7551
	2*n*	48	140	26	130	196
	*p*EHW	-	1,0000	1,0000	1,0000	0,7874
	Ho	-	0,2143	0,3846	0,2000	0,3878
	Hs	-	0,2149	0,3231	0,2057	0,3717
rs16891982 (9)	C	0,9167	0,7786	0,7692	0,7308	0,4694
	G	0,0833	0,2214	0,2308	0,2692	0,5306
	2*n*	48	140	26	130	196
	*p*EHW	1,0000	0,2980	0,5232	1,0000	0,0026
	Ho	0,1667	0,3000	0,3077	0,3846	0,3469
	Hs	0,1560	0,3473	0,3692	0,3965	0,5007
rs40132 (10)	C	0,0000	0,0714	0,1154	0,0692	0,1276
	T	1,0000	0,9286	0,8846	0,9308	0,8725
	2*n*	48	140	26	130	196
	*p*EHW	-	1,0000	1,0000	1,0000	0,6498
	Ho	-	0,1429	0,2308	0,1385	0,2143
	Hs	-	0,1336	0,2123	0,1299	0,2237
rs35394 (11)	A	1,0000	0,9286	0,8846	0,9308	0,8725
	G	0,0000	0,0714	0,1154	0,0692	0,1276
	2*n*	48	140	26	130	196
	*p*EHW	-	1,0000	1,0000	1,0000	0,6487
	Ho	-	0,1429	0,2308	0,1385	0,2143
	Hs	-	0,1336	0,2123	0,1299	0,2237

Nota. *p*EHW – probabilidade de aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg; *Ho* – Heterozigose Observada; *Hs* – Heterozigose Esperada.

TABELA 9 - Frequências alélicas distribuídas em grupos classificados pela cor da pele e pela presença ou ausência de sardas.

SNP		Clara	Média	Escura	Ausência de sardas	Presença de sardas
rs732740 (1)	C	0,0069	0,0000	0,0125	0,0044	0,0122
	T	0,9931	1,0000	0,9875	0,9956	0,9878
	2*n*	288	172	80	458	82
	*p*EHW	1,0000	-	1,0000	1,0000	1,0000
	Ho	0,0139	-	0,0250	0,0087	0,0244
	Hs	0,0138	-	0,0250	0,0087	0,0244
rs250413 (2)	C	0,9792	0,9535	0,9875	0,9716	0,9756
	T	0,0208	0,0465	0,0125	0,0284	0,0244
	2*n*	288	172	80	458	82
	*p*EHW	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	Ho	0,0417	0,0930	0,0250	0,0568	0,0488
	Hs	0,0409	0,0892	0,0250	0,0553	0,0482
rs181832 (3)	C	0,0347	0,1279	0,1625	0,0895	0,0488
	T	0,9653	0,8721	0,8375	0,9105	0,9512
	2*n*	288	172	80	458	82
	*p*EHW	1,0000	0,3443	0,5643	0,2279	1,0000
	Ho	0,0694	0,2558	0,3250	0,1790	0,0976
	Hs	0,0673	0,2244	0,2756	0,1634	0,0940
rs3776549 (4)	A	0,0590	0,0814	0,1125	0,0852	0,0122
	G	0,9410	0,9186	0,8875	0,9149	0,9878
	2*n*	288	172	80	458	82
	*p*EHW	0,3923	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	Ho	0,1042	0,1628	0,2250	0,1616	0,0244
	Hs	0,1115	0,1504	0,2022	0,1561	0,0244
rs3756462 (5)	C	0,0382	0,0523	0,0375	0,0480	0,0122
	T	0,9618	0,9477	0,9625	0,9520	0,9878
	2*n*	288	172	80	458	82
	*p*EHW	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	Ho	0,0764	0,1047	0,0750	0,0961	0,0244
	Hs	0,0737	0,0998	0,0731	0,0917	0,0244
rs26722 (6)	A	0,1424	0,1105	0,2125	0,1485	0,1098
	G	0,8576	0,8895	0,7875	0,8515	0,8902
	2*n*	288	172	80	458	82
	*p*EHW	0,0782	0,5890	1,0000	0,1849	1,0000
	Ho	0,2847	0,2209	0,3250	0,2795	0,2195
	Hs	0,2450	0,1977	0,3389	0,2534	0,1978

rs2287949 (7)	A	0,0313	0,0988	0,1250	0,0742	0,0244
	G	0,9688	0,9012	0,8750	0,9258	0,9756
	2*n*	288	172	80	458	82
	*p*EHW	1,0000	1,0000	0,0898	0,3512	1,0000
	Ho	0,0625	0,1977	0,1500	0,1310	0,0488
	Hs	0,0608	0,1792	0,2215	0,1378	0,0482
rs250417 (8)	C	0,0868	0,2151	0,2875	0,1725	0,0732
	G	0,9132	0,7849	0,7125	0,8275	0,9268
	2*n*	288	172	80	458	82
	*p*EHW	0,6009	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	Ho	0,1736	0,3372	0,4250	0,2838	0,1463
	Hs	0,1591	0,3397	0,4149	0,2861	0,1373
rs16891982 (9)	C	0,8368	0,5872	0,2250	0,6288	0,8781
	G	0,1632	0,4128	0,7750	0,3712	0,1220
	2*n*	288	172	80	458	82
	*p*EHW	0,2150	0,5134	0,0123	0,0002	0,4635
	Ho	0,2431	0,5233	0,2000	0,3493	0,1951
	Hs	0,2741	0,4876	0,3532	0,4678	0,2168
rs40132 (10)	C	0,0521	0,1163	0,1500	0,0939	0,0488
	T	0,9479	0,8837	0,8500	0,9061	0,9512
	2*n*	288	172	80	458	82
	*p*EHW	1,0000	0,5934	0,1882	1,0000	1,0000
	Ho	0,1042	0,2326	0,2000	0,1703	0,0976
	Hs	0,0991	0,2067	0,2582	0,1705	0,0940
rs35394 (11)	A	0,9479	0,8837	0,8500	0,9061	0,9512
	G	0,0521	0,1163	0,1500	0,0939	0,0488
	2*n*	288	172	80	458	82
	*p*EHW	1,0000	0,5940	0,1868	1,0000	1,0000
	Ho	0,1042	0,2326	0,2000	0,1703	0,0976
	Hs	0,0991	0,2067	0,2582	0,1705	0,0940

Nota. *p*EHW – probabilidade de aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg; *Ho* – Heterozigose Observada; *Hs* – Heterozigose Esperada.

6.3 DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO E INFERÊNCIA COMPUTACIONAL DE HAPLÓTIPOS

O teste de razão de verossimilhança, para avaliação de desequilíbrio de ligação (DL) entre pares de loci sem fase definida, indicou desequilíbrio significativo ($p < 0,05$) na maioria (89,1%) dos pares de *loci* considerados. A TABELA 10 mostra os valores de probabilidade obtidos por meio de tal teste.

TABELA 10 – Probabilidade do teste de razão de verossimilhança para avaliação de desequilíbrio de ligação entre os pares de *loci* polimórficos detectados no gene SLC45A2. Os valores significativos ($p < 0,05$) estão destacados em negrito. O desvio padrão foi menor do que 0,005 para todos os pares analisados.

LOCUS	rs732740 (1)	rs250413 (2)	rs181832 (3)	rs3776549 (4)	rs3756462 (5)	rs26722 (6)	rs2287949 (7)	rs250417 (8)	rs16891982 (9)	rs40132 (10)	rs35394 (11)
rs732740 (1)	*										
rs250413 (2)	**0,0491**	*									
rs181832 (3)	**0,0000**	**0,0000**	*								
rs3776549 (4)	**0,0000**	**0,0000**	**0,0003**	*							
rs3756462 (5)	0,6072	0,2749	0,8015	**0,0000**	*						
rs26722 (6)	**0,0004**	**0,0097**	**0,0018**	0,0644	**0,0245**	*					
rs2287949 (7)	**0,0003**	**0,0001**	**0,0000**	**0,0002**	0,3483	**0,0053**	*				
rs250417 (8)	**0,0060**	**0,0000**	**0,0000**	**0,0000**	**0,0108**	**0,0000**	**0,0000**	*			
rs16891982 (9)	**0,0026**	0,3945	**0,0000**	**0,0000**	**0,0186**	**0,0000**	**0,0000**	**0,0000**	*		
rs40132 (10)	**0,0007**	**0,0000**	**0,0000**	**0,0002**	**0,0006**	**0,0000**	**0,0001**	**0,0000**	**0,0000**	*	
rs35394 (11)	**0,0005**	**0,0004**	**0,0000**	**0,0001**	**0,0011**	**0,0000**	**0,0001**	**0,0000**	**0,0000**	**0,0000**	*

Foram utilizados os dados dos 12 SNPs nos 288 indivíduos para realizar a reconstrução dos haplótipos através dos algoritmos PHASE e EM. O algoritmo PHASE gerou 191 pares de haplótipos (66,32% do total) inferidos com probabilidade superior a 95%, sendo 149 deles (51,73% do total) com probabilidade de 100%, tendo-se obtido uma probabilidade média de 91,07%. O algoritmo EM gerou 223 pares (77,43% do total) com probabilidade superior a 95%, sendo 161 deles (55,90% do total) com probabilidade de 100%, tendo a probabilidade média de 94,96%.

Após as reconstruções, os resultados de 10 análises independentes de cada método foram comparados entre si. Não houve diferenças entre os resultados gerados por um mesmo método. Quando os resultados dos dois métodos foram comparados entre si para verificação das congruências, observou-se então que reconstruções de 15 indivíduos diferiam entre os métodos (5,2%), sendo essas amostras descartadas das análises subsequentes que envolvem haplótipos. A partir dessas alterações, o total de pares com possibilidade superior a 95% não sofreu alterações no PHASE nem no algoritmo EM, mas suas probabilidades médias aumentaram para 93,38% e 96,2% respectivamente. Estes valores asseguram a confiabilidade deste processo de inferência de haplótipos.

Foram então gerados 34 haplótipos distintos, sendo que o haplótipo hp9 é o mais frequente (58,3%). Além de ser o mais frequente, esse haplótipo é composto pelos alelos mais frequentes de cada *locus*. A nomenclatura dos haplótipos utilizada neste trabalho (hp33 até hp50) seguiu a classificação dos haplótipos previamente identificados por Yuasa, et al. 2006 (hp1 até hp32). Este conjunto de haplótipos resulta na codificação de quatro variantes proteicas distintas, determinadas pelos SNPs rs26722 (6), rs16891982 (9) e rs3733808 (12) (TABELA 11). Em termos de proteínas distintas, a proteína A, codificada por dez haplótipos distintos, é a mais frequente (61,48%), a proteína B, codificada por 12 haplótipos distintos é a segunda mais frequente (24,28%). As proteínas A e B representam mais de 85% da amostra total. A distribuição de haplótipos nos diferentes grupos classificados de acordo com a pigmentação dos cabelos, olhos e sardas estão representadas nas TABELAS 12, 13 e 14, respectivamente.

TABELA 11 – Sequência de DNA dos 34 haplótipos gerados (hp1 a hp50) a partir dos 12 *loci* analisados. A identificação dos SNPs é a mesma apresentada na Tabela 1. Os SNPs rs26722 (6), rs16891982 (9) e rs3733808 (12) geram mutações não-sinônimas, resultando em proteínas distintas. O *locus* rs3733808 (12) não apresentou variação.

Haplótipos		**SNPs**												**Proteína**
		(1)	**(2)**	**(3)**	**(4)**	**(5)**	**(6)**	**(7)**	**(8)**	**(9)**	**(10)**	**(11)**	**(12)**	
hp9	0,5830	T	C	T	G	T	**G**	G	G	**C**	T	A	G	**A1**
hp12	0,0037	T	C	C	G	T	**G**	G	G	**C**	T	A	G	**A2**
hp33	0,0056	T	T	T	G	T	**G**	G	G	**C**	T	A	G	**A3**
h10	0,0093	T	C	T	A	C	**G**	G	G	**C**	T	A	G	**A4**
hp39	0,0019	T	C	T	G	T	**G**	A	G	**C**	T	A	G	**A5**
hp40	0,0019	T	C	T	A	C	**G**	G	C	**C**	C	G	G	**A6**
hp41	0,0019	T	C	T	G	T	**G**	G	C	**C**	C	G	G	**A7**
hp43	0,0037	T	C	T	A	T	**G**	G	G	**C**	T	A	G	**A8**
hp45	0,0019	T	C	T	G	T	**G**	A	C	**C**	T	A	G	**A9**
hp13	0,0019	C	C	C	G	T	**G**	G	G	**C**	T	A	G	**A10**
hp1	0,0704	T	C	T	G	T	**G**	G	G	**G**	T	A	G	**B1**
hp15	0,0574	T	C	T	G	T	**G**	A	C	**G**	T	A	G	**B2**
hp2	0,0426	T	C	C	G	T	**G**	G	G	**G**	T	A	G	**B3**
hp7	0,0167	T	C	T	A	C	**G**	G	G	**G**	T	A	G	**B4**
hp4	0,0259	T	C	T	A	T	**G**	G	G	**G**	T	A	G	**B5**
hp34	0,0037	T	C	C	G	T	**G**	G	C	**G**	T	A	G	**B6**
hp6	0,0111	T	T	C	G	T	**G**	G	G	**G**	T	A	G	**B7**
hp35	0,0019	T	T	C	G	T	**G**	G	G	**G**	C	G	G	**B8**
hp29	0,0056	T	C	T	G	T	**G**	G	C	**G**	C	G	G	**B9**
hp38	0,0019	T	C	C	G	T	**G**	G	C	**G**	C	G	G	**B10**
hp18	0,0037	T	C	T	A	C	**G**	A	C	**G**	T	A	G	**B11**
hp46	0,0019	T	T	T	A	T	**G**	G	G	**G**	T	A	G	**B12**
hp25	0,0389	T	C	T	G	T	**A**	G	C	**G**	C	G	G	**C1**
hp27	0,0056	T	T	C	G	T	**A**	G	C	**G**	C	G	G	**C2**
hp37	0,0074	T	C	C	G	T	**A**	G	C	**G**	C	G	G	**C3**
hp26	0,0111	T	C	T	A	C	**A**	G	C	**G**	C	G	G	**C4**
hp42	0,0056	T	C	T	G	T	**A**	G	C	**G**	T	A	G	**C5**
hp44	0,0037	C	C	C	G	T	**A**	G	C	**G**	C	G	G	**C6**
hp47	0,0148	T	C	T	G	T	**A**	G	G	**G**	T	A	G	**C7**
hp48	0,0019	T	C	T	G	T	**A**	G	G	**G**	C	G	G	**C8**
hp50	0,0019	T	C	T	G	T	**A**	A	C	**G**	T	A	G	**C9**
hp36	0,0037	T	C	T	G	T	**A**	G	C	**C**	C	G	G	**D1**
hp14	0,0463	T	C	T	G	T	**A**	G	G	**C**	T	A	G	**D2**
hp49	0,0019	T	T	T	G	T	**A**	G	C	**C**	C	G	G	**D3**

TABELA 12 – Diversidade haplotípica e frequências dos 34 haplótipos e 4 proteínas inferidas na amostra total e nos grupos classificados pela cor dos cabelos.

Haplótipos	Proteínas	Ruivo (2*n* = 14)	Loiro (2*n* = 72)	Castanho (2*n* = 280)	Preto (2*n* = 174)	Total (2*n* = 540)
hp9	**A1**	0,6430	0,8060	0,6680	0,3510	0,5830
hp12	**A2**	-	-	0,0071	-	0,0037
hp33	**A3**	-	0,0278	0,0036	-	0,0056
h10	**A4**	-	0,0278	0,0071	0,0058	0,0093
hp39	**A5**	-	-	0,0036	-	0,0019
hp40	**A6**	-	-	-	0,0058	0,0019
hp41	**A7**	-	-	0,0036	-	0,0019
hp43	**A8**	-	0,0139	-	0,0058	0,0037
hp45	**A9**	-	-	0,0036	-	0,0019
hp13	**A10**	-	-	-	0,0058	0,0019
	A	0,6430	0,8755	0,6966	0,3742	0,6148
hp1	**B1**	-	0,0278	0,0393	0,1440	0,0704
hp15	**B2**	0,0714	-	0,0357	0,1150	0,0574
hp2	**B3**	0,0714	-	0,0321	0,0747	0,0426
hp7	**B4**	-	0,0139	0,0179	0,0172	0,0167
hp4	**B5**	-	-	0,0250	0,0402	0,0259
hp34	**B6**	-	-	0,0036	0,0058	0,0037
hp6	**B7**	-	-	0,0107	0,0172	0,0111
hp35	**B8**	-	-	-	0,0058	0,0019
hp29	**B9**	-	-	0,0071	0,0058	0,0056
hp38	**B10**	-	-	-	0,0058	0,0019
hp18	**B11**	-	-	0,0071	-	0,0037
hp46	**B12**	-	-	0,0036	-	0,0019
	B	0,1428	0,0417	0,1821	0,4315	0,2428
hp25	**C1**	-	-	0,0286	0,0747	0,0389
hp27	**C2**	-	-	0,0071	0,0058	0,0056
hp37	**C3**	-	-	0,0071	0,0115	0,0074
hp26	**C4**	-	-	0,0036	0,0287	0,0111
hp42	**C5**	-	-	0,0036	0,0115	0,0056
hp44	**C6**	-	0,0139	0,0036	-	0,0037
hp47	**C7**	0,0714	-	0,0071	0,0287	0,0148
hp48	**C8**	-	-	-	0,0058	0,0019
hp50	**C9**	-	-	-	0,0058	0,0019
	C	0,0714	0,0139	0,0607	0,1725	0,0909
hp36	**D1**	-	-	0,0071	-	0,0037
hp14	**D2**	0,0714	0,0694	0,0536	0,0230	0,0463
hp49	**D3**	0,0714	-	-	-	0,0019
	D	0,1428	0,0694	0,0607	0,0230	0,0519
Diversidade haplotípica		0,6044 ± 0,1499	0,3482 ± 0,0716	0,5468 ± 0,0361	0,8318 ± 0,0209	0,6454 ± 0,0232

TABELA 13 – Diversidade haplotípica e frequências dos 34 haplótipos e 4 proteínas inferidas nos grupos classificados pela cor dos olhos.

Haplótipos	Proteínas	Azul (2*n* = 48)	Verde (2*n* = 140)	Mel (2*n* = 26)	Castanho claro (2*n* = 130)	Castanho escuro (2*n* = 196)
hp9	**A1**	0,8120	0,6360	0,5770	0,6690	0,4340
hp12	**A2**	-	0,0071	-	0,0077	-
hp33	**A3**	-	0,0214	-	-	-
h10	**A4**	0,0208	0,0071	-	0,0077	0,0102
hp39	**A5**	-	-	-	0,0077	-
hp40	**A6**	-	-	-	-	0,0051
hp41	**A7**	-	-	0,0385	-	-
hp43	**A8**	-	-	-	0,0154	-
hp45	**A9**	-	-	-	-	0,0051
hp13	**A10**	-	-	-	-	0,0051
	A	0,8328	0,6716	0,6155	0,7075	0,4595
hp1	**B1**	-	0,0357	0,0769	0,0538	0,1220
hp15	**B2**	-	0,0429	-	0,0462	0,0969
hp2	**B3**	0,0208	0,0143	-	0,0308	0,0816
hp7	**B4**	0,0208	0,0143	-	0,0231	0,0153
hp4	**B5**	0,0208	0,0214	-	0,0231	0,0357
hp34	**B6**	-	0,0071	-	-	0,0051
hp6	**B7**	0,0208	0,0071	-	0,0154	0,0102
hp35	**B8**	-	-	-	0,0077	-
hp29	**B9**	-	-	-	0,0077	0,0102
hp38	**B10**	-	-	-	-	0,0051
hp18	**B11**	-	-	-	0,0077	0,0051
hp46	**B12**	-	-	-	0,0077	-
	B	0,0832	0,1428	0,0769	0,2232	0,3872
hp25	**C1**	-	0,0429	-	0,0154	0,0663
hp27	**C2**	-	-	-	0,0077	0,0102
hp37	**C3**	-	0,0071	-	0,0154	0,0051
hp26	**C4**	-	-	0,0769	-	0,0204
hp42	**C5**	-	-	0,0769	-	0,0051
hp44	**C6**	-	0,0143	-	-	-
hp47	**C7**	-	0,0143	-	0,0077	0,0255
hp48	**C8**	-	-	-	-	0,0051
hp50	**C9**	-	-	-	-	0,0051
	C	-	0,0786	0,1538	0,0462	0,1428
hp36	**D1**	-	0,0071	-	0,0077	-
hp14	**D2**	0,0833	0,1000	0,1540	0,0077	0,0102
hp49	**D3**	-	-	-	0,0077	-
	D	0,0833	0,1071	0,1540	0,0231	0,0102
Diversidade haplotípica		0,3378 ± 0,0864	0,5830 ± 0,0481	0,6492 ± 0,0948	0,5476 ± 0,0532	0,7771 ± 0,0264

TABELA 14 – Diversidade haplotípica e frequências dos 34 haplótipos e 4 proteínas inferidas nos grupos classificados pela cor da pele e pela presença ou ausência de sardas.

Haplótipos	Proteínas	Clara (2*n* = 288)	Média (2*n* = 172)	Escura (2*n* = 80)	Ausência de sardas (2*n* = 458)	Presença de sardas (2*n* = 82)
hp9	**A1**	0,7150	0,5470	0,1880	0,5460	0,7930
hp12	**A2**	0,0035	0,0058	-	0,0044	-
hp33	**A3**	0,0069	0,0058	-	0,0044	0,0122
h10	**A4**	0,0139	0,0058	-	0,0109	-
hp39	**A5**	0,0035	-	-	0,0022	-
hp40	**A6**	-	0,0058	-	0,0022	-
hp41	**A7**	0,0035	-	-	0,0022	-
hp43	**A8**	0,0035	-	0,0125	0,0044	-
hp45	**A9**	-	0,0058	-	0,0022	-
hp13	**A10**	-	-	0,0125	0,0022	-
	A	0,7498	0,5760	0,2130	0,5811	0,8052
hp1	**B1**	0,0278	0,0698	0,2250	0,0764	0,0366
hp15	**B2**	0,0278	0,0814	0,1130	0,0633	0,0244
hp2	**B3**	0,0104	0,0640	0,1130	0,0459	0,0244
hp7	**B4**	0,0139	0,0233	0,0125	0,0197	-
hp4	**B5**	0,0139	0,0291	0,0625	0,0306	-
hp34	**B6**	0,0035	-	0,0125	0,0044	-
hp6	**B7**	0,0069	0,0174	0,0125	0,0131	-
hp35	**B8**	-	0,0058	-	0,0022	-
hp29	**B9**	-	0,0116	0,0125	0,0066	-
hp38	**B10**	-	-	0,0125	0,0022	-
hp18	**B11**	-	0,0116	-	0,0044	-
hp46	**B12**	0,0035	-	-	0,0022	-
	B	0,1077	0,3140	0,5760	0,2710	0,0854
hp25	**C1**	0,0208	0,0465	0,0875	0,0459	-
hp27	**C2**	-	0,0174	-	0,0066	-
hp37	**C3**	0,0035	0,0174	-	0,0066	0,0122
hp26	**C4**	0,0104	0,0058	0,0250	0,0109	0,0122
hp42	**C5**	0,0035	0,0058	0,0125	0,0066	-
hp44	**C6**	0,0069	-	-	0,0022	0,0122
hp47	**C7**	0,0104	0,0058	0,0500	0,0175	-
hp48	**C8**	-	-	0,0125	0,0022	-
hp50	**C9**	-	-	0,0125	0,0022	-
	C	0,0555	0,0987	0,2000	0,1007	0,0366
hp36	**D1**	0,0035	0,0058	-	0,0044	-
hp14	**D2**	0,0799	0,0058	0,0125	0,0437	0,0610
hp49	**D3**	0,0035	-	-	-	0,0122
	D	0,0869	0,0116	0,0125	0,0481	0,0732
Diversidade haplotípica		0,4805 ± 0,0363	0,6846 ± 0,0382	0,8835 ± 0,0177	0,6852 ± 0,0236	0,3692 ± 0,0681

Do total de 55 pares de SNPs gerados, 21 deles não apresentaram alto desequilíbrio de ligação (*D'* < 0,5) (TABELA 15), apesar de 12 desses 21 terem valores de *p* significativos. O coeficiente *D'* é uma padronização do coeficiente clássico de desequilíbrio (*D*), visto que *D* pode assumir valores negativos, mas as frequências gaméticas reais não podem. Pares de SNPs com valor baixo de *D'* indicam ausência de desequilíbrio e pares de SNPs com valor alto de *D'*, indicam desequilíbrio elevado (*D'* = 1 significa completo desequilíbrio de ligação). O r^2 é o coeficiente de correlação entre as frequências e pode variar de zero a um, sendo $r^2 = 1$ quando os dois loci apresentam informações idênticas (perfeito desequilíbrio de ligação) e $r^2 = 0$ quando estão em perfeito equilíbrio. Apenas um dos pares de SNPs (rs40132 e rs35394) apresentou perfeito desequilíbrio (*D'* = 1 e $r^2 = 1$).

TABELA 15 – Pares de SNPs analisados (SNP1 e SNP2), seus respectivos alelos em desequilíbrio de ligação, valores de *D'*, r^2, χ^2 e *p*.

SNP1	alelo	SNP2	alelo	*D'*	r^2	χ^2	*p*
rs732740 (1)	C	rs250413 (2)	T	1,0000	0,0002	0,0862	0,7691
rs732740 (1)	T	rs181832 (3)	C	1,0000	0,0615	33,1844	0,0000
rs250413 (2)	C	rs181832 (3)	C	0,6364	0,1273	68,7273	0,0000
rs732740 (1)	C	rs3776549 (4)	A	1,0000	0,0004	0,2413	0,6232
rs250413 (2)	T	rs3776549 (4)	A	0,1000	0,0000	0,0123	0,9115
rs181832 (3)	C	rs3776549 (4)	A	1,0000	0,0073	3,9273	0,0475
rs732740 (1)	C	rs3756462 (5)	C	1,0000	0,0002	0,1342	0,7141
rs250413 (2)	T	rs3756462 (5)	C	1,0000	0,0013	0,6864	0,4074
rs181832 (3)	C	rs3756462 (5)	C	1,0000	0,0040	2,1839	0,1395
rs3776549 (4)	G	rs3756462 (5)	C	1,0000	0,5561	300,2901	0,0000
rs732740 (1)	T	rs26722 (6)	A	0,6112	0,0126	6,7771	0,0092
rs250413 (2)	C	rs26722 (6)	A	0,1447	0,0036	1,9427	0,1634
rs181832 (3)	T	rs26722 (6)	A	0,0670	0,0025	1,3233	0,2500
rs3776549 (4)	G	rs26722 (6)	A	0,0086	0,0000	0,0194	0,8893
rs3756462 (5)	T	rs26722 (6)	A	0,1379	0,0051	2,7488	0,0973
rs732740 (1)	C	rs2287949 (7)	A	1,0000	0,0004	0,2155	0,6425
rs250413 (2)	T	rs2287949 (7)	A	1,0000	0,0020	1,1020	0,2938
rs181832 (3)	C	rs2287949 (7)	A	1,0000	0,0065	3,5065	0,0611
rs3776549 (4)	A	rs2287949 (7)	A	0,2500	0,0004	0,1929	0,6605
rs3756462 (5)	T	rs2287949 (7)	A	0,0217	0,0003	0,1589	0,6901
rs26722 (6)	A	rs2287949 (7)	A	0,8052	0,0077	4,1589	0,0414
rs732740 (1)	T	rs250417 (8)	C	0,6044	0,0109	5,8990	0,0151
rs250413 (2)	C	rs250417 (8)	C	0,1297	0,0026	1,3887	0,2386

rs181832 (3)	T	rs250417 (8)	C	0,1297	0,0082	4,4185	0,0356
rs3776549 (4)	G	rs250417 (8)	C	0,0802	0,0028	1,4881	0,2225
rs3756462 (5)	T	rs250417 (8)	C	0,2776	0,0184	9,9092	0,0016
rs26722 (6)	G	rs250417 (8)	C	0,4760	0,2017	108,8989	0,0000
rs2287949 (7)	G	rs250417 (8)	C	0,9670	0,3576	193,0815	0,0000
rs732740 (1)	T	rs16891982 (9)	G	0,5000	0,0028	1,5084	0,2194
rs250413 (2)	C	rs16891982 (9)	G	0,6000	0,0206	11,1086	0,0009
rs181832 (3)	T	rs16891982 (9)	G	0,9000	0,1473	79,5273	0,0000
rs3776549 (4)	G	rs16891982 (9)	G	0,7000	0,0784	42,3360	0,0000
rs3756462 (5)	T	rs16891982 (9)	G	0,6087	0,0330	17,8017	0,0000
rs26722 (6)	G	rs16891982 (9)	G	0,4545	0,0687	37,1098	0,0000
rs2287949 (7)	G	rs16891982 (9)	G	0,9167	0,1200	64,8214	0,0000
rs250417 (8)	G	rs16891982 (9)	G	0,8941	0,2987	161,2949	0,0000
rs732740 (1)	T	rs40132 (10)	C	0,6349	0,0236	12,7551	0,0004
rs250413 (2)	C	rs40132 (10)	C	0,2698	0,0218	11,7783	0,0006
rs181832 (3)	T	rs40132 (10)	C	0,1724	0,0283	15,3071	0,0001
rs3776549 (4)	G	rs40132 (10)	C	0,0963	0,0078	4,2066	0,0403
rs3756462 (5)	T	rs40132 (10)	C	0,2380	0,0264	14,2770	0,0002
rs26722 (6)	G	rs40132 (10)	C	0,8263	0,3914	211,3513	0,0000
rs2287949 (7)	A	rs40132 (10)	C	1,0000	0,0068	3,6772	0,0552
rs250417 (8)	G	rs40132 (10)	C	0,9495	0,4601	248,4418	0,0000
rs16891982 (9)	C	rs40132 (10)	C	0,8404	0,1347	72,7232	0,0000
rs732740 (1)	T	rs35394 (11)	G	0,6349	0,0236	12,7551	0,0004
rs250413 (2)	C	rs35394 (11)	G	0,2698	0,0218	11,7783	0,0006
rs181832 (3)	T	rs35394 (11)	G	0,1724	0,0283	15,3071	0,0001
rs3776549 (4)	G	rs35394 (11)	G	0,0963	0,0078	4,2066	0,0403
rs3756462 (5)	T	rs35394 (11)	G	0,2380	0,0264	14,2770	0,0002
rs26722 (6)	G	rs35394 (11)	G	0,8263	0,3914	211,3513	0,0000
rs2287949 (7)	A	rs35394 (11)	G	1,0000	0,0068	3,6772	0,0552
rs250417 (8)	G	rs35394 (11)	G	0,9495	0,4601	248,4418	0,0000
rs16891982 (9)	C	rs35394 (11)	G	0,8404	0,1347	72,7232	0,0000
rs40132 (10)	T	rs35394 (11)	G	1,0000	1,0000	540,0000	0,0000

6.4 ASSOCIAÇÕES ENCONTRADAS

As associações entre alelos/genótipos/haplótipos/proteínas e fenótipos foram avaliadas e representadas pelos respectivos valores de significância (*p*) obtidos através do teste exato de Fisher e seus valores de *Odds Ratio* (OR). A TABELA 16 mostra as associações

significativas com valores de probabilidade inferiores a 5% para alelos e genótipos. O SNP rs3733808 foi considerado monomórfico e por esta razão não entrou nesta análise. Os SNPs rs732740, rs250413 e rs3756462 não apresentaram associações significativas com nenhuma das características avaliadas. Também não foram observados nesses SNPs valores de *p* menores que 0,1 que pudessem indicar possíveis tendências de associação.

TABELA 16 - Alelos e genótipos dos SNPs do gene SLC45A2 associados com as características fenotípicas avaliadas. Com o objetivo de simplificar a tabela, somente as associações significativas e com valores de OR maiores que 1,0 estão relacionadas.

SNPs	Alelo ou Genótipo	Características	Valor de *p*	*Odds Ratio* (95% IC)
rs181832 (3)	T	cabelos loiros	0,0085	8,5570 (1,1649–62,8591)
		cabelos ruivos + loiros	0,0092	5,0691 (1,2109-21,2206)
		olhos azuis + verdes	0,0145	2,3641 (1,1595–4,8202)
		pele clara	$7,17x10^{-6}$	4,2319 (2,1702–8,2523)
	C	cabelos pretos	0,0006	2,7770 (1,5584–4,9485)
		cabelos castanhos + pretos	0,0092	5,0691 (1,2109-21,2206)
		olhos castanho-escuros	0,0023	2,5049 (1,4043–4,4681)
		olhos castanhos	0,0017	2,9182 (1,4328-5,9436)
		pele média	0,0080	2,2222 (1,2513-3,9466)
		pele escura	0,0113	2,4598 (1,2667–4,7765)
	TT	cabelos loiros	0,0056	9,5303 (1,2770-71,1260)
		cabelos ruivos + loiros	0,0062	5,5990 (1,3114-23,9052)
		olhos azuis + verdes	0,0101	2,5603 (1,2236-5,3570)
		pele clara	$2,35x10^{-6}$	4,9123 (2,4498-9,8499)
	CT	cabelos pretos	0,0003	3,1616 (1,7073-5,8548)
		cabelos castanhos + pretos	0,0062	5,5990 (1,3114-23,9052)
		olhos castanho-escuros	0,0013	2,7981 (1,5145-5,1698)
		olhos castanhos	0,0015	3,2211 (1,5425-6,7263)
		pele média	0,0052	2,4559 (1,3313-4,5306)
		pele escura	0,0075	2,8382 (1,3647-5,9029)
rs3776549 (4)	AG	cabelos pretos	0,0494	1,8787 (1,0095-3,4963)
rs26722 (6)	G	olhos castanho-claros	0,0099	2,3098 (1,2148–4,3919)
	A	cabelos pretos	0,0350	1,6889 (1,0604–2,6898)
	GG	olhos castanho-claros	0,0095	2,4706 (1,2444-4,9050)
		olhos castanhos	0,0106	2,0000 (1,1861-3,3723)
	AG	olhos verdes	0,0097	2,1497 (1,2143-3,8058)
		olhos mel	0,0127	4,2444 (1,3443-13,4015)
	AA	olhos castanho-escuros	0,0180	15,9442 (0,8495-299,2434)
		cabelos pretos	0,0113	19,0800 (1,0160-358,3172)

rs2287949 (7)	G	cabelos loiros	0,0035	13,8787 (0,8449–227,9895)
		cabelos ruivos + loiros	0,0124	8,0180 (1,0880-59,0874)
		olhos azuis	0,0397	8,6691 (0,5253-143,0568)
		olhos azuis + verdes	0,0057	3,2845 (1,3570–7,9494)
		pele clara	0,0001	3,8134 (1,8323–7,9364)
	A	cabelos pretos	0,0002	3,4244 (1,7812–6,5835)
		cabelos castanhos + pretos	0,0124	8,0180 (1,0880-59,0874)
		olhos castanhos	0,0007	4,0370 (1,6694-9,7628)
		olhos castanho-escuros	0,0006	3,1809 (1,6443–6,1534)
		pele média	0,0368	2,0692 (1,0921-3,9204)
		pele escura	0,0331	2,3859 (1,1445–4,9740)
	GG	cabelos loiros	0,0041	14,4489 (0,8696-240,0851)
		cabelos ruivos + loiros	0,0155	8,1961 (1,0958-61,3007)
		olhos azuis	0,0325	9,0134 (0,5377-151,0990)
		olhos azuis + verdes	0,0064	3,3000 (1,3323-8,1741)
		pele clara	0,0003	3,8849 (1,8141-8,3196)
	AG	cabelos pretos	0,0024	3,0625 (1,5141-6,1944)
		cabelos castanhos + pretos	0,0152	7,6893 (1,0267-57,5882)
		olhos castanhos	0,0020	3,8032 (1,5318-9,4432)
		olhos castanho-escuros	0,0036	2,8471 (1,4046-5,7708)
		pele média	0,0046	2,7981 (1,3877-5,6418)
	AA	pele escura	0,0200	31,2025 (1,4705-662,0802)
rs250417 (8)	G	cabelos loiros	$8{,}96 \times 10^{-6}$	17,6599 (2,4235–128,6861)
		cabelos ruivos + loiros	$4{,}33 \times 10^{-5}$	6,9529 (2,1506-22,4782)
		cabelos castanhos	0,0078	1,8346 (1,1767-2,8604)
		olhos azuis	0,0002	22,0584 (1,3478–361,0154)
		olhos azuis + verdes	0,0004	2,5932 (1,5044-4,4700)
		pele clara	$7{,}65 \times 10^{-7}$	3,1983 (1,9986–5,1180)
	C	cabelos castanhos	0,0009	2,3034 (1,3947-3,8041)
		cabelos pretos	$4{,}20 \times 10^{-8}$	3,4944 (2,2338–5,4662)
		olhos castanho-escuros	$6{,}63 \times 10^{-6}$	2,8021 (1,7977–4,3675)
		pele média	0,0014	2,0769 (1,3359-3,2289)
		pele escura	0,0112	2,0825 (1,2130–3,5754)
	GG	cabelos loiros	$1{,}11 \times 10^{-5}$	19,8408 (2,6725-147,2960)
		cabelos ruivos + loiros	0,0001	7,6316 (2,2929-25,4006)
		cabelos castanhos	0,0154	1,8882 (1,1352-3,1409)
		olhos azuis	0,0001	25,0944 (1,5067-417,9586)
		olhos azuis + verdes	0,0004	2,8752 (1,57555,2472)
		pele clara	$6{,}32 \times 10^{-6}$	3,3541 (1,9761-5,6931)
	CG	cabelos castanhos	0,0098	2,1366 (1,2082-3,7786)
		cabelos pretos	$7{,}91 \times 10^{-6}$	3,4075 (1,9872-5,8429)
		olhos castanho-escuros	0,0004	2,6049 (1,5346-4,4215)
		pele média	0,0358	1,8312 (1,0733-3,1244)
	CC	cabelos pretos	0,0085	7,2360 (1,4731-35,5441)
		olhos castanho-escuros	0,0293	6,0550 (1,2340-29,7111)

rs16891982 (9)	C (374F)	cabelos loiros	$2,32x10^{-10}$	11,4653 (4,1224–31,8876)
		cabelos ruivos + loiros	$7,83x10^{-10}$	7,4781 (3,3824-16,5335)
		cabelos castanhos	$1,16x10^{-6}$	2,4107 (1,6899-3,4387)
		olhos azuis	$1,45x10^{-5}$	6,7462 (2,3915–19,0301)
		olhos verdes	0,0001	2,3685 (1,5226-3,6844)
		olhos azuis + verdes	$6,94x10^{-10}$	3,4822 (2,2911-5,2928)
		pele clara	$2,13x10^{-21}$	5,8800 (3,9967–8,6507)
		presença de sardas	$9,19x10^{-5}$	3,0333 (1,6913–5,4402)
	G (374L)	cabelos pretos	$4,61x10^{-21}$	5,8764 (4,0177–8,5950)
		cabelos castanhos + pretos	$7,83x10^{-10}$	7,4781 (3,3824-16,5335)
		olhos castanho-escuros	$2,12x10^{-14}$	4,0773 (2,8291–5,8762)
		olhos castanhos	$1,68x10^{-10}$	3,4749 (2,3311-5,1799)
		pele média	0,0007	1,8722 (1,3040-2,6879)
		pele escura	$3,17x10^{-17}$	8,5414 (4,9765–14,6597)
		ausência de sardas	$9,19x10^{-5}$	3,0333 (1,6913–5,4402)
	CC	cabelos loiros	$3,14x10^{-8}$	11,5762 (3,9858-33,6212)
		cabelos ruivos + loiros	$2,20x10^{-8}$	8,8416 (3,6015-21,7059)
		cabelos castanhos	0,0067	1,9181 (1,1988-3,0692)
		olhos azuis	0,0002	6,3623 (2,1249-19,0500)
		olhos verdes	0,0019	2,3775 (1,3711-4,1226)
		olhos azuis + verdes	$4,79x10^{-7}$	3,7352 (2,2184-6,2892)
		pele clara	$2,11x10^{-15}$	7,5193 (4,4412-12,7307)
		presença de sardas	0,0034	2,7269 (1,3811-5,3839)
	CG	cabelos castanhos + pretos	0,0004	4,7840 (1,8199-12,5760)
		olhos castanhos	0,0399	1,7586 (1,0440-2,9625)
		pele média	$9,34x10^{-6}$	3,2667 (1,9420-5,4950)
	GG	cabelos pretos	$1,74x10^{-13}$	12,5614 (5,9079-26,7083)
		cabelos castanhos + pretos	0,0020	10,9171 (1,4668-81,2549)
		olhos castanho-escuros	$1,63x10^{-9}$	7,5095 (3,7047-15,2219)
		olhos castanhos	$1,06x10^{-5}$	5,7778 (2,3707-14,0814)
		pele escura	$4,94x10^{-14}$	17,2957 (8,0612-37,1087)
		ausência de sardas	0,0021	11,2292 (1,5094-83,5375)
rs40132 (10)	T	cabelos loiros	0,0022	10,3211 (1,4089–75,6071)
		cabelos ruivos + loiros	0,0025	6,1371 (1,4719-25,5884)
		cabelos castanhos	0,0415	1,8079 (1,0471-3,1214)
		olhos azuis	0,0063	13,4594 (0,8200-220,9306)
		olhos azuis + verdes	0,0042	2,5795 (1,3105–5,0773)
		pele clara	0,0027	2,3271 (1,3344–4,0585)
	C	cabelos pretos	$2,11x10^{-5}$	3,2769 (1,9022–5,6451)
		cabelos castanhos + pretos	0,0025	6,1371 (1,4719-25,5884)
		olhos castanho-escuros	0,0011	2,4968 (1,4564–4,2803)
		olhos castanhos	0,0079	2,3046 (1,2369-4,2939)
		pele média	0,0298	1,8614 (1,0878–3,1851)

rs40132 (10)	TT	cabelos loiros	0,0020	10,7917 (1,4482-80,4172)
		cabelos ruivos + loiros	0,0037	6,3575 (1,4923-27,0848)
		olhos azuis	0,0065	14,3399 (0,8598-239,1622)
		olhos azuis + verdes	0,0079	2,5621 (1,2598-5,2107)
		pele clara	0,0011	2,7216 (1,4790-5,0085)
	TC	cabelos pretos	0,0020	2,7176 (1,4784-4,9956)
		cabelos castanhos + pretos	0,0060	5,7711 (1,3523-24,6290)
		olhos castanho-escuros	0,0281	1,9861 (1,0871-3,6283)
		olhos castanhos	0,0432	1,9869 (1,0229-3,8591)
		pele média	0,0011	2,8339 (1,5399-5,2155)
	CC	cabelos pretos	0,0122	18,5351 (0,9875-347,9117)
		olhos castanho-escuros	0,0189	15,6087 (0,8320-292,8226)
rs35394 (11)	A	cabelos loiros	0,0022	10,1899 (1,3909-74,6525)
		cabelos ruivos + loiros	0,0025	6,0849 (1,4594-25,3699)
		cabelo castanhos	0,0222	1,8927 (1,0987-3,2602)
		olhos azuis	0,0037	13,7079 (0,8353-224,9711)
		olhos azuis + verdes	0,0042	2,6392 (1,3422-5,1892)
		pele clara	0,0018	2,3957 (1,3765-4,1696)
	G	cabelos pretos	$1,2 \times 10^{-5}$	3,3897 (1,9726-5,8247)
		cabelos castanhos + pretos	0,0025	6,0849 (1,4594-25,3699)
		olhos castanho-escuros	0,0007	2,5825 (1,5106-4,4152)
		olhos castanhos	0,0056	2,3614 (1,2691-4,3940)
		pele média	0,0212	1,9400 (1,1386-3,3054)
	AA	cabelos loiros	0,0033	10,4456 (1,4008-77,8922)
		cabelos ruivos + loiros	0,0036	6,1765 (1,4488-26,3317)
		olhos azuis	0,0065	14,3399 (0,8598-239,1622)
		olhos azuis + verdes	0,0079	2,5621 (1,2598-5,2107)
		pele clara	0,0011	2,7216 (1,4790-5,0085)
	AG	cabelos pretos	0,0032	2,5826 (1,4001-4,7640)
		cabelos castanhos + pretos	0,0096	5,4688 (1,2799-23,3664)
		olhos castanho-escuros	0,041	1,8889 (1,0298-3,4648)
		pele média	0,0018	2,6919 (1,4577-4,9713)
	GG	olhos castanho-escuros	0,0069	19,2634 (1,0544-351,9247)

A TABELA 17 mostra as associações significativas com valores de probabilidade inferiores a 5% para haplótipos e proteínas. O haplótipo que mostrou maior número de associações significativas foi o haplótipo hp9, associado com características claras. A proteína A se mostrou fortemente associada com características fenotípicas claras: cabelos loiros ($p = 4,06 \times 10^{-7}$; OR = 5,1784), olhos azuis ($p = 0,0009$; OR = 3,4247), pele clara ($p = 5,87 \times 10^{-12}$; OR = 3,5172) e presença de sardas ($p = 0,0001$; OR = 2,9774). Por outro lado, a proteína B se

mostrou fortemente associada com características fenotípicas escuras: cabelos pretos (*p* = 9,17 x 10-12; OR = 4,1937), olhos castanho escuros (*p* = 6,01 x 10-9; OR = 3,3279), pele escura (*p* = 2,94 x 10-12; OR = 5,9689) e ausência de sardas (*p* = 0,0001; OR = 3,9778). As proteínas C e D, também se mostraram associadas a fenótipos escuros e claros, respectivamente.

TABELA 17 - Haplótipos e proteínas do gene SLC45A2 associados com as características fenotípicas avaliadas. Com o objetivo de simplificar a tabela, somente as associações significativas e com valores de OR maiores que 1,0 estão relacionadas.

Haplótipo	Proteína	Características		Valor de *p*	Odds Ratio (95% IC)	
hp9	**A1**	Cabelos	Loiros	$3,08 \times 10^{-5}$	3,4013	(1,8456-6,2685)
hp9	**A1**	Cabelos	Ruivos+Loiros	$4,42 \times 10^{-5}$	2,9291	(1,7037-5,0359)
hp9	**A1**	Cabelos	Castanhos	$3,97 \times 10^{-5}$	2,0736	(1,4645-2,9361)
hp9	**A1**	Olhos	Azul	0,0006	3,3913	(1,6078-7,1532)
hp9	**A1**	Olhos	Castanho-claro	0,0248	1,6151	(1,0675-2,4435)
hp9	**A1**	Olhos	Azul+Verde	0,0009	1,8824	(1,2985-2,7287)
hp9	**A1**	Pele	Clara	$3,83 \times 10^{-11}$	3,2958	(2,3058-4,7108)
hp9	**A1**	Sardas	Sim	$2,8 \times 10^{-5}$	3,1812	(1,8086-5,5955)
hp33	**A3**	Cabelos	Loiros	0,0481	13,3429	(1,1941-149,0893)
hp33	**A3**	Olhos	Verde	0,0171	20,3891	(1,0465-397,2290)
hp33	**A3**	Olhos	Azul+Verde	0,0418	13,3019	(0,6834-258,8947)
hp41	**A7**	Olhos	Mel	0,0481	60,5294	(2,4059-1522,8561)
	A	Cabelos	Loiros	$4,06 \times 10^{-7}$	5,1784	(2,5154-10,6608)
	A	Cabelos	Ruivos+Loiros	$1,76 \times 10^{-6}$	3,8374	(2,1019-7,0056)
	A	Cabelos	Castanhos	0,0001	2,0597	(1,4480-2,9298)
	A	Olhos	Azul	0,0009	3,4247	(1,5697-7,4717)
	A	Olhos	Castanho-claro	0,0131	1,7149	(1,1201-2,6257)
	A	Olhos	Azul+Verde	0,0006	1,9300	(1,3203-2,8213)
	A	Pele	Clara	$5, 87 \times 10^{-12}$	3,5172	(2,4441-5,0616)
	A	Sardas	Sim	0,0001	2,9774	(1,6723-5,3011)
hp1	**B1**	Cabelos	Pretos	$1,51 \times 10^{-5}$	4,5560	(2,2692-9,1473)
hp1	**B1**	Olhos	Castanho-escuro	0,0007	3,2890	(1,6589-6,5209)
hp1	**B1**	Olhos	Castanhos	0,0055	3,1075	(1,3426-7,1925)
hp1	**B1**	Pele	Escura	$5,92 \times 10^{-7}$	6,3871	(3,2034-12,7348)
hp15	**B2**	Cabelos	Pretos	0,0002	4,1913	(1,9608-8,9589)
hp15	**B2**	Cabelos	Castanhos+Pretos	0,0439	6,0142	(0,8091-44,7033)
hp15	**B2**	Olhos	Castanho-escuro	0,0038	2,9699	(1,4094-6,2582)
hp15	**B2**	Olhos	Castanhos	0,0219	2,8793	(1,1609-7,1414)
hp15	**B2**	Pele	Escura	0,0336	2,5237	(1,1170-5,7018)
hp2	**B3**	Cabelos	Pretos	0,0201	2,8745	(1,2346-6,6929)
hp2	**B3**	Olhos	Castanho-escuro	0,0013	4,2794	(1,7287-10,5934)
hp2	**B3**	Olhos	Castanhos	0,0079	4,5969	(1,3489-15,6660)
hp2	**B3**	Pele	Escura	0,0031	4,0382	(1,6850-9,6779)
hp4	**B5**	Pele	Escura	0,0424	3,3407	(1,0898-10,2410)
	B	Cabelos	Pretos	$9,17 \times 10^{-12}$	4,1937	(2,7733-6,3416)
	B	Cabelos	Castanhos+Pretos	0,0000	6,2232	(2,4646-15,7135)
	B	Olhos	Castanho-escuro	$6,01 \times 10^{-9}$	3,3279	(2,2151-4,9998)
	B	Olhos	Castanhos	$6,65 \times 10^{-8}$	3,4354	(2,1443-5,5040)
	B	Pele	Média	0,0097	1,7295	(1,1496-2,6018)
	B	Pele	Escura	$2,94 \times 10^{-12}$	5,9689	(3,6133-9,8600)
	B	Sardas	Não	0,0001	3,9778	(1,7846-8,8664)

hp25	**C1**	Cabelos	Pretos	0,0069	3,6134	(1,4689-8,8887)
hp25	**C1**	Cabelos	Castanhos+Pretos	0,0346	8,5802	(0,5148-142,9921)
hp25	**C1**	Olhos	Castanho-escuro	0,0189	2,9836	(1,2143-7,3308)
hp25	**C1**	Pele	Escura	0,0245	3,0548	(1,1928-7,8236)
hp27	**C2**	Pele	Média	0,0319	15,2183	(0,7817-296,2675)
hp26	**C4**	Cabelos	Pretos	0,0148	10,7988	(1,2519-93,1490)
hp26	**C4**	Olhos	Mel	0,0297	10,6250	(1,8537-60,9016)
hp42	**C5**	Olhos	Mel	0,0065	42,7500	(3,7444-488,0776)
hp47	**C7**	Pele	Escura	0,0196	6,0000	(1,4692-24,5026)
	C	Cabelos	Pretos	$1,69 \times 10^{-5}$	3,8048	(2,0744-6,9788)
	C	Cabelos	Castanhos+Pretos	0,0134	4,8501	(1,1555-20,3575)
	C	Olhos	Castanho-escuro	0,0027	2,5635	(1,4129-4,6510)
	C	Pele	Escura	0,0010	3,2348	(1,6848-6,2109)
hp14	**D2**	Olhos	Verde	0,0015	3,9293	(1,7395-8,8756)
hp14	**D2**	Olhos	Mel	0,0268	4,2684	(1,3497-13,4992)
hp14	**D2**	Olhos	Azul+Verde	0,0001	5,2185	(2,1384-12,7350)
hp14	**D2**	Pele	Clara	$4,03 \times 10^{-5}$	10,8491	(2,5317-46,4920)
hp49	**D3**	Cabelos	Ruivos	0,0259	117,0000	(4,5553-3005,0643)
	D	Olhos	Verde	0,0014	3,5723	(1,6547-7,7121)
	D	Olhos	Mel	0,0392	3,7121	(1,1855-11,6236)
	D	Olhos	Azul+Verde	0,0003	4,2847	(1,8981-9,6722)
	D	Pele	Clara	0,0001	7,8897	(2,3526-26,4590)

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

O estudo da genética da pigmentação é indispensável para o entendimento de diversos aspectos da biologia e evolução humana, tais como a biologia do câncer de pele e a existência de marcadores de DNA para a cor da pele, dos olhos e dos cabelos, os quais podem ser extremamente úteis em aplicações práticas na área forense. Impulsionada pelas tecnologias de alta resolução combinadas com novas abordagens de analise, a comunidade científica realizou progressos significativos na ultima década na identificação de novos genes e variantes de DNA associados à pigmentação. Os polimorfismos de DNA relacionados a pigmentação consistem em variáveis que podem permitir a compreensão da grande diversidade de cores existente dentro e entre populações humanas. Ainda existe muito trabalho a ser conduzido a fim de alcançar tal compreensão (LIU et al., 2013). Múltiplos genes e suas interações estão envolvidos no desenvolvimento da variação da pigmentação em humanos. Por esta razão, investigações mais profundas sobre polimorfismos e haplótipos de genes da pigmentação são essenciais para um melhor entendimento da base molecular que fundamenta essa variação e para uma predição mais precisa dessas características, especialmente as das cores intermediárias (KASTELIC et al., 2013).

Neste contexto, destaca-se o gene SLC45A2 e seus polimorfismos que vêm sendo estudados na tentativa de explicar sua relação com a variação normal na pigmentação humana, assim como para realizar inferências populacionais e de ancestralidade. Muitos estudos têm mostrado diferenças significativas nas frequências alélicas dos polimorfismos nesse gene dentro e entre diferentes grupos populacionais (ANDERSEN et al., 2011; GRAF et al., 2007; NAKAYAMA et al., 2002; PIETRONI et al., 2013; WALSH et al., 2011; WALSH et al., 2013; YUASA et al., 2006). Por exemplo, o alelo Phe374 do polimorfismo Phe374Leu (um dos mais estudados no gene) se mostrou associado com pigmentação clara (cabelos loiros, olhos azuis e pele clara) em diferentes estudos populacionais e de associação (BELEZA et al., 2013; GRAF et al., 2005; KASTELIC et al., 2013; YUASA et al., 2006).

7.1 ASPECTOS POPULACIONAIS

Dois dos polimorfismos não sinônimos analisados neste estudo [rs26722*G/A (Glu272Lys) e rs16891982*G/C (Leu374Phe)] foram previamente investigados nas populações sul-africana, japonesa, de Gana e de Nova Guiné (NAKAYAMA et al., 2002), mostrando diferenças

significativas nas frequências alélicas entre as populações testadas. O polimorfismo Phe374Leu causa uma substituição do aminoácido fenilalanina para leucina na proteína MATP, alterando sua função e afetando suas interações com outras proteínas envolvidas na pigmentação. O alelo 374Phe teve uma frequência de 0,89 na população branca sul-africana testada e não foi encontrado nas amostras dos 50 indivíduos de Gana, 49 Japoneses e 52 da Nova Guiné. Yuasa et al. (2006) também mostrou resultados similares para o mesmo polimorfismo, obtendo uma frequência do alelo 374Phe de 0,96 na amostra de alemães e nula nas amostras de japoneses e africanos. Sendo a população brasileira composta por grande mistura, nossos resultados se apresentaram diferentes dos resultados de Nakayama e Yuasa, mostrando uma frequência intermediária do alelo 374Phe (0,67), o que reflete de maneira bem precisa as proporções de mistura que caracterizam a população brasileira (PENA et al., 2011). Esta distribuição alélica intermediária também foi observada nas populações afro-americanas estudadas por Graf et al. (2005).

Resultados apresentados em um estudo realizado no Brasil sobre a estimativa de ancestralidade europeia, africana e ameríndia em 934 indivíduos pertencentes a diferentes categorias de pigmentação e de várias regiões do país mostraram uma grande heterogeneidade dentro e entre as categorias da pigmentação e dentro e entre as regiões geográficas. Existe considerável mistura inter-étnica, que pode ser constatada tanto em nível individual como em grupos. Outra observação relevante consiste na considerável variação nas proporções de ancestralidade em uma mesma categoria de pigmentação entre diferentes regiões, manifestadas principalmente em indivíduos que apresentam pele média ou escura. Por exemplo, os indivíduos que se auto-classificaram como "morenos" na região Norte tiveram ancestralidade europeia média de 68,6%, enquanto que na região Sul houve média de 44,4% de ancestralidade africana. A categoria mais uniforme foi dos indivíduos que se auto-classificaram como "brancos", que obteve ancestralidade europeia predominante, variando de 66,8% na Bahia a 85,5% no Rio Grande do Sul e 86,1% no Rio de Janeiro. Esses resultados tem considerável relevância social no Brasil, uma vez que a questão racial se apresenta proeminente na vida política dos brasileiros. Entre as ações do Estado em relação a esta questão estão iniciativas destinadas a reforçar a identidade racial, especialmente a "identidade negra". A alegação de que os “não-brancos” constituem mais da metade da população do país é usada como argumento na introdução de políticas públicas favorecendo a população “não-branca”, especialmente na área da educação (cotas raciais para entrada nas universidades), no mercado de trabalho e no acesso a terras. É importante enfatizar que os indivíduos “não-

brancos” no Norte, Nordeste e Sudeste do Brasil apresentam ancestralidade europeia predominante e diferentes proporções de ancestralidade africana e ameríndia (PENA et al., 2011). Estes dados são corroborados pelos nossos resultados, os quais mostram que mesmo nos indivíduos que apresentavam característica da pigmentação escuras (cabelos pretos, olhos castanho-escuros e pele escura), as frequências de alelos (rs181832*T, rs2287949*G, rs250417*G, rs40132*T e rs16891982*C) que normalmente determinam pigmentação clara eram relativamente altas. Este último alelo (rs16891982*C), embora ausente em japoneses e africanos, está fortemente relacionado com características de pigmentação claras em diferentes populações mundiais (GRAF et al., 2005; NAKAYAMA et al., 2002; YUASA et al., 2006); sua presença expressiva na presente amostra evidencia a grande mistura existente na população brasileira.

O polimorfismo Glu272Lys causa uma substituição do aminoácido glutamato para lisina na proteína MATP, o que pode alterar a função da mesma, afetando suas interações com outras proteínas envolvidas na pigmentação. O alelo Glu272 se mostrou mais frequente em populações de caucasianos (0,97) e aborígenes australianos (0,97) do que em asiáticos (0,66), mostrando uma tendência de associação do alelo 272Lys com essa população (GRAF et al., 2005). Essa tendência pode também ser verificada em estudo de associação que indiciou que o alelo 272Lys é mais frequente em populações asiáticas (0,8) e raro em populações africanas (0,05) e europeias (0,03) (SOEJIMA et al., 2006). Porém, como os aborígenes australianos mostraram a mesma frequência do alelo Glu272 que os caucasianos, apesar de terem uma pigmentação mais escura, esta associação pode não estar relacionada com a determinação da pigmentação e sim estar simplesmente refletindo um desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos Phe374Leu e Glu272Lys (GRAF et al., 2005). Um resultado semelhante ao de Graf et al (2005) foi encontrado por Yuasa et al. (2006), em que o alelo Glu272 mostrou uma frequência de 0,62 na amostra de japoneses e frequências de 0,97 para a amostra de alemães e de 0,94 para os africanos. A frequência que encontramos para tal alelo (0,86) na presente amostra revela pequena variação em relação aos valores observados em caucasianos, provavelmente devido à miscigenação da população brasileira. Embora a presente amostra de descendentes de asiáticos seja pequena (n = 12), o alelo 272Lys foi observado em frequência de 41,66%.

O SNP rs3733808 que se mostrou monomórfico e o SNP rs732740 que não mostrou variabilidade significativa em nossas análises (frequência do alelo menos frequente igual a 0,005) também apresentaram frequências semelhantes nas populações estudadas por Yuasa et

al. (2006). O alelo rs3733808*C estava ausente nas amostras de africanos e alemães e teve uma frequência de 0,005 nos japoneses, enquanto que o alelo rs732740*C estava ausente em africanos e japoneses e presente a uma frequência de 0,005 em alemães.

A diversidade genética intra-populacional estimada pela heterozigose esperada (H_S) na população total foi inferior a 0,26 para todos os SNPs, exceto para o *locus* rs16891982 (Leu374Phe) (0,45), no qual a heterozigose observada (H_O) foi menor (0,33) do que a H_S, sugerindo um excesso de homozigotos em relação ao modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg. Este *locus* foi o único que mostrou um desvio significativo do equilíbrio. Um possível fator que pode ter ocasionado esse desvio é a ocorrência de mistura inter-étnica, associada à subestrutura populacional. A alta miscigenação da população de Ribeirão Preto já foi caracterizada para STRs autossômicos que geraram proporções de ancestralidade europeia, africana e ameríndia de 59%, 34% e 7% em média, respectivamente. Estas proporções sofreram variações entre as diferentes categorias consideradas, sendo os brancos caracterizados por contribuições de 79%, 14% e 7% de Europeus, Africanos e Ameríndios, respectivamente, os mulatos caracterizados por contribuições de 62%, 26% e 12% de Europeus, Africanos e Ameríndios, respectivamente e os negros caracterizados por contribuições de 37% e 63% de Europeus e Africanos, respectivamente (FERREIRA et al., 2006; MUNIZ et al., 2008). Este fator, associado à ocorrência de casamentos preferenciais no que se refere à ancestralidade e pigmentação da pele, pode resultar em estratificação populacional, caracterizando deficiência de heterozigotos na amostra total (efeito Wallund), principalmente quando são considerados SNPs que apresentam grande diferencial de frequência entre os grupos étnicos principais. No caso do polimorfismo Phe374Leu, apesar da forte associação encontrada com as características claras da pigmentação, podemos observar as diferenças de frequências alélicas nas diferentes categorias de pigmentação (TABELAS 7, 8 e 9). Por exemplo, para as categorias de pele clara, média e escura, o alelo 374Phe apresentou frequências de 83,68%, 58,72% e 22,50%, respectivamente, sendo que dentre os outros SNPs estudados, o maior patamar de variação alcançado entre tais características foi de apenas 20 pontos percentuais no SNP rs250417).

Quando se considera a estrutura dos haplótipos do gene SLC45A2, observa-se que a magnitude do desequilíbrio de ligação entre os SNPs é elevada. O parâmetro *D'* atingiu valor máximo em 14 dos 55 pares de SNPs analisados e valores acima de 0,6 em outros 19 pares, somando um total de 33 pares (60%) de SNPs que, de acordo com Reich et al. (2001), estão em forte desequilíbrio. Apesar dos valores altos de *D'* encontrados, observamos a

predominância de baixos valores de r^2 na maioria dos pares (valores abaixo de 0,2 foram encontrados em 83,6% dos pares). Isto se explica pelo fato de que estes dois parâmetros são complementares e refletem aspectos distintos do desequilíbrio de ligação: à medida que *D'*aumenta, r^2 pode assumir qualquer valor entre zero e $(D')^2$. Enquanto *D'*, na ausência de um dos quatro haplótipos possíveis para um par de SNPs bi-alélicos, atingirá valor igual a 1,0, o r^2 dependerá das frequências dos alelos dos SNPs em questão. Sendo assim, *D'* pode ser definido como uma medida influenciada pela quantidade de recombinação, enquanto que r^2 traz informações sobre quando e onde as mutações ocorreram na genealogia dos haplótipos (HARTL; CLARK, 2007). Dessa forma, a combinação dos valores desses índices permite detectar a presença de desequilíbrio de ligação completo (valor de *D'* igual a 1,0, independente do valor de r^2) ou perfeito (valor de *D'* igual a 1,0 e valor de r^2 também igual a 1,0). Observamos apenas um par de SNPs em perfeito DL (rs40132 e rs35394) e um total de 22 pares com valores de *D'* < 0,5 e de $r^2 < 0,2$, indicando a existência de recombinação entre esses pares de *loci*.

O haplótipo mais frequente encontrado nas nossas amostras (hp9), corresponde ao haplótipo mais frequente encontrado por Yuasa et al. (2006). Este haplótipo difere do haplótipo hp1 em apenas um SNP (rs16891982), sugerindo que o hp9 pode ter surgido de uma transversão de G para C no hp1 (YUASA et al., 2006). Dezoito novos haplótipos foram encontrados em baixas frequências na presente amostra (inferiores a 0,0148), e o conjunto de 34 haplótipos observados resulta em quatro proteínas distintas (A, B, C e D). Quanto a diversidade haplotípica, Yuasa et al. (2006) encontrou valores de 0,815 ± 0,051 para africanos, 0,881 ± 0.017 para japoneses e 0,261 ± 0,043 para alemães. Os presentes resultados mostraram valores consistentes com os observados por Yuasa et al. (2006), visto que a diversidade haplotípica nas características claras da pigmentação [cabelos loiros (0,3482 ± 0,0716), olhos azuis (0,3378 ± 0,0864) e pele clara (0,4805 ± 0,0363)] foi menor do que a observada nas características escuras da pigmentação [cabelos pretos (0,8318 ± 0,0209), olhos castanho-escuros (0,7771 ± 0,0264) e pele escura (0,8835 ± 0,0177)].

7.2 ASSOCIAÇÕES ENCONTRADAS

Do total de 12 SNPs analisados, 8 mostraram associações significativas com alguma característica da pigmentação. O alelo rs181832*T se mostrou associado a características da pigmentação claras: cabelos loiros (p = 0,0085; OR = 8,5570), olhos azuis ou verdes (p =

0,0145; *OR* = 2,3641) e pele clara (p = 7,17 x 10^{-6}; *OR* = 4,2319). O alelo rs2287949*G também se mostrou associado a características da pigmentação claras: cabelos loiros (p = 0,0035; *OR* = 13,8787), olhos azuis (p = 0,0397; *OR* = 8,6691) e pele clara (p = 0,0001; *OR* = 3,8134). Mesmo padrão foi ainda observado para os alelos rs250417*G [cabelos loiros (p = 8,96 x 10^{-6}, *OR* = 17,6599), olhos azuis (p = 0,0002, *OR* = 22,0584), pele clara (p = 7,65 x 10^{-7}; *OR* = 3,1983)] e rs40132* T [cabelos loiros (p = 0,0022; *OR* = 10,3211), olhos azuis (p = 0,0063; *OR* = 13,4594) e pele clara (p = 0,0027; *OR* = 2,3271)]. É interessante enfatizar que tais alelos de SNPs intrônicos não se encontram em desequilíbrio de ligação entre si ou com o alelo 374Phe, o que sugere possível efeito na regulação da expressão da proteína MATP e corrobora a relevância desta no processo de biossíntese de melanina. Tais alelos se encontram simultaneamente presentes em dez haplótipos distintos (TABELA 11), os quais se encontram associados tanto ao alelo 374Phe (haplótipos A1, A3, A4, A8 e D2) quanto ao Leu374 (haplótipos B1, B4, B5 B12 e C7). Os haplótipos A1, A3 e D2 que contém o alelo 374Phe estão associadas a características de pigmentação claras, enquanto que os haplótipos B1, B5 e C7 estão associadas a características de pigmentação escuras.

O SNP rs16891982 (Leu374Phe) foi o único que se mostrou associado a presença ou ausência de sardas, além das outras três características da pigmentação. O alelo C (374Phe) se mostrou associado a cabelos loiros (p = 2,32 x 10^{-10}; *OR* = 11,4653), olhos azuis (p = 1,45 x 10^{-5}; *OR* = 6,7462), pele clara (p = 2,13 x 10^{-21}; *OR* = 5,8800) e presença de sardas (p = 9,19 x 10^{-5}; *OR* = 3,0333). Estes resultados estão de acordo com muitos dos estudos relacionados a este polimorfismo e com os resultados encontrados por Graf et al. (2005) e Yuasa et al. (2006). Nas populações africanas e asiáticas, o alelo ancestral rs16891982*G/374Leu é o mais frequente (0,99 a 1,00), já em populações europeias esse alelo apresenta uma frequência baixa (0,02 a 0,3), estando fortemente associado com pele e cabelos escuros. Pode-se dizer que o alelo rs16891982*C/374Phe reduz a produção da proteína MATP, pois os homozigotos GG (374Leu/Leu) possuem maiores quantidades de transcritos das proteínas MATP e TYR do que os homozigotos CC (374Phe/Phe) em culturas de melanócitos (STURM; DUFFY, 2012). Essa redução da proteína MATP em melanócitos mutantes mostrou provocar uma alteração no transporte da tirosinase, que passa a ocorrer dos melanossomos para a membrana plasmática ao invés de ser transportada do complexo de Golgi para dentro dos melanossomos (COSTIN et al., 2003). A proteína MATP foi originalmente postulada como um co-transportador de uma molécula de açúcar com um próton. O aminoácido leucina na região transmembrana da proteína poderia funcionar como um importante mediador nesse transporte de prótons

(NEWTON et al., 2001), criando um pH intramelanossomal ótimo para a atividade da tirosinase. Sendo assim, a presença do alelo C (374Phe) poderia alterar o transporte de prótons contribuindo para um ambiente mais ácido, o que é menos propício para a atividade ótima da tirosinase e ainda, devido a esta redução de função, alterar o tráfego intracelular de proteínas melanossomais, criando um ambiente com menor produção de melanina (GRAF et al., 2005).

Quanto ao SNP rs3776549, o genótipo AG está associado em nossas amostras apenas à ocorrência de cor de cabelos pretos (p = 0,05; OR = 1,8787). O SNP rs35394 mostrou associação significativa com a cor da pele, dos olhos e dos cabelos. O alelo A está associado à ocorrência de cor de pele clara (p = 0,0018; OR = 2,3957), olhos azuis (p = 0,0037; OR = 13,7079) e cabelos loiros (p = 0,0022; OR = 10,1899) e o alelo G está associado à ocorrência de cor de cabelos pretos ($p = 1{,}2 \times 10^{-5}$; OR = 3,3897), olhos castanho-escuros (p = 0,0007; OR = 2,5825) e pele média (p = 0,0212; OR = 1,9400). De forma interessante, o genótipo heterozigoto do SNP rs26722 (Glu272Lys) se mostrou associado a uma pigmentação de olhos mais clara – verdes (p = 0,0097; OR = 2,1497) – do que a pigmentação associada a ambos genótipos homozigotos – genótipo GG associado com olhos castanho-claros (p = 0,0099; OR = 2,3098) e genótipo AA associado com olhos castanho-escuros (p = 0,0180; OR = 15,9442). Embora o padrão de associações deste SNP possa ser aparentemente contraditório, sabe-se que o SLC45A2 não é o único gene que controla as vias da melanogênese. Diversos outros genes são conhecidos por atuarem na biossíntese da melanina, como aqueles relacionados à síntese da tirosinase (TYR), ao controle do pH nos melanossomos (SLC24A5 e OCA2), e à regulação das proporções de feomelanina e eumelanina (MC1R) (LIU et al., 2013).

A maioria dos SNPs (8 deles) estudados no presente trabalho se encontram em regiões de introns. Como visto nos parágrafos anteriores, cinco deles apresentaram associações significativas com a pigmentação em humanos. É importante ressaltar que polimorfismos presentes em introns também podem desempenhar funções de regulação da expressão gênica, por afetarem eventos de *splicing* e/ou a estabilidade do mRNA (CHAMARY; PARMLEY; HURST, 2006), ou então por atuarem como marcadores de eventos específicos. Como exemplo, um destes SNPs, presente no intron 5 (rs35394), é o SNP dentre os aqui estudados que apresenta localização mais próxima a um sítio de *splicing* alternativo, o qual resulta na produção de moléculas de mRNA de dois comprimentos distintos (1,7 e 2,8 kb) e de duas isoformas (530 e 460 aminoácidos) proteicas (YUASA et al., 2006).

Tanto a proteína A de forma geral, quanto os haplótipos que a originam [A1 (hp9), A3 (hp33) e A7 (hp41)] se mostraram associados com características da pigmentação claras. O haplótipo hp9 (A1) se mostrou associado com todos os quatro tipos de características fenotípicas avaliadas (cor dos cabelos, olhos, pele e sardas). Este haplótipo também se mostrou o mais frequente e associado com características claras da pigmentação no trabalho de Yuasa et al (2006). Dois haplótipos novos, codificantes da mesma proteína C [C5 (hp42) e C7 (hp47)], se mostraram associados com olhos mel (p = 0,0065; OR = 42,7500) e pele escura (p = 0,0196; OR = 6,0000), respectivamente. Todos os haplótipos estatisticamente associados com características de pigmentação clara ou escura incluem os alelos 374Phe e 374Leu, respectivamente. Adicionalmente, alelos de vários outros SNPs que não apresentaram DL significativo com relação ao Leu374Phe, também se mostraram associados com algumas características de pigmentação estudadas. Estes resultados, além de reforçarem a relevância do SNP Leu374Phe na pigmentação humana, também sugerem que os sítios de variação que o circundam também desempenham papel secundário na determinação da pigmentação.

A diversidade genética de alguns genes da pigmentação identificados em humanos foi (e em alguns casos continua sendo) moldada por diferentes pressões seletivas. Foram identificados SNPs em genes sob seleção positiva que alteram os níveis de expressão dos transcritos gênicos (OCA2, IRF4), estão ligados a SNPs funcionais que alteram esses níveis (ASIP, TYRP1, DCT, KITLG) ou modificam a atividade bioquímica de uma proteína (MC1R, TYR, SLC24A5, SLC45A2) (COOK et al., 2009). Alguns alelos específicos alcançaram altas frequências em populações ou regiões geográficas específicas, e em alguns casos ficaram próximos da fixação, como por exemplo, o alelo rs16891982*G (374Leu) em europeus. As razões dessa seleção são muito diversas. Algumas das possíveis pressões seletivas agindo sobre a pigmentação da pele em ambientes com alto ou baixo índice de radiação solar ultravioleta (UVR) incluem a necessidade de síntese de vitamina D, a proteção contra a fotólise do folato, manutenção da pele como uma barreira contra perda de água e, ao mesmo tempo, a primeira linha de defesa do sistema imune inato, assim como uma proteção contra o câncer de pele e outras doenças (STURM; DUFFY, 2012).

Existe uma ligação íntima entre a permeabilidade da pele e sua defesa contra bactérias, surgindo a hipótese de que melanócitos de pigmentação mais escura aumentam essa defesa pela acidificação da camada exterior da epiderme. Indivíduos com tipos de pele IV e V na escala de Fitzpatrick apresentam menor pH na superfície da pele, melhora na integridade do estrato córneo e uma rápida recuperação da barreira de proteção da pele em relação aos

indivíduos de tipos I e II. Da mesma forma, os dendritos dos melanócitos dos tipos IV e V de pele são mais ácidos do que os dos tipos I e II e eles transferem mais melanossomos para o estrato córneo, sugerindo, assim, que a secreção de melanossomos pode contribuir para um pH mais ácido nos tipos de pele IV e V (GUNATHILAKE et al., 2009). A maior integridade do estrato córneo e uma melhor barreira contra infecções nas peles mais pigmentadas podem ser atribuídas ao baixo pH na camada mais externa da epiderme e a persistência de melanossomos mais ácidos nessa camada, assim como, a maior expressão de genes associados a síntese de eumelanina e da acidificação dos melanossomos (como por exemplo, TYR, OCA2, SLC24A5 e o gene estudado no presente trabalho, SLC45A2) em populações de pele mais pigmentada (ELIAS et al., 2010).

Muitas evidências epidemiológicas apontam para uma seleção da pigmentação escura da pele como uma medida de proteção contra os efeitos deletérios da UVR em localidades tropicais. Como a vitamina D3 só é sintetizada quando a UVR penetra na pele, a dose de radiação recebida varia não somente de acordo com a variação das estações do ano, comprimento do dia, latitude, altitude e ocupação dos indivíduos, como também é criticamente dependente das características físicas da pele em si (espessura, quantidade de melanina e idade do indivíduo). A vitamina D está disponível na dieta em baixas quantidades e varia de acordo com as fontes de alimento. A falta de tal vitamina pode ter graves consequências no desenvolvimento, como anormalidades no crescimento, raquitismo e osteoporose (STURM; DUFFY, 2012). Dessa forma, podemos observar que a pigmentação humana evoluiu para acomodar as necessidades fisiológicas humanas depois da dispersão para regiões com uma ampla variedade de índices de UVR. (JABLONSKI; CHAPLIN, 2000). Uma dupla pressão seletiva, fotoproteção e níveis de vitamina D, criou a necessidade de padrões regionais de peles mais e menos pigmentadas, o que desenvolveu a grande variedade fenotípica encontrada na pigmentação nos humanos modernos.

CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu constatar associações significativas entre alelos, genótipos, haplótipos e proteínas com diferentes características de pigmentação. A variação nas frequências alélicas de alguns desses SNPs na presente amostra é consistente com a existência de mistura inter-étnica na população de Ribeirão Preto. A forte associação do alelo 374Phe (rs16891982), e também dos haplótipos que o incluem, com características claras da pigmentação possibilita a utilização desse SNP como um marcador de ancestralidade e para predição de características fenotípicas da pigmentação na população brasileira.

Trinta e três pares de SNPs (dos 55 pares gerados) mostraram forte desequilíbrio de ligação, mas apenas um deles (rs40132 e rs35394) mostrou perfeito DL. Foram identificados 34 haplótipos (18 novos) resultando na codificação de quatro variantes proteicas distintas. A diversidade haplotípica nas características claras da pigmentação (cabelos loiros, olhos azuis, pele clara e presença de sardas) foi menor do que a observada nas características escuras (cabelos pretos, olhos castanho-escuro, pele escura e ausência de sardas).

Em estudos futuros seria de grande interesse a análise da diversidade das regiões promotora e 3'UTR do gene SLC45A2. Variações nestas regiões poderiam contribuir para a compreensão mais detalhada do papel do gene SLC45A2 na pigmentação em humanos, acarretando possíveis aumentos ou reduções nos níveis de expressão gênica, com consequente reflexo em variações fenotípicas da pele, olhos e cabelos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1000_*GENOMES_PROJECT*. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/, 2012. Acesso em: 10/03/2014.

ANDERSEN, J. D. et al. Genetic variants and skin colour in Danes. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, n. 3, p. e153-e154, 2011.

BELEZA, S. et al. Genetic architecture of skin and eye color in an African-European admixed population. **PLoS Genet,** v. 9, n. 3, p. e1003372, 2013.

BIESECKER, L. G. et al. Epidemiology. DNA identifications after the 9/11 World Trade Center attack. **Science,** v. 310, n. 5751, p. 1122-3, 2005.

BUDOWLE, B.; BIEBER, F. R.; EISENBERG, A. J. Forensic aspects of mass disasters: strategic considerations for DNA-based human identification. **Leg Med (Tokyo),** v. 7, n. 4, p. 230-43, 2005.

BUDOWLE, B.; VAN DAAL, A. Forensically relevant SNP classes. **Biotechniques,** v. 44, n. 5, p. 603-8, 610, 2008.

CARRACEDO, A. N. **Forensic DNA typing protocols**. Totowa, N.J.: Humana Press, 2005.

CERQUEIRA, C. C. et al. Predicting Homo pigmentation phenotype through genomic data: from Neanderthal to James Watson. **Am J Hum Biol,** v. 24, n. 5, p. 705-9, 2012.

CHAMARY, J. V.; PARMLEY, J. L.; HURST, L. D. Hearing silence: non-neutral evolution at synonymous sites in mammals. **Nat Rev Genet,** v. 7, n. 2, p. 98-108, 2006.

COOK, A. L. et al. Analysis of cultured human melanocytes based on polymorphisms within the SLC45A2/MATP, SLC24A5/NCKX5, and OCA2/P loci. **J Invest Dermatol,** v. 129, n. 2, p. 392-405, 2009.

COSTIN, G. E. et al. Tyrosinase processing and intracellular trafficking is disrupted in mouse primary melanocytes carrying the underwhite (uw) mutation. A model for oculocutaneous albinism (OCA) type 4. **J Cell Sci,** v. 116, n. Pt 15, p. 3203-12, 2003.

ELIAS, P. M. et al. Barrier requirements as the evolutionary "driver" of epidermal pigmentation in humans. **Am J Hum Biol,** v. 22, n. 4, p. 526-37, 2010.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Mol Ecol Resour,** v. 10, n. 3, p. 564-7, 2010.

EXCOFFIER, L.; SLATKIN, M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. **Mol Biol Evol,** v. 12, n. 5, p. 921-7, 1995.

_____. Incorporating genotypes of relatives into a test of linkage disequilibrium. **Am J Hum Genet,** v. 62, n. 1, p. 171-80, 1998.

FBI. SWGDAM Interpretation Guidelines for Autosomal STR Typing by Forensic DNA Testing Laboratories. Disponível em: http://www.fbi.gov/about-us/lab/biometric-analysis/codis/swgdam.pdf, 2010. Acesso em: 28/02/2014.

FERREIRA, L. B. et al. Genomic ancestry of a sample population from the state of Sao Paulo, Brazil. **Am J Hum Biol,** v. 18, n. 5, p. 702-5, 2006.

FITZPATRICK, T. B. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. **Arch Dermatol,** v. 124, n. 6, p. 869-71, 1988.

Genetics Home Reference. Disponível em : http://ghr.nlm.nih.gov/gene/SLC45A2, 2007. Acesso em: 14/02/2014.

GOODWIN, W.; LINACRE, A.; HADI, S. **An introduction to forensic genetics**. Chichester, England ; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2007. vii, 151 p. ISBN 0470010258

GRAF, J.; HODGSON, R.; VAN DAAL, A. Single nucleotide polymorphisms in the MATP gene are associated with normal human pigmentation variation. **Hum Mutat,** v. 25, n. 3, p. 278-84, 2005.

GRAF, J. et al. Promoter polymorphisms in the MATP (SLC45A2) gene are associated with normal human skin color variation. **Hum Mutat,** v. 28, n. 7, p. 710-7, 2007.

GRAPHPAD SOFTWARE, I., EUA. San Diego California USA, 2003.

GUNATHILAKE, R. et al. pH-regulated mechanisms account for pigment-type differences in epidermal barrier function. **J Invest Dermatol,** v. 129, n. 7, p. 1719-29, 2009.

GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics,** v. 48, n. 2, p. 361-72, 1992.

HARADA, M. et al. Use of an in vitro immunoselected tumor line to identify shared melanoma antigens recognized by HLA-A*0201-restricted T cells. **Cancer Res,** v. 61, n. 3, p. 1089-94, 2001.

HART, K. L. et al. Improved eye- and skin-color prediction based on 8 SNPs. **Croat Med J,** v. 54, n. 3, p. 248-56, 2013.

HARTL, D.; CLARK, A. G. **Principles of Population Genetics**. 4th. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, 2007. p. 652

IBARROLA-VILLAVA, M. et al. A customized pigmentation SNP array identifies a novel SNP associated with melanoma predisposition in the SLC45A2 gene. **PLoS One,** v. 6, n. 4, p. e19271, 2011.

IBARROLA-VILLAVA, M. et al. MC1R, SLC45A2 and TYR genetic variants involved in melanoma susceptibility in southern European populations: results from a meta-analysis. **Eur J Cancer,** v. 48, n. 14, p. 2183-91, 2012.

IBGE. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/default.shtm, 2010. Acesso em: 14/02/2014.

JABLONSKI, N. G. The evolution of human skin and skin color. **Annual Review of Anthropology,** v. 33, p. 585-623, 2004.

JABLONSKI, N. G.; CHAPLIN, G. The evolution of human skin coloration. **J Hum Evol,** v. 39, n. 1, p. 57-106, 2000.

JAKOBSSON, M. et al. Genotype, haplotype and copy-number variation in worldwide human populations. **Nature,** v. 451, n. 7181, p. 998-1003, 2008.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. **Nature,** v. 314, n. 6006, p. 67-73, 1985.

KASTELIC, V. et al. Prediction of eye color in the Slovenian population using the IrisPlex SNPs. **Croat Med J,** v. 54, n. 4, p. 381-6, 2013.

KAYSER, M.; DE KNIJFF, P. Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. **Nat Rev Genet,** v. 12, n. 3, p. 179-92, 2011.

KAYSER, M.; SCHNEIDER, P. M. DNA-based prediction of human externally visible characteristics in forensics: motivations, scientific challenges, and ethical considerations. **Forensic Sci Int Genet,** v. 3, n. 3, p. 154-61, 2009.

KIDD, K. K. et al. Developing a SNP panel for forensic identification of individuals. **Forensic Sci Int,** v. 164, n. 1, p. 20-32, 2006.

LEWONTIN, R. C. The Interaction of Selection and Linkage. I. General Considerations; Heterotic Models. **Genetics,** v. 49, n. 1, p. 49-67, 1964.

_____. The detection of linkage disequilibrium in molecular sequence data. **Genetics,** v. 140, n. 1, p. 377-88, 1995.

LEWONTIN, R. C.; KOJIMA, K. The evolutionary dynamics of complex polymorphisms. **Evolution,** v. 14, p. 450-472, 1960.

LIU, F.; WEN, B.; KAYSER, M. Colorful DNA polymorphisms in humans. **Semin Cell Dev Biol,** v. 24, n. 6-7, p. 562-75, 2013.

MARANO, L. A. **Análise de polimorfismos do gene MC1R associados a fenótipos humanos de pigmentação na população Brasileira**. 2011. 130f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP).

MAURI, L. et al. SLC45A2 mutation frequency in Oculocutaneous Albinism Italian patients doesn't differ from other European studies. **Gene,** v. 533, n. 1, p. 398-402, 2014.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res,** v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.

MUNIZ, Y. C. et al. Genomic ancestry in urban Afro-Brazilians. **Ann Hum Biol,** v. 35, n. 1, p. 104-11, 2008.

NAKAYAMA, K. et al. Distinctive distribution of AIM1 polymorphism among major human populations with different skin color. **J Hum Genet,** v. 47, n. 2, p. 92-4, 2002.

NEWTON, J. M. et al. Mutations in the human orthologue of the mouse underwhite gene (uw) underlie a new form of oculocutaneous albinism, OCA4. **Am J Hum Genet,** v. 69, n. 5, p. 981-8, 2001.

PANG, T. et al. [Prenatal diagnosis of oculocutaneous albinism type IV and discovery of a novel mutation]. **Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi,** v. 28, n. 1, p. 1-5, 2011.

PARRA, F. C. et al. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 100, n. 1, p. 177-82, 2003.

PENA, S. D. et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **PLoS One,** v. 6, n. 2, p. e17063, 2011.

PHO, L. N.; LEACHMAN, S. A. Genetics of pigmentation and melanoma predisposition. **G Ital Dermatol Venereol,** v. 145, n. 1, p. 37-45, 2010.

PIETRONI, C. et al. The genetics of eye colours in an Italian population measured with an objective method for eye colour quantification. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, n. 4, p. e23-e24, 2013.

POSPIECH, E. et al. Prediction of eye color from genetic data using Bayesian approach. **J Forensic Sci,** v. 57, n. 4, p. 880-6, 2012.

PRINZ, M. et al. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victim identification (DVI). **Forensic Sci Int Genet,** v. 1, n. 1, p. 3-12, 2007.

QIN, Z. S.; NIU, T.; LIU, J. S. Partition-ligation-expectation-maximization algorithm for haplotype inference with single-nucleotide polymorphisms. **Am J Hum Genet,** v. 71, n. 5, p. 1242-7, 2002.

RAPLEY, R.; WHITEHOUSE, D. **Molecular Forensics**. England: 2007.

REICH, D. E. et al. Linkage disequilibrium in the human genome. **Nature,** v. 411, n. 6834, p. 199-204, 2001.

RIBEIRO-RODRIGUES, E. M. et al. Assessing interethnic admixture using an X-linked insertion-deletion multiplex. **Am J Hum Biol,** v. 21, n. 5, p. 707-9, 2009.

ROUSSET, F.; RAYMOND, M. Testing heterozygote excess and deficiency. **Genetics,** v. 140, n. 4, p. 1413-9, 1995.

RUIZ, Y. et al. Further development of forensic eye color predictive tests. **Forensic Sci Int Genet,** v. 7, n. 1, p. 28-40, 2013.

SANGUINETTI, C. J.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A. J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques,** v. 17, n. 5, p. 914-21, 1994.

SANTOS, N. P. et al. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. **Hum Mutat,** v. 31, n. 2, p. 184-90, 2010.

SANTOS, R. V.; COIMBRA JR., C. E. A. **Saúde e povos indígenas**. Disponível em: http://books.scielo.org: SciELO Books, 1994. 251

SIMEONOV, D. R. et al. DNA variations in oculocutaneous albinism: an updated mutation list and current outstanding issues in molecular diagnostics. **Hum Mutat,** v. 34, n. 6, p. 827-35, 2013.

SOEJIMA, M. et al. Evidence for recent positive selection at the human AIM1 locus in a European population. **Mol Biol Evol,** v. 23, n. 1, p. 179-88, 2006.

SPICHENOK, O. et al. Prediction of eye and skin color in diverse populations using seven SNPs. **Forensic Sci Int Genet,** v. 5, n. 5, p. 472-8, 2011.

STEPHENS, M.; SMITH, N. J.; DONNELLY, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. **Am J Hum Genet,** v. 68, n. 4, p. 978-89, 2001.

STURM, R. A. A golden age of human pigmentation genetics. **Trends Genet,** v. 22, n. 9, p. 464-8, 2006.

_____. Molecular genetics of human pigmentation diversity. **Hum Mol Genet,** v. 18, n. R1, p. R9-17, 2009.

STURM, R. A.; DUFFY, D. L. Human pigmentation genes under environmental selection. **Genome Biol,** v. 13, n. 9, p. 248, 2012.

TAKARA. Disponível em: http://www.clontech.com/takara/US/Products/PCR_Products/Pathogen_Detection_and_Screening_Kits/Human_Pathogen_Detection/Human_Beta-globin_Control_Primer_Set, 2014. Acesso em: 26/03/2014.

TULLY, G. Genotype versus phenotype: human pigmentation. **Forensic Sci Int Genet,** v. 1, n. 2, p. 105-10, 2007.

VALENZUELA, R. K. et al. Predicting phenotype from genotype: normal pigmentation. **J Forensic Sci,** v. 55, n. 2, p. 315-22, 2010.

WALSH, S. et al. Developmental validation of the IrisPlex system: determination of blue and brown iris colour for forensic intelligence. **Forensic Sci Int Genet,** v. 5, n. 5, p. 464-71, 2011.

WALSH, S. et al. The HIrisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA. **Forensic Sci Int Genet,** v. 7, n. 1, p. 98-115, 2013.

WALSH, S. et al. DNA-based eye colour prediction across Europe with the IrisPlex system. **Forensic Sci Int Genet,** v. 6, n. 3, p. 330-40, 2012.

WEISS, K. M.; CLARK, A. G. Linkage disequilibrium and the mapping of complex human traits. **Trends Genet,** v. 18, n. 1, p. 19-24, 2002.

XU, B. et al. [Identification of a novel pathogenic mutation in MATP gene with oculocutaneous albinism type IV from a consanguineous marriage family]. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi,** v. 92, n. 4, p. 254-8, 2012.

YAMAGUCHI, Y.; BRENNER, M.; HEARING, V. J. The regulation of skin pigmentation. **J Biol Chem,** v. 282, n. 38, p. 27557-61, 2007.

YUASA, I. et al. Distribution of the F374 allele of the SLC45A2 (MATP) gene and founder-haplotype analysis. **Ann Hum Genet,** v. 70, n. Pt 6, p. 802-11, 2006.

YUASA, I. et al. MATP polymorphisms in Germans and Japanese: the L374F mutation as a population marker for Caucasoids. **Int J Legal Med,** v. 118, n. 6, p. 364-6, 2004.

ANEXOS

ANEXO 1

Questionário sobre características étnicas e morfológicas

1) Segundo a tabela abaixo, seu tipo de pele se encaixa melhor em qual dos padrões?

Tipos de pele		Descrição
☐	I	Pele extremamente clara, sempre se queima, nunca bronzeia
☐	II	Pele clara, sempre se queima, bronzeia às vezes
☐	III	Pele média, algumas vezes se queima, sempre bronzeia
☐	IV	Pele morena clara, raramente se queima, sempre bronzeia
☐	V	Pele morena moderadamente pigmentada, nunca se queima, sempre bronzeia
☐	VI	Pele negra marcadamente pigmentada, nunca se queima, sempre bronzeia

2) Você possui sardas em áreas não expostas ao sol? ☐ **Sim** ☐ **Não**

3) Dentre os tipos abaixo, em que categoria se encaixa a cor dos seus olhos?

☐	Azul	☐	Castanho-claro
☐	Verde	☐	Castanho-escuro

4) A cor natural dos seus cabelos se enquadra em qual categoria abaixo?

☐	Ruivos	☐	Castanhos
☐	Loiros	☐	Pretos

5) Outros dados

Idade:	Estatura:	Peso:	Sexo:	Tipo de cabelo:
___ anos	_____cm	____kg	☐ M ☐ F	_____ (grosso/fino, liso/ondulado/encaracolado)

De acordo com as categorias do IBGE, você se classifica como:

( ) branco ( ) negro ( ) asiático ( ) indígena ( ) mestiço

6) Em termos de origem étnica, classifique seus avós como:

(a) Europeu (b) Ameríndio (c) Africano (d) Asiático (e) Brasileiro:

( ) Avô paterno. Comentários (bisavós ou país de origem):_____

( ) Avó paterna. Comentários (bisavós ou país de origem):_____

( ) Avô materno. Comentários (bisavós ou país de origem):_____

( ) Avó materna. Comentários (bisavós ou país de origem):_____

ANEXO 2

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – FFCLRP – DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

FONE: 3602-3764 - FAX: 3633-8151 - RIBEIRÃO PRETO - SP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da pesquisa: Polimorfismos genéticos associados a características morfológicas e aplicabilidade forense no Brasil

Pesquisador responsável: Prof. Dr. Celso Teixeira Mendes Junior

Endereço para contato: Av. Bandeirantes, 3900; CEP: 14040-901, Ribeirão Preto - SP
Departamento de Química, FFCLRP-USP
Telefone: (16) 3602-4852

Prezado (a) doador (a),

Alguns dos diversos métodos utilizados na investigação de crimes podem não ser tão eficazes em determinadas situações, uma vez que muitos deles dependem de condições de preservação específicas, como, por exemplo, a presença de vestígios analisáveis ou fragmentos de cadáver. Em tais situações, uma pequena amostra de material biológico é suficiente para a obtenção de um perfil de DNA que pode auxiliar na resolução de crimes, quando comparamos esse perfil ao de um suspeito.

Nesse estudo, faremos a análise de algumas regiões do DNA que possam estar relacionadas a características físicas da população brasileira, como a cor de olhos, pele e cabelos, tipo de cabelos e presença de sardas. Uma vez que essas características são facilmente reconhecíveis, sua predição teria grande valor para as investigações forenses.

Para a realização desta pesquisa, é necessária a participação de pessoas sadias, não havendo a necessidade de procedimentos que imponham risco ou que possam comprometer a saúde dos participantes da pesquisa.

Caso concorde em participar da pesquisa, serão coletados cerca de 5 mL de seu sangue ou uma pequena quantidade de material proveniente da esfregação de uma escovinha junto à parte interna da bochecha. A coleta será feita por um profissional habilitado e altamente capacitado nessas atividades.

Os seguintes aspectos lhe serão esclarecidos para que decida sobre esta doação voluntária:

a.) Esta pesquisa não lhe trará qualquer custos. Visando lhe proporcionar maior conforto e comodidade, a coleta será realizada uma única vez em data e local a combinar.

b.) Você não terá nenhum risco em participar da pesquisa e terá a garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa.

c.) Você terá a liberdade de retirar o seu consentimento a qualquer momento sem que isso lhe traga prejuízo algum ou qualquer tipo de constrangimento.

d.) Você terá garantida a segurança de que não será identificado e que será mantida a sua privacidade e o caráter confidencial das informações concedidas.

e.) Nós temos o compromisso de proporcionar informações atualizadas durante o estudo, ainda que esta possa influenciar a sua vontade de continuar autorizando a sua participação. O sangue doado por você não será empregado na realização de pesquisas de outra natureza ou com objetivos diferentes dos aqui expostos.

f.) A amostra biológica será coletada com total responsabilidade e custo dos pesquisadores. A coleta de seu sangue será única e feita com material descartável, sendo necessária apenas um pequeno furo com agulha em veia do seu braço, o que pode, de fato, ser um procedimento desconfortável, mas apenas pela "picada" com a agulha; Alternativamente, uma pequena escovinha pode ser utilizada para obtenção de células da mucosa bucal, mediante a simples esfregação junto à parte interna da bochecha, em procedimento completamente indolor e livre de desconfortos.

g.) Será aplicado um questionário visando uma melhor compreensão de sua origem e características físicas. Toda informação obtida será mantida em sigilo.

h.) Serão obtidas imagens fotográficas de regiões pequenas e bem delimitadas de seu corpo (olho, raiz dos cabelos e regiões do braço não-expostas ao sol), as quais não permitirão sua identificação, mantendo, assim, o caráter confidencial da informação.

i.) Os resultados da pesquisa serão apresentados em reuniões científicas (simpósios e congressos) e serão publicados em revistas científicas especializadas.

_____

Assinatura do pesquisador responsável

Eu, _____, RG nº _____,
residente na _____,
abaixo assinado, tendo recebido as informações acima e ciente dos meus direitos, concordo em participar da pesquisa por livre e espontânea vontade.

Tendo ciência do exposto acima, assino abaixo.

Ribeirão Preto,____de_____de 20___.

_____

Assinatura do doador

ANEXO 3

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - FFCLRP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

Of.CEtP/FFCLRP-USP.012/2009-11/3/2009

Senhor(a) Pesquisador(a):

Comunicamos a V. Sa. que o trabalho intitulado **"Dinâmica populacional e uso forense de polimorfismos genéticos associados a fenótipos morfológicos no Brasil",** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FFCLRP-USP, em sua 78ª Reunião Ordinária realizada em 11/3/2009, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Processo CEP-FFCLRP nº 433/2008 – 2008.1.2316.59.4.

Atenciosamente,

Adelaide de Almeida
Profa. Dra. ADELAIDE DE ALMEIDA
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa – FFCLRP-USP

Ilustríssimo(a) Senhor(a)
Prof. Dr. **CELSO TEIXEIRA MENDES JUNIOR**
Docente do Departamento de Química
Desta FFCLRP-USP

CEP-FFCLRP-USP - Fone: (016) 602-3653 - Fax: (016) 633-5015
Avenida Bandeirantes, 3900 - Bloco A - 14040-901 - Ribeirão Preto - SP - Brasil