Leonardo Arduino Marano

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DO GENE
MC1R ASSOCIADOS A FENÓTIPOS
HUMANOS DE PIGMENTAÇÃO NA
POPULAÇÃO BRASILEIRA**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Celso Teixeira Mendes Junior

Ribeirão Preto

2011

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.

Catálogo da Publicação

Departamento de Genética

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

da Universidade de São Paulo

Marano, Leonardo Arduino

ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DO GENE MC1R ASSOCIADOS A FENÓTIPOS HUMANOS DE PIGMENTAÇÃO NA POPULAÇÃO BRASILEIRA/ Leonardo Arduino Marano ; orientador Celso Teixeira Mendes Junior – Ribeirão Preto, 2011.

Número de páginas: 130

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, 2011

1 – MC1R. 2 – polimorfismos. 3 – pigmentação. 4 – população brasileira

Nome: Leonardo Arduino Marano

Título: ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DO GENE MC1R ASSOCIADOS A FENÓTIPOS HUMANOS DE PIGMENTAÇÃO NA POPULAÇÃO BRASILEIRA

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para 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 este trabalho aos
meus pais e amigos

Agradecimentos

Inicialmente agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Celso Teixeira Mendes Junior, pela disponibilidade, boa vontade, paciência e ensinamentos oferecidos. Agradeço por ter sido tão brilhante em sua primeira orientação de Mestrado e por ter colaborado infinitamente em minha formação profissional;

Ao Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões por todo conhecimento compartilhado e ensinamentos durante esses mais de dois anos de convivência;

Ao Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi, por ter gentilmente cedido seu laboratório, sem o qual, esse trabalho não teria sido realizado;

A todo o pessoal que conviveu comigo no laboratório do anexo A (Maria, Olívia, João, Yara, Breno, Erick, Luciana, Camila e o amigo Rafael (Xixa), que mesmo preferindo o laboratório do HC, aparecia às vezes por lá;

A todas as meninas da genética (Nadia, Lidia, Edilene, Natália, Cláudia Caixeta, Edna, Cláudia Wiesel, Juliana, Renata, Yara (novamente) e Flávia Japa (Just Call my Name, Just Call my Name, Salzano!!! Hahaha);

Ao pessoal da 41ª turma de Biologia da USP Ribeirão, por ainda tentarmos manter contato, mesmo com a correria que nossa vida se tornou (graças a Deus) e principalmente às meninas da Terra do Nunca (Carol, Gi e Carlinha), por entenderem que às vezes eu dou uma desaparecida, mas que não me esqueço de vocês;

Às queridas técnicas Maria e Ana Lúcia, por todo o apoio, disposição e conhecimento compartilhado (prometo dar menos trabalho pra vocês hehehe);

Às técnicas do anexo A, Flávia e Sandra, pela convivência, pelos ensinamentos, pela paciência e pela disponibilidade em sempre me ajudar;

À minha família, por todo apoio que sempre me deram nessa minha caminhada como pesquisador, pelo orgulho que têm de mim e pelo amor de sempre;

Ao Gustavo, não só por toda ajuda possível no ambiente de trabalho, me acompanhando e me ensinando a rotina de laboratório, mas por ser, antes de tudo, um grande amigo. Merci, *mon ami*.

A todos os doadores voluntários, sem o qual essa pesquisa não poderia ser desenvolvida;

À Deus, por estar sempre pronto para nos auxiliar, mesmo quando nos esquecemos de sua presença.

*“When you open your mind to the impossible,
sometimes you find the truth”*

Dr. Walter Bishop

RESUMO

Marano, L.A. **ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DO GENE MC1R ASSOCIADOS A FENÓTIPOS HUMANOS DE PIGMENTAÇÃO NA POPULAÇÃO BRASILEIRA**. 2011. 130 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Dentre os genes conhecidos por influenciarem a variação normal de pigmentação de olhos, pele e cabelos em humanos, o gene MC1R (receptor de melanocortina 1) é o mais bem caracterizado até o momento. A atuação do MC1R ocorre pela produção de uma proteína transmembrana nos melanócitos, responsável pela regulação da produção de melanina nos mesmos. Sabe-se que a atuação do MC1R determina a proporção entre eumelanina (coloração castanha/preta) e feomelanina (coloração amarela/vermelha) presente nos melanócitos. O presente trabalho tem como objetivo analisar os SNPs conhecidos do gene MC1R com o propósito de se avaliar a influência da diversidade deste gene em características como a presença de sardas e variação da pigmentação dos olhos, pele e cabelos em humanos. Foram analisados 29 SNPs conhecidos da região codificadora do gene MC1R em 131 indivíduos da região de Ribeirão Preto, SP. A extração do DNA foi feita pela técnica de *salting-out*. A região codificadora do gene MC1R (951pb) foi amplificada em uma única reação de PCR, a qual foi seqüenciada em um analisador genético ABI-PRISM 310 por eletroforese capilar, utilizando-se os mesmos *primers* empregados para a amplificação. Dos 29 SNPs avaliados, 22 deles mostraram variação nas amostras estudadas, sendo que metade deles demonstrou estar associados a características de pigmentação. Observou-se um conjunto de SNPs associados claramente à fenótipos relacionados à feomelanina (+1645 A, +1831 T, +1858 T e +2260 C), enquanto outros se relacionam à ocorrência de eumelanina (+1558 G, +2322 G, +2346 A). A reconstrução de haplótipos gerou 31 haplótipos, sendo que quatro deles estavam associados à pele escura e dois outros tinham frequências significativamente baixas em pele clara. Um haplótipo se associou a olhos verdes, enquanto dois outros tiveram associação com olhos castanho escuros. Cores escuras de cabelo se relacionaram à seis haplótipos distintos enquanto cabelos ruivos estavam associados à dois e um outro associado à cabelos loiros. Por fim, a ocorrência de sardas foi significativamente relacionada à três haplótipos. O presente trabalho apresenta associações significativas entre SNPs individuais e pigmentação de olhos, cabelos e pele, sendo que nossos dados confirmam que tal gene também desempenha papel relevante na variação de pigmentação na população Brasileira.

Palavras-chave: MC1R; polimorfismos; pigmentação; pele; olhos; cabelo; população brasileira

ABSTRACT

Marano, L.A. **MC1R GENE POLYMORPHISMS ANALYSIS ASSOCIATED WITH HUMAN PIGMENTATION PHENOTYPES ON THE BRAZILIAN POPULATION**. 2011. 130 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Among the known genes influencing eye, skin and hair normal pigmentation variation, the MC1R (melanocortin 1-receptor) gene is the best characterized so far. The activity of MC1R occurs due the production of a transmembrane protein in melanocytes, responsible for regulating the production of melanin. It is known that the performance of MC1R determines the ratio of eumelanin (brown color / black) and pheomelanin (yellow / red) present in melanocytes. This study aims to analyze known SNPs of the MC1R gene in order to evaluate the influence of this gene diversity on features like freckles and pigmentation variation of eyes, skin and hair in humans. We analyzed 29 known SNPs in the coding region of MC1R gene in 296 individuals from the region of Ribeirão Preto, Brazil. DNA extraction was performed using the salting-out technique. The MC1R gene coding region (951pb) was amplified in a single PCR reaction, which was sequenced on a ABI PRISM-310 genetic analyzer by capillary electrophoresis, using the same primers used for amplification. Of the 29 SNPs evaluated, only 22 showed variation in the samples studied, half of them showing to be associated with pigmentation characteristics. We observed a set of SNPs clearly associated to pheomelanin (+1645 A, +1831 T, +1858 T e +2260 C), while others related to eumelanin occurrence (+1558 G, +2322 G, +2346 A). Haplotype reconstruction generated 31 haplotypes. Four of them were associated with dark skin and two had significantly low frequencies in fair skin. One haplotype was associated with green eyes, while two other had association with dark brown eyes. Darker hair color was associated with six different haplotypes, whereas red hair was associated with two and blonde hair with one haplotype. Finally, the absence or presence of freckles was significantly related to three haplotypes. Our study shows significant associations between individual SNPs and eyes, hair and skin pigmentation. The results presented here confirm that this gene also plays a relevant role in the pigmentation variation in the Brazilian population.

Keywords: MC1R; polymorphisms; pigmentation; skin; eyes; hair; brazilian population

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 Identificação humana com fins forenses	2
1.2 Polimorfismos de DNA	3
1.3 Associação entre marcadores genéticos e características físicas	8
1.4 Biologia da pigmentação	10
1.5 População Brasileira	19
2 – JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos Específicos	24
3 – MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Amostra populacional	26
3.2 Determinação das características dos indivíduos	26
3.3 Análise Laboratorial	27
3.4 Análises estatísticas dos dados	33
4 – RESULTADOS	41
4.1 Amostra populacional	42
4.2 Frequências alélicas e heterozigose	44
4.3 Equilíbrio de Hardy Weinberg	45
4.4 Reconstrução haplótipos	46
4.5 Desequilíbrio de ligação	53
4.6 Network	61
4.7 Associações encontradas	63
5 – DISCUSSÃO	69
5.1 Dificuldades laboratoriais	70
5.2 Aspectos Populacionais	71
5.3 Associações encontradas	77
6 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	88
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
APÊNDICES	100

1 – INTRODUÇÃO

1.1 Identificação humana com fins forenses

A identificação pode ser definida como um conjunto de procedimentos diversos para individualizar uma pessoa ou objeto em meio a outros. Identificar uma pessoa é determinar uma individualidade e estabelecer caracteres ou conjunto de qualidades que a tornem diferente de todas as outras e igual apenas a si mesma (França, 2001).

A identificação humana se baseia principalmente em métodos provenientes das áreas de antropologia forense, odontologia forense e radiologia (Alonso et al., 2005). Dentre as características que auxiliam na identificação individual, pode-se citar como sendo as principais: características morfológicas do esqueleto, arcada dentária, impressões digitais, perfil de DNA, existência de defeitos congênitos, tatuagens, cicatrizes e implantes médicos (Budowle et al., 2005).

Entretanto, no caso de acidentes, homicídios e outros crimes, diferentes níveis de fragmentação e degradação corporal ocorrem de acordo com uma série de circunstâncias, tais como forte impacto, elevadas temperaturas devido a explosões de combustíveis, exposição dos cadáveres a condições ambientais variáveis, fogo, água e até mesmo o atrito mecânico provocado pelos equipamentos utilizados pelas equipes de busca e salvamento (Budimlija et al., 2003).

Desta maneira, o cadáver humano pode ser recuperado em um estado que varia de praticamente intacto até totalmente degradado (Budowle et al., 2005). Nessas situações nas quais ocorre a fragmentação do cadáver, algumas das técnicas de identificação acima citadas podem se tornar ineficazes e, nesses casos, o perfil genético determinado pelos polimorfismos de DNA pode se tornar a única ferramenta informativa (Brenner e Weir, 2003; Budowle et al., 2005).

Através de análises e comparações do DNA de indivíduos, diversos aspectos legais podem ser solucionados, tais como testes de paternidade, casos criminais que envolvam amostras biológicas, questões de heranças, identificação de vítimas de desastres coletivos e identificação de pessoas desaparecidas a partir de restos mortais (Alonso et al., 2005)

1.2 Polimorfismos de DNA

Os constantes progressos na área de biologia molecular vêm aumentando a variedade de marcadores genéticos disponíveis para fins forenses. Apesar de o genoma ser 99,9% compartilhado entre todos os humanos, existem variações em suas seqüências chamadas polimorfismos, que podem ser usados tanto para diferenciar como correlacionar indivíduos. O termo polimorfismo se refere à presença de mais de um alelo em um gene ou marcador genético em uma população; um *locus* é dito polimórfico quando o seu alelo mais comum tem freqüência igual ou inferior a 99% (Cavalli-Sforza et al., 1994). Dentre os principais polimorfismos de DNA, destacam-se os VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*) ou minissatélites, os STRs (*Short Tandem Repeats*) ou microssatélites, os retroelementos (inserções *Alu* e *L1*), as Inserções/Deleções (InDels) e os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*). Estes marcadores, caracterizados por mecanismos e taxas mutacionais peculiares, se distribuem pelos cromossomos X, Y e autossômicos e pelo DNA mitocondrial (nesta última molécula ocorrem basicamente apenas SNPs e InDels), os quais apresentam padrões de herança distintos.

A análise de marcadores polimórficos de DNA é atualmente reconhecida mundialmente como uma técnica forense padrão para a investigação de uma ampla variedade de crimes, desde pequenos delitos (tais como arrombamentos com finalidade de furto, furto de automóveis ou lesões corporais) até crimes hediondos (estupros ou latrocínios) (Bond, 2007). O material biológico eventualmente coletado na cena do crime é processado para se obter um perfil de DNA que, ao ser comparado com o perfil de DNA de suspeitos, auxilia a polícia a estabelecer uma conexão entre o criminoso e a cena do crime, ou até mesmo a eliminar suspeitos durante as investigações (Bond, 2007).

Os polimorfismos de DNA também vêm sendo empregados para a identificação de vítimas de guerra ou de desastres de massa (Brenner e Weir, 2003; Alonso et al., 2005). Um desastre de massa é a ocorrência súbita e inesperada de um evento que resulta em grande número de vítimas fatais, sobreviventes com ferimentos graves, dano material significativo, deslocamento considerável de pessoas e/ou perturbação significativa da sociedade. Os desastres de massa podem ser de natureza acidental (quedas de aviões, descarrilamento ou colisões de trens, incêndios e acidentes químicos ou nucleares), natural (terremotos, tornados, enchentes e tsunamis) ou provocada (ataques diretos em alvos significativos, bombardeamento de áreas populosas, ataques suicidas, carros bombas e utilização de armas químicas e biológicas) (Alonso et al., 2005; Budowle et al., 2005). Até mesmo fatos isolados, como o desaparecimento de pessoas sob situações suspeitas ou que não deixam quaisquer vestígios, quando acumulados ao longo do tempo, apresentam impacto no processo de identificação humana que equivale ao de um desastre de massa (Budowle et al., 2005).

Os STRs, ou microssatélites, são os marcadores genéticos mais utilizados na identificação humana. São polimorfismos gerados por um arranjo em sequência (*in tandem*) de múltiplas cópias de um pequeno segmento de DNA (2 a 6 pares de base apenas). Os STRs mais informativos podem apresentar mais de uma dezena de alelos diferentes e milhares desses polimorfismos já foram identificados em humanos, sendo que algumas estimativas apontam para a existência de cerca de um milhão de STRs distribuídos pelo genoma humano (Butler, 2005; Goodwin et al., 2011).

Devido à diversidade observada em cada locus, tais marcadores são altamente informativos. Os STRs mais polimórficos apresentam elevado poder de discriminação (probabilidade de que dois indivíduos selecionados aleatoriamente possuam genótipos distintos) e baixa probabilidade de *match* (probabilidade de que dois indivíduos selecionados aleatoriamente possuam genótipos idênticos) (Butler, 2005; Goodwin et al., 2011).

Após uma série de estudos relacionados à variabilidade dos STRs, o FBI (*Federal Bureau of Investigation*), agência governamental norte-americana, selecionou um conjunto de 13 STRs que passaram a compor o sistema CODIS (*Combined DNA Index System*) em 1997. Em conjunto, esses 13 marcadores apresentam probabilidade de *match* de aproximadamente $1,7 \times 10^{-15}$, sendo que o perfil composto pelos genótipos mais freqüentes de cada um dos 13 marcadores apresenta uma probabilidade de ocorrência estimada em cerca de 1 em 160 bilhões (Butler, 2005). Em termos práticos, esses valores asseguram que cada indivíduo da população mundial (exceto no caso de gêmeos idênticos) apresente um perfil de marcadores genéticos polimórficos exclusivo no que se refere aos 13 CODIS.

No entanto, existem situações nas quais o material biológico se encontra tão degradado que as amostras de DNA obtidas não estão intactas o suficiente para que o protocolo padrão de tipagem de alguns tipos de polimorfismos proporcione resultados suficientes para a obtenção de uma identificação confiável (Budowle et al., 2005). Nesses casos, a análise de SNPs surge como uma abordagem alternativa para a obtenção de maior quantidade de dados a partir de amostras biológicas altamente degradadas (Budowle et al., 2005), atraindo, portanto, crescente interesse na área forense (Sobrino et al., 2005). Os SNPs podem ser definidos como polimorfismos criados por uma mutação de ponto que resulta na substituição de um nucleotídeo por outro, proporcionando o surgimento de diferentes alelos. Embora estes marcadores possam apresentar até quatro alelos, em sua grande maioria são bi-alélicos, o que os tornam menos informativos para identificação humana do que os marcadores STRs já validados (Brookes, 1999; Budowle et al., 2005).

Apesar da menor informatividade, os SNPs apresentam diversas características que os tornam apropriados para aplicações forenses: (1) apresentam elevada estabilidade e taxas de mutação muito reduzidas, (2) são facilmente analisados em larga escala por meio de tecnologias modernas, (3) são facilmente adaptáveis a novas tecnologias de automação laboratorial e, principalmente, (4) podem ser analisados em pequenos fragmentos amplificados (amplicons de 60 a 80 pares de bases), o que é vantajoso pelo fato de o tamanho do produto amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) ser determinante para o sucesso da análise de amostras degradadas (Sobrino et al., 2005). Estima-se que existam mais de 10 milhões de SNPs nas mais diversas regiões do genoma; quando presentes em exons promotores, eles estão mais

propensos a apresentarem alelos funcionalmente ou fisiologicamente ativos (Brookes, 1999; Sobrino et al., 2005).

Atualmente a aplicação do DNA humano no contexto forense se restringe apenas a uma base comparativa, na qual perfis de DNA, normalmente baseados na análise de STRs, são obtidos de materiais de cenas de crimes e comparados àqueles de suspeitos em potencial. O mesmo ocorre nos casos de desastres em massa ou de desaparecimentos, nos quais o perfil obtido de um indivíduo desconhecido é comparado aos de familiares em potencial, ou mesmo a amostras obtidas nos pertences da pessoa desaparecida (Prinz et al., 2007).

Se forem encontradas similaridades nos perfis de DNA, pode-se estabelecer uma probabilidade de identidade ou parentesco. No entanto, suspeitos desconhecidos (ou pessoas desaparecidas sem parentes conhecidos ou amostras de referência) não poderão ser identificados utilizando-se os marcadores atualmente utilizados para tipagem de DNA. Uma alternativa consiste na comparação de seu perfil genético com aqueles inclusos em um banco de dados de DNA nacional, devido à crimes cometidos anteriormente.

Outros países possuem seus bancos de perfis de DNA próprios. Nestes bancos, como por exemplo, os do Reino Unido (<http://www.npia.police.uk/en/13338.htm>) e dos Estados Unidos (<http://www.fbi.gov/about-us/lab/codis/ndis-statistics>), uma grande quantidade de perfis está armazenada, sendo de grande utilidade para a polícia. No Brasil, no entanto, o CODIS, cedido pelo FBI, está em fase de implementação pela Polícia Federal, dependendo ainda de uma legislação que regulamente a inclusão de perfis genéticos no país.

Mesmo quando estes bancos de perfis de DNA estão disponíveis, eles não são grandes e completos o suficiente para representar a totalidade dos criminosos. Portanto, muitas investigações acabam sem um suspeito conhecido, terminando como casos que não podem ser solucionados com os marcadores de DNA usados atualmente (Kayser e Schneider, 2009).

1.3 Associação entre marcadores genéticos e características físicas

Nos casos em que os bancos de DNA não podem auxiliar na identificação, seria esperado que predições genéticas de características externamente visíveis de um indivíduo pudessem ser de grande ajuda nas investigações policiais e no rastreamento de suspeitos. Avanços recentes na genética parecem ter identificado marcadores potencialmente úteis no futuro para a predição dessas características (Kayser e Schneider, 2009).

Muitas mutações (SNPs) localizadas em regiões codificantes ou regulatórias podem determinar substituições de aminoácidos na proteína, alterando as propriedades funcionais da proteína traduzida e sendo expressas em fenótipos, que são as características que se manifestam de maneira detectável no indivíduo. Estudos que correlacionam genótipos a fenótipos, direcionados principalmente para associações entre variantes genéticas e determinadas doenças (O'rahilly, 2009) ou entre variantes genéticas e resposta de pacientes a determinadas drogas (Wang et al., 2011), vêm sendo sistematicamente conduzidos. Neste contexto, em vista do grande volume de dados produzidos, pode ocorrer a identificação de marcadores associados a características aplicáveis no processo de identificação individual (Branicki et al., 2007).

Na tentativa de se obter informações sobre as características físicas de indivíduos a partir do material genético extraído de material biológico, como gotas de sangue, fios de cabelos ou pequenos fragmentos corporais, para aplicações na área de identificação forense, a associação entre marcadores genéticos e características morfológicas vem sendo intensamente pesquisada pela comunidade científica. Alguns estudos já avaliaram a existência de polimorfismos associados à cor da pele, cabelos e olhos (Frudakis et al., 2007; Graf et al., 2007; Myles et al., 2007; Stokowski et al., 2007; Sulem et al., 2007; Han et al., 2008; Kayser et al., 2008; Sturm et al., 2008; Branicki et al., 2009; Duffy et al., 2010; Edwards et al., 2010; Weeden et al., 2011), espessura de fios de cabelo, formas faciais e estatura (Watson, 2000; Perola et al., 2001; Pulker et al., 2007; Fujimoto et al., 2008).

Neste contexto, espera-se que a genotipagem desses marcadores em material biológico encontrado em cenas de crime possa contribuir significativamente com informações cada vez mais precisas sobre as características físicas dos envolvidos (Walsh, 2004; Branicki et al., 2007). Embora as inferências daí advindas provavelmente não apresentarem valor definitivo como prova pericial ou forense, devido ao grau ainda grande de subjetividade inerente a elas, elas poderão constituir um fator importante no direcionamento de investigações conduzidas em uma esfera liderada pelo serviço de inteligência da polícia, podendo reduzir um problema de grandes dimensões a um conjunto reduzido de suspeitos, e seu valor seria equivalente ao de uma prova testemunhal (depoimentos de vítimas ou testemunhas) (Walsh, 2004). Pode-se considerar que, entre as características físicas mais notáveis, a cor da pele, cabelo e olhos são características humanas amplamente variáveis e facilmente

reconhecidas (Soejima e Koda, 2007); portanto, sua predição teria grande valor nas investigações forenses.

1.4 Biologia da pigmentação

1.4.1 Pigmentação dos cabelos, pele e olhos.

A cor da pele é, exceto em raros casos patológicos, o resultado de três pigmentos ou cromóforos: melanina, hemoglobina e, em uma escala muito menor, carotenóides presentes na dieta. No entanto, as diferenças observadas entre as cores de cabelo e pele são resultantes principalmente do conteúdo e distribuição de melanina na pele dos indivíduos (Rees, 2003).

A melanina é uma substância sintetizada a partir da oxidação enzimática do aminoácido tirosina, sendo que sua produção ocorre dentro de organelas denominadas melanossomos em células especializadas, denominadas melanócitos. Variações nas cores de pele e cabelo, observadas em diferentes regiões geográficas, resultam da produção, distribuição e empacotamento de dois tipos distintos de melanina depositadas na epiderme ou fios de cabelo: a eumelanina, que é um pigmento castanho/preto e a feomelanina que é um pigmento vermelho/amarelo (Rana et al., 1999; Gerstenblith et al., 2007) (Figura 1).

Figura 1- Via metabólica da biossíntese de eumelanina/feomelanina a partir da tirosina, mostrando a atuação dos diversos genes/enzimas (retirado de Ito e Wakamatsu, 2010)

Na pele humana, esses melanossomos serão posteriormente distribuídos para os queratinócitos localizados na junção entre a epiderme e a derme (McEvoy et al., 2006) (Figura 2). Considera-se que, em geral, peles mais pigmentadas contêm partículas melanossomais maiores e mais numerosas, enquanto a pigmentação mais clara está associada com melanossomos menores e menos abundantes (Yamaguchi et al., 2007) (Figura 2). Um fator importante a ser mencionado se refere ao fato de esses padrões distintos de distribuição estarem presentes desde o nascimento, não sendo necessariamente determinados pela exposição ao sol (Sturm et al., 1998).

Figura 2- Esquema da arquitetura da pele clara e escura. BM, membrana basal; D, derme. Tipos celulares: K, queratinócito; M, melanócito; F, fibroblasto; formas ovais, melanossomos (adaptado de Yamaguchi et al., 2007)

Ainda a respeito da pigmentação da pele, a ocorrência de sardas (pequenos aglomerados de melanina concentrado em certos pontos na pele), que comumente incide em indivíduos de pele clara, ocorre por conta da reação da pele à exposição ao sol, tendo função de proteção aos raios UV. A reação aos raios UV promove um aumento na produção de melanina nos melanócitos, tornando-os mais escuros (Bastiaens et al., 2001).

Com relação aos cabelos, pessoas de cabelos ruivos apresentam um aumento relativo das quantidades de feomelanina comparadas às de eumelanina, enquanto nos cabelos negros as quantidades de eumelanina prevalecem e nos cabelos loiros há um

pouco de cada tipo (Rees, 2003). Além disso, apesar da origem embrionária comum dos melanócitos da pele e do cabelo, os genes que afetam a pigmentação podem se expressar de maneira independente, gerando combinações conhecidas de cabelos escuros e pele clara ou cabelos claros e pele escura (Sturm et al., 2001).

Já no caso dos melanócitos dos olhos, os melanossomos não são secretados, mas mantidos no citoplasma (Nordlund et al., 1998) (Figura 3). Sabe-se que, apesar de todas as colorações de olhos possuírem um número similar de melanócitos, os olhos azuis contêm um mínimo de pigmentos e poucos melanossomos; olhos verdes são resultado de moderados níveis de pigmentos, intensidade de melanina e número de melanossomos, enquanto olhos castanhos são resultado de níveis altos de melanina e grande quantidade de partículas melanossomais (Sturm e Frudakis, 2004). Entretanto, estudos acerca das proporções eumelanina/feomelanina que possam vir a determinar a cor dos olhos ainda são inconclusivos (Prota et al., 1998) (Figura 3).

Um aspecto interessante relacionado à pigmentação está ligado à evolução dos humanos. Os seres humanos se diferem dos outros primatas e de muitos mamíferos por terem perdido a maior parte dos pêlos do corpo. A explicação mais aceita se refere à vantagem evolutiva conferida por serem capazes de transpirar de maneira mais eficiente, o que contribui no processo de regulação da temperatura corporal. No entanto, a ausência de pêlos leva à necessidade da elaboração de uma proteção contra a radiação ultravioleta (UV), particularmente em áreas da pele com alta exposição ao sol. A principal maneira de se alcançar isso é através da síntese da melanina. A melanina é capaz de absorver radiação eletromagnética no comprimento de onda UV,

protegendo assim o DNA, as proteínas e outras macromoléculas dos efeitos nocivos desses raios (Rees, 2003)

Figura 3- Pigmentação dos olhos - diferenças entre os tipos e quantidade de melanossomos nos melanócitos dos olhos mais claros aos mais escuros (adaptado de Sturm e Frudakis, 2004)

A variação geográfica com relação à pigmentação da pele faz sentido quando analisada em função da radiação UV: a pele negra oferece maior proteção em ambientes caracterizados por elevada incidência de radiação UV (baixas latitudes), enquanto que a pele clara facilita o processo de biossíntese de vitamina D em regiões onde a incidência de radiação UV não é tão alta (elevadas latitudes) (Soejima e Koda, 2007).

1.4.2 Genética da pigmentação

Estima-se que mais de 120 genes estejam envolvidos com a produção, distribuição e secreção da melanina através dos melanócitos, contribuindo com o

processo da pigmentação (Branicki et al., 2007). A enzima tirosinase, codificada pelo gene *TYR*, é a conversora da tirosina em dopaquinona (Figura 1), precursora por sua vez da eumelanina e feomelanina. Mutações nesse gene podem levar à ausência da proteína funcional, impedindo totalmente a produção de melanina, condição chamada de albinismo oculocutanêo tipo 1. Mutações nulas no gene *OCA2* podem também resultar em outro tipo de albinismo, por reduzir a produção de eumelanina. Acredita-se que dois outros genes, *SLC24A5* e *SLC45A2*, codifiquem proteínas responsáveis pelo transporte transmembrana de sódio-cálcio e sódio-prótons nos melanócitos, respectivamente. Além disso, o *SLC45A5* também está relacionado ao transporte de proteínas melanossomais (tirosinase) juntamente com o *OCA2* (Ito e Wakamatsu, 2010).

Um aspecto interessante da melanogênese consiste no fato de que o pH dos melanócitos pode ter uma grande influência nas vias de produção de melanina. Observou-se que melanócitos obtidos de peles claras possuem melanossomos de pH ácido, enquanto aqueles obtidos de peles escuras possuíam um pH próximo do neutro (Smith et al., 2004). Evidências recentes levam a acreditar que polimorfismos dos genes *OCA2* e *SLC24A5* possam levar à acidificação dos melanossomos (Ito e Wakamatsu, 2010).

Até o momento, o gene *MC1R* (receptor de melanocortina 1 [MIM 155555]) é o mais bem caracterizado dentre os genes descritos que influenciam a variação normal de pigmentação em humanos (Gerstenblith et al., 2007). Estudo publicado na revista *Science* envolvendo a análise por seqüenciamento de polimorfismos deste gene revelou que os Neandertais, grupo extinto de hominídeos que habitou a região da

Eurásia entre 28.000 e 400.000 anos atrás, possuíam cabelos ruivos e pele clara (Culotta, 2007; Lalueza-Fox et al., 2007). Dentre os vários genes envolvidos na pigmentação, o *MC1R* constitui um determinante chave em tal processo (Wong e Rees, 2005).

O *MC1R* é um gene composto por apenas um exon de 951 pares de bases, localizado no cromossomo 16 (16q24.3), responsável pela codificação de uma proteína transmembrana de 7 passos (317 aminoácidos), chamada de receptor de melanocortina 1 (Figura 4). Esse receptor está localizado na superfície celular dos melanócitos e desempenha papel importante na via de produção da melanina. Observou-se que o gene *MC1R* regula a produção dos principais constituinte da pigmentação humana, a eumelanina e a feomelanina (Makova e Norton, 2005).

Figura 4 - Estrutura do MC1R na superfície celular do melanócito, com suas 7 hélices transmembrana (retirado de Lalueza-Fox et al. (2007))

O receptor de melanocortina 1 pertence à família dos receptores associados à proteína G (GPCRs). Em mamíferos, esse receptor responde ao hormônio melanócito-estimulante (α -MSH) e, quando ligado, ativa a proteína G, que por sua vez ativa a adenilato-ciclase a sintetizar AMP cíclico (cAMP), elevando seus níveis. Por consequência, com os níveis de cAMP aumentados, a transcrição de uma série de genes é alterada, entre eles o gene *TYR*, aumentando os níveis de tirosinase (Figura 5),

levando por fim à produção de eumelanina, de cor castanha/preta. No entanto, a ausência ou redução parcial dessa sinalização leva à produção de feomelanina (Makova e Norton, 2005).

Figura 5- Via de sinalização da melanocortina (α -MSH). O α -MSH se liga ao MC1R, ativando-o. As proteínas G transmitem o sinal para a adenilato-ciclase (AC), que converte ATP em cAMP, induzindo a expressão de fatores de transcrição (como o MITF) que promovem a síntese da tirosinase (retirado de Kabbarah e Chin (2006)

Alguns estudos indicam que alterações conformacionais desse receptor podem alterar significativamente sua atividade. Yang et al. (1997) mostraram que a substituição de aminoácidos constituintes do MC1R (Glu94, Asp117 e Asp121) levou a uma diminuição da capacidade dele se ligar ao hormônio sinalizador, levando a uma alteração na sinalização intracelular dos melanócitos, o que gera aumento na síntese de feomelanina. Um outro estudo (Robbins et al., 1993) revelou que modificações nos aminoácidos Ser69, Glu92 e Leu98 desse receptor, situados no segundo domínio

transmembrana, o tornam permanentemente ativo, independente da ligação com o hormônio sinalizador, o que gera aumento na síntese de eumelanina.

Diversos estudos em diferentes populações, realizados durante a última década, têm demonstrado que a região codificadora do gene *MC1R* é altamente polimórfica em europeus, apresentando mais de 70 variantes já identificadas (Gerstenblith et al., 2007), e apresenta impacto significativo no fenótipo de pigmentação neste grupo étnico (Harding et al., 2000; Sturm, 2006). Alguns estudos demonstram que vários alelos de SNPs do gene *MC1R* (em particular Arg151Cys, Arg160Trp e Asp294His), descritos como alelos de função reduzida ou alelos que afetam a expressão do receptor na membrana dos melanócitos, estão significativamente associados a um aumento na produção de feomelanina, que se manifesta em cabelos ruivos, cor de pele clara e presença de sardas (Harding et al., 2000; Sturm, 2006).

Em outros estudos, por outro lado, evidencia-se o fato de que existe uma pequena taxa de mutações não-sinônimas (isto é, mutações que levam à alteração de aminoácidos) na sequência do gene *MC1R* em populações africanas, indicando que tal gene está sob forte pressão seletiva direcionada à manutenção da função gênica na África. A inexistência de mutações não-sinônimas na África sugere que este gene de pigmentação esteja sob forte pressão purificadora, o que resulta na manutenção de poucos alelos funcionais distintos, permitindo assim manter os altos níveis de eumelanina, provavelmente como forma de minimizar os efeitos da exposição à radiação UV. Comparando-se a diversidade em sítios silenciosos observa-se que a

diversidade africana é de 0,25%, comparada com 0,08% e 0,09% na Europa e Ásia, respectivamente (Harding et al., 2000; Norton et al., 2007; Sulem et al., 2007).

A alta taxa de mutações não-sinônimas existente na Europa e Leste Asiático demonstra um relaxamento da pressão seletiva purificadora sobre o gene MC1R, uma vez que a perda de função gênica poderia ser tolerada. A pigmentação clara da pele teria sofrido seleção positiva nessas altas latitudes, levando essa característica a ser praticamente fixada. Observa-se ainda nas regiões Sudeste e Leste da Ásia a existência de algumas variantes específicas a tal continente (Thr157Ile e Pro159Thr), bem como variações significativas nas frequências de alguns alelos de SNPs do MC1R (por exemplo, Arg163Gln e Val92Met), sendo que eles aparentemente inexistem na região Sul do continente (Nakayama et al., 2006; Sturm, 2006).

1.5 População Brasileira

A composição genética da população brasileira é reflexo de cinco séculos de mistura inter-étnica envolvendo principalmente povos de três continentes (Europa, África e Américas), o que a caracteriza como uma das populações mais heterogêneas do mundo (Parra et al., 2003). No ano de 1500, com a chegada dos primeiros colonizadores, mais de dois milhões de indígenas já habitavam a região. Os nativos sofreram então uma drástica redução populacional tanto devido aos conflitos com os colonizadores e quanto às doenças trazidas por eles, tais como catapora e sarampo. Antes de 1820, a colonização européia se deu quase que exclusivamente por portugueses. Entre 1820 e 1975, a grande maioria dos seis 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 (IBGE). 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).

De acordo com o censo realizado em 2000 (IBGE), dos 170 milhões de brasileiros entrevistados, 53% se auto-declararam como “brancos”, 38% como “pardos”, 6% como “negros” e 3% disseram pertencer a outras categorias. As proporções aqui mostradas variam consideravelmente entre as diferentes regiões geográficas brasileiras, reflexo das particularidades de sua colonização. No estado de São Paulo (com aproximadamente 40 milhões de habitantes), as frequências foram de 70%, 23%, 4% e 3% respectivamente.

Atualmente estudos baseados em marcadores genéticos consideram que a população urbana de Ribeirão Preto é altamente miscigenada, sendo os brancos caracterizados por contribuições de 79%, 14% e 7% de Europeus, Africanos e Ameríndios, respectivamente (Ferreira et al., 2006), os mulatos caracterizados por contribuições de 62%, 26% e 12% de Europeus, Africanos e Ameríndios, respectivamente (Muniz et al., 2008) e os negros caracterizados por contribuições de 37%, e 63% de Europeus e Africanos, respectivamente (Muniz et al., 2008).

Todos estes dados demonstram que o povo brasileiro possui elevada taxa de miscigenação, representada pelas contribuições de indivíduos de origens étnicas distintas, como europeus de diversas regiões, africanos vindos principalmente da região do Niger-Congo da África equatorial e populações ameríndias (França, 2001)nativas. Tal heterogeneidade étnica se reflete na alta diversidade fenotípica vista

nos brasileiros. Dessa forma, pode-se considerar os brasileiros como uma população que apresenta condições propícias para a identificação de novos alelos e haplótipos em genes de pigmentação e para avaliação genética relacionada aos fenótipos morfológicos.

2 – JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Considerando que a genotipagem do material biológico encontrado em cenas de crime pode contribuir significativamente com informações cada vez mais precisas sobre as características físicas dos envolvidos (Walsh, 2004; Branicki et al., 2009), tais dados seriam importantes no direcionamento de investigações, podendo levar a um conjunto reduzido de suspeitos.

A análise de um conjunto de polimorfismos localizados na região codificadora de genes de pigmentação em populações urbanas permite avaliar o potencial destes marcadores para a realização de inferências fidedignas relacionadas às cores de pele e cabelos de indivíduos brasileiros. O MC1R é o único gene identificado até agora que explica variações fenotípicas substanciais na pigmentação humana (Gerstenblith et al., 2007). Harding et al. (2000) afirmam que várias características do MC1R o tornam ideal para o estudo de genética de populações, tais como: (a) facilidade no seqüenciamento completo, por se tratar de um gene pequeno; (b) papel funcional do gene nas vias bioquímicas da melanogênese bem conhecido; (c) detalhes sobre associações entre genótipo-fenótipo e as variantes do MC1R já terem sido estabelecidos

Além disso, considerando-se a grande variabilidade fenotípica e genética da população brasileira, com padrões alélicos e haplotípicos distintos, nota-se a importância da realização de estudos genéticos em uma população tão miscigenada. A confirmação dos resultados obtidos em trabalhos realizados em outras populações geneticamente mais homogêneas, como a européia pode ser de extrema importância. A partir das confirmações desses estudos, uma melhor compreensão das associações já encontradas pode ser obtida.

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a diversidade genética revelada pelo seqüenciamento completo da região codificadora do gene MC1R em uma amostra da população brasileira, estratificada de acordo com a pigmentação da pele, cabelos e olhos e presença de sardas.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar as frequências de alelos, genótipos e haplótipos de SNPs descritos no gene MC1R;
- Avaliar a intensidade do desequilíbrio de ligação entre alelos de SNPs encontrados na região codificadora do gene MC1R;
- Avaliar a intensidade de correlação entre alelos/haplótipos de SNPs do gene MC1R e características fenotípicas;
- Identificar um conjunto de polimorfismos do gene MC1R que contribuam para a determinação da pigmentação da pele, cabelos e olhos, e presença de sardas, em indivíduos da população brasileira.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostra populacional

Foram coletadas amostras de sangue de um total de 296 voluntários não aparentados dos sexos masculino e feminino dos diferentes grupos étnicos que compõe a população brasileira, com idade variando de 18 a 40 anos, recrutados, em sua grande maioria, no Hemocentro de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP). Estes indivíduos foram classificados através de um questionário (APÊNDICE 1) em grupos de acordo com a cor dos olhos, cabelos e pele, segundo o sistema proposto por Fitzpatrick (1988), utilizado em outros estudos que abordam a pigmentação humana (Rana et al., 1999). Além disso, foi avaliada a presença ou ausência de efélides (sardas).

Cada indivíduo assinou um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE 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 (APÊNDICE 3).

3.2 Determinação das características dos indivíduos

O sistema elaborado por Fitzpatrick ainda é muito utilizado em estudos para a classificação dos tipos de pele (Odunze et al., 2007; Emmett et al., 2008; Ruiz-

Rodriguez et al., 2008; Szell et al., 2008; Elfakir et al., 2010), por ser relativamente preciso e de fácil aplicação. A classificação é feita por meio de uma tabela, baseada em 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

3.3 Análise Laboratorial

3.3.1 Extração de DNA

Logo após a coleta, as amostras de sangue foram submetidas a centrifugação, sendo o sobrenadante (plasma) estocado em frascos a -80°C para eventuais usos futuros. O DNA das amostras de sangue foi então extraído através do protocolo de *salting-out* (Miller et al., 1988) detalhado a seguir.

Cerca de 10 mL de sangue foi coletado em tubo contendo EDTA como anticoagulante. O sangue foi transferido para um tubo de 50mL e adicionado tampão de lise I (Tris-HCl 0,01M-pH 7,5; Sacarose 0,3M; $MgCl_2$ 0,005M; Triton 1%; H_2O qsq) gelado até completar o volume final. Misturou-se delicadamente o conteúdo do tubo por inversão e centrifugou-se os tubos por 10 minutos a 3300 rotações por minuto (rpm) a 4°C. Esta etapa é responsável pela lise dos glóbulos vermelhos da amostra.

O sobrenadante (hemácias lisadas) foi então descartado cuidadosamente e a extração prosseguiu com o pellet de células retido no fundo do tubo. O pellet de células foi ressuspenso em 4,5mL de tampão de lise II (NaCl 0,075M; NaEDTA 0,024M), 125 μ L de SDS 10% e 1,1mL de perclorato de sódio 5M. A mistura foi agitada num Vortex por 10 segundo a temperatura ambiente. Esta etapa é responsável pela lise dos glóbulos brancos. Adicionou-se 2mL de NaCl 6M saturado e agitou-se no Vortex por 15 segundos também à temperatura ambiente. Este passo é responsável por lisar as proteínas presentes.

Centrifugou-se o tubo por 10 minutos à 3300 rpm a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido cuidadosamente para um tubo de 50mL limpo. Adicionou-se 5mL de isopropanol absoluto à temperatura ambiente ao sobrenadante no tubo e homogeneizou-se gentilmente até que o DNA se precipitasse.

O DNA foi então retirado com auxílio de uma pipeta estéril e colocado em um tubo de 1,5mL contendo 1mL de etanol 75% gelado. O tubo então foi centrifugado por 10 minutos a 4°C e posteriormente o sobrenadante foi descartado. O tubo então foi colocado em uma centrífuga à vácuo por 10 minutos para que o restante do etanol

fosse removido. O DNA no fundo do tubo foi então dissolvido em 400 µL de água estéril e armazenado em freezer a -20°C.

3.3.2 Amplificação por PCR do gene MC1R

A técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi utilizada para amplificação completa de toda a região codificante do gene MC1R com os *primers* 5'-GCAGCACCATGAACTAAGCA-3' e 5'-CAGGGTCACACAGGAACCA-3'. Os reagentes foram empregados em quantidades específicas e a mistura de reação foi submetida a ciclos definidos de temperaturas, de acordo com as condições descritas na literatura (Kanetsky et al. 2004; Branicki et al. 2007), gerando um produto de amplificação de 1124pb, o qual abrange completamente o único exon de 951pb (317 códon) do gene MC1R.

Reagentes utilizados para amplificação por PCR do gene MC1R

REAGENTES	MC1R
DNA genômico (0,6 µg/µl)	1,00 µl
Água deionizada autoclavada	8,25 µl
Tampão de reação	2,75 µl
<i>Primer forward</i> (2,5mM)	2,50 µl
<i>Primer reverse</i> (2,5mM)	2,50 µl
Solução de dNTPs (20mM)	2,50 µl
Bovine Serum Albumine (50mg/ml)	0,4 µl
<i>Taq</i> polimerase (5U/µl)	0,10 µl
Volume total da reação	20,00 µl

Regime de temperaturas utilizado na reação de PCR do MC1R

TEMPERATURAS		TEMPO
Denaturação inicial	94°C	5 minutos
32 Ciclos	Denaturação	94°C 1 minuto
	Pareamento	58°C 1 minuto
	Extensão	68°C 2 minutos
Extensão final	72°C	10 minutos
Tamanho do fragmento		1124 pb

Sendo o tampão de reação da marca Invitrogen (TRis/HCl 75mM pH 9,0; KCl 50mM; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20mM; MgCl_2 2,0mM), a solução de dNTPs Promega, a albumina bovina (BSA) Applied Biosystems, a Taq polimerase Platinum® (Invitrogen) e o DNA das amostras encontrava-se em concentração de 0,6µg/µl em média.

3.3.3 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da reação de PCR foram inicialmente avaliados através da separação eletroforética em gel de agarose 0,8%, preparado através da mistura de 0,8 mg de agarose com 100 mL de tampão TBE 1x (Tris-HCl 0,9M – pH 8,0; EDTA; Ácido Bórico). A mistura é aquecida até que se dissolva toda a agarose. Após um pequeno período de resfriamento, adiciona-se 2 µL de brometo de etídio e coloca-se a mistura para solidificar em uma cubeta horizontal.

Após a polimerização do gel, este é colocado em uma cuba de eletroforese horizontal, e adiciona-se tampão TBE 1x até que ele seja totalmente coberto. Em cada

poço do gel, aplica-se 3 μL de produto da PCR, juntamente com 2 μL de tampão de carregamento (*loading buffer* – TBE 1x; Xilenocianol 0,25%; Azul de Bromofenol 0,25%; EDTA 0,1M pH 8,0; Ficoll 15%). A cuba de eletroforese é conectada a uma fonte de eletroforese de alta voltagem e a separação dos fragmentos é realizada durante 60 minutos a 100 volts, com corrente liberada.

Após o término da eletroforese, o gel é retirado da cuba e analisado em transluminador UV, para verificar se houve a amplificação correta das bandas específicas do gene alvo (1124bp). Além de verificada a presença da banda do MC1R, deve-se atentar para a ausência de outras bandas inespecíficas, que poderiam atrapalhar as etapas seguintes de seqüenciamento. Foram tiradas fotos de cada gel, permitindo que a leitura fosse armazenada caso houvesse necessidade de análises posteriores

3.3.4 Seqüenciamento completo do gene MC1R

Após a confirmação da amplificação e da avaliação da qualidade do produto de PCR purificado, foi realizada a reação de seqüenciamento, utilizando-se o conjunto de reagentes *ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*® (Amersham Pharmacia Biotech, EUA). Adicionou-se 1,2 μL de *BigDye*, 1,28 μL de *primer* específico para a extremidade a ser seqüenciada, 3 μL de tampão da reação e 4,32 μL de água deionizada autoclavada a 0,2 μL de produto de PCR. Os mesmos *primers* utilizados inicialmente na reação de PCR foram empregados na reação de seqüenciamento (*primer forward* ou *reverse*) seguindo o regime de temperaturas indicado pelo fabricante.

Regime de temperaturas utilizado na reação de seqüenciamento

TEMPERATURAS		TEMPO
Denaturação inicial	96°C	1 minuto
25 Ciclos	Denaturação	96°C 10 segundos
	Pareamento	50°C 5 segundos
	Extensão	60°C 4 minutos

O produto da reação de seqüenciamento foi então precipitado em isopropanol. Em um tubo de 1,5 mL adiciona-se 10 µL do produto resultante da reação de seqüenciamento e 80 µL de isopropanol 75%; agita-se rapidamente e mantém em temperatura ambiente por 15 minutos. Centrifuga-se o conteúdo dos microtubos a 14.000 rpm durante 20 minutos. Retira-se então o sobrenadante, acrescenta-se 250 µL de isopropanol 75% e centrifuga-se novamente o conteúdo dos microtubos a 14.000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante é descartado e o conteúdo do microtubo é seco por pelo menos 10 minutos em secadora à vácuo. O precipitado é então ressuscitado em 20 µL de formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems, EUA), incubado em temperatura de 94°C por 2 minutos e em seguida mantido em gelo moído por 15 minutos. Por fim, as amostras foram encaminhadas para o seqüenciador automático de DNA ABI PRISM® 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, EUA).

A leitura e alinhamento das seqüências foram feitos pelo programa Lasergene SeqMan 7.0® (DNASTAR, Inc., EUA). As seqüências obtidas foram analisadas com ênfase em 29 *loci* polimórficos previamente descritos (Rees, 2003; Wong e Rees, 2005; Mengel-From et al., 2009). Esses *loci* foram selecionados por serem reconhecidamente

polimórficos e por terem sido empregados em diversos estudos sobre a genética da pigmentação humana envolvendo o gene MC1R, sendo muitos deles já associados a características fenotípicas em populações europeias (Rees, 2003; Wong e Rees, 2005; Mengel-From et al., 2009).

3.4 Análises estatísticas dos dados

As análises estatísticas foram realizadas tomando-se como base os 29 SNPs selecionados conforme descrição em item anterior. Algumas análises levaram em consideração a estratificação dos indivíduos de acordo com a presença/ausências de sardas, pigmentação dos olhos (azul, verde, mel, castanho claro ou castanho escuro), pigmentação dos cabelos (ruivo, loiro, castanho ou preto), ou tipo de pele baseado na classificação de Fitzpatrick (1988) [clara (tipo I + II), média (tipo III + IV) ou escura (tipo V + VI)].

A nomenclatura utilizada para os SNPs segue a lógica da posição ocupada por cada base no mRNA, considerando a posição +1 como sendo a primeira base transcrita do gene. A Tabela 1 abaixo mostra a nomenclatura dos 29 SNPs utilizada nesse trabalho, seguida por suas variações conhecidas, além de fazer referência à posição ocupada por cada base na região codificadora do gene e à mudança de aminoácido gerada pela mutação, se for o caso, além de seu número de referência (rs number) no banco de dados dbSNP do NCBI (Sherry et al., 2001).

Tabela 1 – Posições dos 29 SNPs analisados em relação à base ocupada no RNA mensageiro (mRNA), na região codificadora (951pb), nos aminoácido da proteína (314 aminoácidos) e seu respectivo número de referência no banco de dados do dbSNP.

Posição mRNA	Posição Região codificadora	Posição Aminoácido	rs number
+1513 TC	133	Phe45Leu	61996344
+1558 GT	178	Val60Leu	1805005
+1580 GA	200	Arg67Gln	34090186
+1627 TC	247	Ser83Pro	34474212
+1632 CA	252	Asp84Glu	1805006
+1645 GA	265	Gly89Arg	34540312
+1654 GA	274	Val92Met	2228479
+1664 CT	284	Thr95Met	34158934
+1690 GA	310	Gly104Ser	2229617
+1698 GA	318	Leu106	3212364
+1739 TC	359	Ile120Thr	33932559
+1805 GA	425	Arg142His	11547464
+1831 CGT	451	Arg151Cys	1805007
+1844 TC	464	Ile155Thr	1110400
+1846 GC	466	Val156Leu	3212365
+1858 CT	478	Arg160Trp	1805008
+1868 GA	488	Arg163Gln	885479
+1877 CG	497	Ala166Gly	35040147
+1884 CT	504	Ile168	34612847
+1891 GT	511	Ala171Ser	35784916
+1929 CT	549	Tyr183	34209185
+1966 TC	586	Phe196Leu	3212366
+2013 GA	633	Leu211	34564466
+2097 CT	717	Gly239	34490506
+2195 CT	815	Thr272Met	12102534
+2260 GC	880	Asp294His	1805009
+2280 CT	900	Phe300	3212367
+2322 AG	942	Thr314	2228478
+2346 GA	-	-	3212368

3.4.1 Frequências alélicas e heterozigose

As frequências alélicas de cada SNP foram calculadas nas amostras, tanto separadas por fenótipo quanto globalmente, por contagem direta pelo programa

Genepop 4.0 (Rousset, 2008). Considerando-se a representação da frequência relativa de um genótipo A_iA_j como sendo X_{ij} , temos que a frequência do alelo i é dada por:

$$x_i = X_{ii} + \sum_{j \neq i} \frac{X_{ij}}{2}$$

onde $\sum_{j \neq i} X_{ij}$ indica a somatória de frequência de todos os genótipos que apresentam o alelo i , exceto quando $i = j$ (Nei, 1987).

A heterozigose esperada (H_S) foi calculada pelo programa Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010) a partir das equações:

$$\hat{H} = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

$$V(\hat{H}) = \frac{2}{n(n-1)} \left\{ 2(n-2) \left[\sum_{i=1}^k p_i^3 - \left(\sum_{i=1}^k p_i^2 \right)^2 \right] + \sum_{i=1}^k p_i^2 - \left(\sum_{i=1}^k p_i^2 \right)^2 \right\}$$

Onde n é igual ao número de cópias gênicas na amostra, k é o número de alelos e p_i é a frequência do i -ésimo alelo na amostra. O desvio padrão é calculado pela raiz quadrada de $V(H)$.

3.4.2 Equilíbrio de Hardy-Weinberg

A aderência das frequências genotípicas ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi verificada pelo método de enumeração completa descrito por Louis e

Dempster (1987), utilizando-se o programa Genepop 4.0 (Rousset, 2008). Este método avalia todas as possíveis tabelas de distribuições genotípicas que apresentem mesmas frequências alélicas e tamanho amostral em relação à amostra original, sendo que o valor de p do teste corresponde à somatória das probabilidades de todas as tabelas que apresentarem probabilidades (Pr) iguais ou menores do que a da tabela original.

$$Pr = \frac{n! \prod_{i=1}^m f_i!}{(2n)! \prod_{j>i} f_{ij}!} 2^{\sum_{j>i} f_{ij}}$$

A hipótese nula deste teste é de que a união dos gametas ocorre de maneira aleatória.

3.4.3 Inferência computacional de haplótipos

Dada a pequena distância física entre os SNPs considerados e a presença de desequilíbrio de ligação significativo entre eles, foram utilizados dois programas para a reconstrução dos haplótipos a partir dos dados de SNPs obtidos das amostras: o programa Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010) e o programa PHASE 2.1 (Stephens et al., 2001; Stephens e Scheet, 2005). O intuito de se utilizar dois programas similares para a reconstrução se baseia no fato de que cada um utiliza um algoritmo diferente para os cálculos realizados. Dessa forma, observando-se os resultados e comparando-se os valores de significância de cada reconstrução, pode-se avaliar se as mesmas foram bem sucedidas e não diferiram entre si.

O Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010) se utiliza do algoritmo EM (*Expectation-Maximization*) (Excoffier e Slatkin, 1995) para a reconstrução. Nele, 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 levando-se em consideração apenas aspectos probabilísticos.

Já o método do algoritmo utilizado pelo programa PHASE 2.1 (Stephens et al., 2001; Stephens e Scheet, 2005) se baseia em princípios de estatística Bayesiana associados a conceitos da teoria da coalescência. Desta forma, o par de haplótipos mais provável de cada indivíduo é inferido levando-se em consideração não apenas aspectos probabilísticos, mas também aspectos evolutivos, ao levar em consideração a semelhança entre as seqüências de DNA que compõem toda a amostra populacional.

Também foram calculadas as diversidades haplotípicas dos haplótipos gerados. A diversidade haplotípica é equivalente à heterozigose esperada para dados diplóides. Ela é definida como a probabilidade de dois haplótipos escolhidos aleatoriamente serem diferentes na amostra. A diversidade e sua variância são calculadas pela mesma fórmula da heterozigose descrita anteriormente sendo que, nesse caso, n é igual ao número de cópias gênicas na amostra, k é o número de haplótipos e p_i é a frequência do i -ésimo haplótipo na amostra. O desvio padrão é calculado pela raiz quadrada de $V(H)$.

3.4.4 Desequilíbrio de ligação

O desequilíbrio de ligação entre os *loci* estudados foi testado utilizando-se o programa Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010). Após a reconstrução de haplótipos,

com a fase gamética conhecida, o programa busca pela presença de associações significativas entre pares de *loci*. O programa calcula os coeficientes de desequilíbrio D , D' e r^2 onde:

- D é o coeficiente clássico de medida do desequilíbrio, medindo desvios das associações aleatórias entre os pares de *loci* diferentes, representado por:

$$D = p_{ij} - p_i p_j ,$$

onde p_{ij} corresponde a frequência do haplótipo formado pelos alelos i no primeiro *locus* e j no segundo e $p_i p_j$ corresponde à frequências dos alelos i e j

- D' é o coeficiente de desequilíbrio D padronizado pelo valor máximo que ele pode alcançar ($D_{\max}$) de acordo com as frequências alélicas;

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

- r^2 é uma outra medida de desequilíbrio de ligação sendo o quadrado do coeficiente de desequilíbrio de ligação (D) dividido pelo produto das frequências alélicas dos loci envolvidos:

$$r^2 = D^2 / (p_A q_a p_B q_b)$$

O programa então gera um histograma e uma tabela mostrando as associações encontradas entre os pares analisados, com seus respectivos níveis de significância.

Também foi utilizada a representação gráfica gerada pelo programa Haploview 4.2 (Barrett et al., 2005), para visualização dos blocos haplotípicos presentes ao longo

do trecho analisado e das regiões com forte desequilíbrio de ligação. O Haploview permite, através dessa representação, a análise do nível de desequilíbrio entre cada par de SNPs do segmento de DNA em questão.

3.4.5 Diversidade haplotípica e rede de haplótipos

Foi construída uma *network* de haplótipos utilizando-se o programa Network 4.6 (Fluxus Engineering), através do algoritmo *median-joining* (Bandelt et al., 1999) relacionando todos os haplótipos gerados por nossas reconstruções. Nela, os haplótipos são representados por círculos enquanto as linhas que os unem representam as mutações que diferenciam uns dos outros. Esse tipo de recurso é muito útil na elaboração de inferências a respeito da evolução dos haplogrupos originados a partir de haplótipos ancestrais, além de permitir a visualização das relações existentes entre os haplótipos analisados.

3.4.6 Associações de fenótipos aos genótipos

Para verificação da existência de associações entre alelos, genótipos ou haplótipos e um determinado fenótipo, foi utilizado o Teste exato de Fisher, empregando-se o programa GraphPad InStat 3.06 (Graphpad Software, 2003). O GraphPad InStat foi também empregado para determinar a magnitude desta associação por meio do cálculo de *Odds Ratio* e seu intervalo de confiança de 95%.

O *Odds Ratio* corresponde à razão entre a probabilidade de um indivíduo apresentar um determinado fenótipo quando possuir um determinado

alelo/genótipo/haplótipo e a probabilidade de um indivíduo não apresentar o fenótipo quando possuir o mesmo alelo/genótipo/haplótipo. Este parâmetro é apropriado para estudos de associação e representa o risco de uma pessoa apresentar o fenótipo considerado dado que possua o alelo/genótipo/haplótipo em questão. Por exemplo, um *Odds Ratio* igual a 10 significa que o fenótipo considerado ocorre com frequência dez vezes maior em indivíduos que apresentem o alelo, genótipo ou fenótipo em questão do que em indivíduos que não os apresentem.

4 – RESULTADOS

4.1 Amostra populacional

Para realizar a genotipagem das amostras, os produtos da reação de PCR foram avaliados através da separação eletroforética em gel de agarose 0,8%, a fim de se verificar a amplificação adequada e ausência de fragmentos inespecíficos (Figura 5 A). As amostras que apresentavam amplificação de boa qualidade eram seqüenciadas. Posteriormente os resultados dos seqüenciamentos eram analisados pelo programa Lasergene SeqMan 7.0® (DNASTAR, Inc., EUA) (Figura 5 B). Do total de 296 amostras coletadas, restaram 284 amostras adequadas à análise, após serem desconsideradas aquelas que não geraram dados viáveis devido ao fato de apresentarem material insuficiente ou de má qualidade.

Figura 5 – A) Fotografia mostrando amplificação por PCR do fragmento de 1124 pb contendo a região codificadora do gene MC1R. B) Eletroferograma mostrando um trecho do seqüenciamento da região codificadora do MC1R de uma amostra

A classificação dos indivíduos quanto à ancestralidade foi baseada nos relatos de cada indivíduo sobre as origens de seus antepassados (avós e bisavós maternos e paternos). A classificação “Europeu” engloba indivíduos com os quatro ancestrais

possuindo origem européia (os países mais citados foram Itália, Portugal e Espanha) e, eventualmente, um ou dois de origem árabe. A classificação “Brasileiro” foi dada aos indivíduos com todos os avós brasileiros, sem qualquer menção a uma origem indígena e/ou estrangeira, ou indivíduos que fossem asiáticos miscigenados. Foram classificados como “Euro-brasileiros” os indivíduos que possuem avós com origens na Europa e avós cuja origem foi dita brasileira. Os “Afro-brasileiros” são os indivíduos com no mínimo um avô ou avó de origem africana. “Nativo-brasileiros” são os indivíduos com no mínimo um avô ou avó com ancestralidade indígena e sem qualquer relato de ancestrais de origem africana. A classificação “Asiática” foi dada aos indivíduos que relataram descendência chinesa ou japonesa para os quatro avós.

Considerando-se a classificação de ancestralidade acima descrita, 81 indivíduos foram considerados europeus, 71 considerados brasileiros, 67 euro-brasileiros, 32 como nativo-brasileiros, 21 classificados como afro-brasileiros e 12 como asiáticos. Segundo o critério de auto-classificação presente no questionário, 206 indivíduos se declararam como brancos, 38 como negros, 26 se auto-classificaram como mestiços, 13 como asiáticos, apenas 1 indivíduo como indígena.

Desse total de 284 indivíduos, 7 eram ruivos, 33 eram loiros, 148 tinham cabelos castanhos e 96 tinham cabelos pretos. Em relação à pele, 148 tinham pele clara, 95 pele média e 41 pele escura. Vinte e um indivíduos apresentavam olhos azuis, 74 olhos verdes, 13 tinham olhos mel, 69 tinham olhos castanho claros e 107 castanho escuros. Duzentos e quarenta indivíduos não apresentavam sardas, enquanto 44 as possuíam. Os gráficos (Figura 6) mostram a distribuição relativa dessas características ao longo das amostras.

Figura 6 – Gráficos representativos da distribuição relativa (em porcentagem) das características fenotípicas avaliadas no estudo. A) Distribuição das cores de cabelo; B) Distribuição das cores de pele; C) Distribuição das cores dos olhos; D) Distribuição da presença de sardas.

4.2 Frequências alélicas e heterozigose

Do total de 29 *loci* selecionados, observou-se que 7 deles não apresentaram qualquer variação nas amostras analisadas, possuindo apenas um alelo. Vinte e um dos 22 SNPs restantes se mostraram bialélicos, enquanto que um único SNP (+1690), previamente descrito como bialélico, apresentou em nossas análises um terceiro alelo desconhecido até então (alelo T) (APÊNDICE 4). Essa mutação encontrada gera a alteração do aminoácido Glicina para o aminoácido Cisteína na posição 310 da cadeia protéica (Tabela 1). Em contrapartida, um *locus* previamente descrito como trialélico (+1831) apresentou apenas dois alelos em nossas amostras.

Considerando o critério de definição para que um *locus* seja considerado polimórfico (frequência máxima de 99% para o alelo mais freqüente), observamos que

do total de 22 *loci* que apresentaram variabilidade, 13 deles não podem ser considerados polimórficos na população brasileira. Do total dos 9 *loci* polimórficos, 3 desses poderiam ser considerados como alelos de variação comum, já que possuem frequência maior que 5% no alelo menos frequente.

Todas as distribuições alélicas e genotípicas estão representadas no APÊNDICE 4. Desconsiderando-se os marcadores que não apresentaram variação, o menor valor de heterozigose observado (H_O) foi de zero no *locus* +1846, enquanto o maior valor foi de 0,2376 no *locus* +2322. Já a heterozigose esperada (H_S) variou de 0,0035 nos *loci* +1580, +1627, +1645 e +1664 até 0,2416 no SNP +2322 (APÊNDICE 4).

4.3 Equilíbrio de Hardy Weinberg

O teste exato que envolve enumeração completa foi realizado utilizando-se as frequências genotípicas dos 22 *loci* que apresentaram variação em nossas amostras (APÊNDICE 4). Quatro das 22 análises realizadas com a amostra total apresentaram desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, estando fora do equilíbrio os *loci* +1558, +1846, +1868 e +1966 (APÊNDICE 4). Observou-se que os desvios nesses quatro casos foram todos devido ao déficit de heterozigotos desses *loci* nas amostras analisadas (APÊNDICE 4).

4.4 Reconstrução haplótipos

Para a reconstrução dos haplótipos através dos algoritmos PHASE e EM, foram utilizados os dados dos 22 SNPs já mencionados nos 284 indivíduos genotipados. A utilização do algoritmo PHASE gerou 219 pares de haplótipos (77,11% do total) inferidos com probabilidade superior a 95%, sendo 204 deles (71,83% do total) com probabilidade de 100%, tendo-se obtido uma probabilidade média de 94,9%. O algoritmo EM gerou 256 pares (90,14% do total) com probabilidade superior a 95%, sendo 223 deles (78,52% do total) com probabilidade de 100%, tendo a probabilidade média de 97,2%.

Após as reconstruções, os resultados dos dois métodos foram comparados entre si para verificação das congruências. Observou-se então que 10 reconstruções diferiam entre os métodos (3,52%), sendo essas amostras descartadas das análises subseqüentes que envolvem haplótipos. A partir dessas alterações, o total de pares com possibilidade superior a 95% subiu para 79,9% (PHASE) e 91,6% (EM), sendo suas probabilidades médias aumentadas para 95,7% e 97,7% respectivamente. Estes valores asseguram a confiabilidade deste processo de inferência de haplótipos.

Foram então gerados 31 haplótipos (Tabela 2). Levando-se em consideração as mutações não-sinônimas presentes nos *loci* avaliados e as mudanças de aminoácidos geradas, o conjunto de haplótipos obtidos determina 20 proteínas distintas (Tabela 2). Cada haplótipo foi então designado por uma letra (indicando a proteína por ele formada) e um número (diferenciando os diferentes haplótipos que geram uma mesma proteína). É importante enfatizar que a única amostra que apresentava variação na posição +2013 estava entre as 10 amostras que foram descartadas durante

a comparação dos resultados gerados pelos métodos EM e PHASE. Por representar uma mutação sinônima, o haplótipo descartado não levaria ao surgimento de uma nova proteína.

As Tabelas 3, 4, 5 e 6 mostram que o haplótipo A1 é o mais freqüente (57,85%), enquanto outros quatorze são de ocorrência única (0,18%). Além de ser o mais freqüente, o haplótipo A1 é composto pelos alelos mais freqüentes de cada *locus*, sendo portanto considerado o haplótipo ancestral de humanos modernos. Em termos de proteínas distintas, a proteína A é a mais freqüente (68,07%), sendo codificada por oito haplótipos distintos, enquanto outras oito proteínas (de M a T) apresentam ocorrência única (0,18%). As quatro proteínas mais freqüentes representam mais de 90% da amostra total.

Tabela 2 – Sequência de DNA dos 31 haplótipos gerados (A1 a T1) a partir dos 29 *loci* analisados. Haplótipos designados por mesma letra diferem apenas por mutações sinônimas enquanto que os designados por letras distintas diferem por mutações não-sinônimas, resultando em proteínas distintas. Os *loci* marcados em preto foram aqueles que não apresentaram variação. As mutações não sinônimas estão destacadas em cinza.

	1 5 1 3 T C	1 5 8 8 G T	1 5 8 0 G A	1 6 2 7 T C	1 6 4 5 G A	1 6 5 4 G A	1 6 6 4 G T	1 6 9 0 G A	1 6 9 8 G A	1 7 3 9 T C	1 8 0 5 G A	1 8 3 1 C G T	1 8 4 4 T C	1 8 8 6 C T	1 8 5 8 G A	1 8 8 7 C G	1 8 8 9 C T	1 9 2 6 C T	1 9 6 3 G A	2 0 1 9 7 5	2 0 9 7 C T	2 1 9 5 C T	2 2 6 8 0 0	2 2 2 8 0 0	2 3 2 2 A G	2 3 4 6 G A			
A1	T	G	G	T	C	G	G	C	G	G	T	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	T	G	C	C	G	C	A	G
A2	T	G	G	T	C	G	G	C	G	G	T	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	T	G	C	C	G	C	G	G
A3	T	G	G	T	C	G	G	C	G	G	T	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	T	G	C	C	G	C	G	A
A4	T	G	G	T	C	G	G	C	G	G	T	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	T	G	C	C	G	T	A	G
A5	T	G	G	T	C	G	G	C	G	G	T	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	T	G	C	C	G	C	A	A
A6	T	G	G	T	C	G	G	C	G	G	T	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	T	G	T	C	G	C	A	G
A7	T	G	G	T	C	G	G	C	G	A	T	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	T	G	C	C	G	C	G	G
A8	T	G	G	T	C	G	G	C	G	G	T	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	T	G	T	C	G	C	G	G
B1	T	T	G	T	C	G	G	C	G	G	T	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	T	G	C	C	G	C	A	G
C1	T	G	G	T	C	G	G	C	G	G	T	G	C	T	G	C	A	C	C	G	C	T	G	C	C	G	C	A	G
C2	T	G	G	T	C	G	G	C	G	G	T	G	C	T	G	C	A	C	C	G	C	T	G	C	C	G	T	A	G
D1	T	G	G	T	C	G	A	C	G	G	T	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	T	G	C	C	G	C	G	G
D2	T	G	G	T	C	G	A	C	G	G	T	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	T	G	C	C	G	C	A	G
E1	T	G	G	T	C	G	G	C	G	G	T	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	T	G	C	C	C	C	A	G
F1	T	G	G	T	C	G	G	C	G	G	T	G	T	T	G	C	G	C	C	G	C	T	G	C	C	G	C	A	G
G1	T	G	G	T	C	G	G	C	G	G	T	G	C	T	G	T	G	C	C	G	C	T	G	C	C	G	C	A	G
H1	T	G	G	T	C	G	G	C	G	G	T	G	C	T	C	C	G	C	C	G	C	T	G	C	C	G	C	A	G
I1	T	G	G	T	C	G	G	C	G	G	T	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	C	G	C	C	G	C	G	G
I2	T	G	G	T	C	G	G	C	G	G	T	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	C	G	T	C	G	C	G	G
I3	T	G	G	T	C	G	G	C	G	G	T	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	C	G	C	C	G	C	A	G
J1	T	G	G	T	C	G	G	C	A	G	T	G	C	T	G	T	G	C	C	G	C	T	G	C	C	G	C	A	G
K1	T	G	G	T	C	G	G	C	G	G	T	A	C	T	G	C	G	C	C	G	C	T	G	C	C	G	C	A	G
L1	T	G	G	T	C	G	G	C	T	G	T	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	T	G	C	C	G	C	A	G
M1	T	G	A	T	C	G	G	C	G	G	T	G	C	T	G	C	A	C	C	G	C	T	G	C	C	G	C	A	G
N1	T	G	G	T	C	A	G	C	G	G	T	G	C	T	G	T	G	C	C	G	C	T	G	C	C	G	C	A	G
O1	T	G	G	T	C	G	G	C	G	G	T	G	C	C	G	C	G	C	C	G	C	T	G	C	C	G	C	G	G
P1	T	G	G	T	C	G	G	C	G	G	T	G	C	T	G	C	A	C	C	G	C	C	G	C	C	G	C	A	G
Q1	T	G	G	T	C	G	G	T	G	G	T	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	T	G	C	C	G	C	A	G
R1	T	T	G	C	C	G	G	C	G	G	T	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	T	G	C	C	G	C	A	G
S1	T	T	G	T	C	G	A	C	G	G	T	G	C	T	G	C	G	C	C	G	C	T	G	C	C	G	C	A	G
T1	T	T	G	T	C	G	G	C	G	G	T	G	C	T	G	C	G	G	C	G	C	T	G	C	C	G	C	A	G

Tabela 3 – Diversidade haplotípica e frequências dos 31 haplótipos e 20 proteínas na amostra total e nos grupos derivados da estratificação pela cor dos olhos.

	Azul	Verde	Mel	Castanho Claro	Castanho Escuro	Total
A1	0,6190	0,6370	0,7308	0,5469	0,5291	0,5785
A2	0,0714	0,0479	0,0769	0,1016	0,0728	0,0730
A3	-	-	-	-	0,0243	0,0091
A4	0,0238	-	-	-	0,0194	0,0091
A5	-	-	-	-	0,0097	0,0036
A6	-	-	-	0,0078	0,0049	0,0036
A7	-	-	-	-	0,0049	0,0018
A8	-	-	-	-	0,0049	0,0018
A	0,7143	0,6849	0,8077	0,6563	0,6699	0,6807
B1	-	0,1644	0,0769	0,1016	0,0728	0,0985
C1	0,1190	0,0342	0,0385	0,0938	0,1117	0,0839
C2	-	0,0068	-	0,0078	-	0,0036
C	0,1190	0,0411	0,0385	0,1016	0,1117	0,0876
D1	0,0476	0,0205	0,0385	0,0391	0,0534	0,0401
D2	0,0238	-	-	-	-	0,0018
D	0,0714	0,0205	0,0385	0,0391	0,0534	0,0420
E1	0,0238	0,0137	0,0385	0,0234	0,0146	0,0182
F1	-	0,0205	-	0,0234	0,0194	0,0182
G1	0,0476	0,0274	-	0,0078	0,0097	0,0164
H1	-	-	-	-	0,0194	0,0073
I1	-	-	-	-	0,0049	0,0018
I2	-	-	-	-	0,0049	0,0018
I3	-	-	-	0,0078	-	0,0018
I	-	-	-	0,0078	0,0097	0,0055
J1	-	-	-	0,0156	-	0,0036
K1	-	0,0068	-	-	0,0049	0,0036
L1	-	0,0068	-	-	0,0049	0,0036
M1	-	-	-	-	0,0049	0,0018
N1	0,0238	-	-	-	-	0,0018
O1	-	0,0068	-	-	-	0,0018
P1	-	-	-	0,0078	-	0,0018
Q1	-	0,0068	-	-	-	0,0018
R1	-	-	-	0,0078	-	0,0018
S1	-	-	-	0,0078	-	0,0018
T1	-	-	-	-	0,0049	0,0018
Diversidade Haplotípica	0,6051 ± 0,0835	0,5656 ± 0,0442	0,4677 ± 0,1176	0,6735 ± 0,0422	0,6951 ± 0,0329	0,6416 ± 0,0220
2n	42	146	26	128	206	548

Tabela 4 – Diversidade haplotípica e frequências dos 31 haplótipos e 20 proteínas na amostra total e nos grupos derivados da estratificação pela cor dos cabelos.

	Ruivo	Loiro	Castanho	Preto	Total
A1	0,5909	0,4000	0,6189	0,5215	0,5785
A2	0,0606	-	0,0524	0,1129	0,0730
A3	-	-	0,0035	0,0215	0,0091
A4	-	-	0,0035	0,0215	0,0091
A5	-	-	-	0,0108	0,0036
A6	-	-	-	0,0108	0,0036
A7	-	-	0,0035	-	0,0018
A8	-	-	-	0,0054	0,0018
A	0,6515	0,4000	0,6818	0,7043	0,6807
B1	0,1061	-	0,1364	0,0430	0,0985
C1	0,0606	-	0,0664	0,1237	0,0839
C2	-	-	0,0035	0,0054	0,0036
C	0,0606	-	0,0699	0,1290	0,0876
D1	0,0606	-	0,0280	0,0538	0,0401
D2	0,0152	-	-	-	0,0018
D	0,0758	-	0,0280	0,0538	0,0420
E1	-	0,1000	0,0280	0,0054	0,0182
F1	0,0152	0,3000	0,0070	0,0215	0,0182
G1	0,0606	0,1000	0,0105	0,0054	0,0164
H1	-	-	0,0070	0,0108	0,0073
I1	-	-	-	0,0054	0,0018
I2	-	-	-	0,0054	0,0018
I3	-	-	0,0035	-	0,0018
I	-	-	0,0035	0,0108	0,0055
J1	-	-	0,0070	-	0,0036
K1	0,0152	-	-	0,0054	0,0036
L1	-	-	0,0035	0,0054	0,0036
M1	-	-	-	0,0054	0,0018
N1	-	0,1000	-	-	0,0018
O1	0,0152	-	-	-	0,0018
P1	-	-	0,0035	-	0,0018
Q1	-	-	0,0035	-	0,0018
R1	-	-	0,0035	-	0,0018
S1	-	-	0,0035	-	0,0018
T1	-	-	0,0035	-	0,0018
Diversidade Haplotípica	0,8000 ± 0,1001	0,6336 ± 0,0641	0,5913 ± 0,0316	0,6970 ± 0,0333	0,6416 ± 0,0220
2n	10	66	286	186	548

Tabela 5 – Diversidade haplotípica e frequências dos 31 haplótipos e 20 proteínas na amostra total e nos grupos derivados da estratificação pela cor da pele.

	Clara	Média	Escura	Total
A1	0,5734	0,5924	0,5641	0,5785
A2	0,0490	0,0761	0,1538	0,0730
A3	-	0,0054	0,0513	0,0091
A4	0,0035	0,0054	0,0385	0,0091
A5	-	-	0,0256	0,0036
A6	-	0,0109	-	0,0036
A7	0,0035	-	-	0,0018
A8	-	-	0,0128	0,0018
A	0,6294	0,6902	0,8462	0,6807
B1	0,1154	0,1087	0,0128	0,0985
C1	0,0909	0,0870	0,0513	0,0839
C2	0,0035	0,0054	-	0,0036
C	0,0944	0,0924	0,0513	0,0876
D1	0,0524	0,0380	-	0,0401
D2	0,0035	-	-	0,0018
D	0,0559	0,0380	-	0,0420
E1	0,0210	0,0163	0,0128	0,0182
F1	0,0210	0,0054	0,0385	0,0182
G1	0,0245	0,0109	-	0,0164
H1	-	0,0217	-	0,0073
I1	-	-	0,0128	0,0018
I2	-	-	0,0128	0,0018
I3	0,0035	-	-	0,0018
I	0,0035	-	0,0256	0,0055
J1	0,0035	0,0054	-	0,0036
K1	0,0070	-	-	0,0036
L1	-	0,0054	0,0128	0,0036
M1	0,0035	-	-	0,0018
N1	0,0035	-	-	0,0018
O1	0,0035	-	-	0,0018
P1	0,0035	-	-	0,0018
Q1	0,0035	-	-	0,0018
R1	0,0035	-	-	0,0018
S1	0,0035	-	-	0,0018
T1	-	0,0054	-	0,0018
Diversidade Haplotípica	0,6450 ± 0,0298	0,6247 ± 0,0382	0,6567 ± 0,0557	0,6416 ± 0,0220
2n	286	184	78	548

Tabela 6 – Diversidade haplotípica e frequências dos 31 haplótipos e 20 proteínas na amostra total e nos grupos derivados da estratificação de acordo com a presença ou ausência de sardas.

	Presença	Ausência	Total
A1	0,3929	0,6121	0,5785
A2	0,0238	0,0819	0,0730
A3	-	0,0108	0,0091
A4	0,0119	0,0086	0,0091
A5	-	0,0043	0,0036
A6	-	0,0043	0,0036
A7	0,0119	-	0,0018
A8	-	0,0022	0,0018
A	0,4405	0,7241	0,6807
B1	0,1667	0,0862	0,0985
C1	0,1310	0,0754	0,0839
C2	-	0,0043	0,0036
C	0,1310	0,0797	0,0876
D1	0,0833	0,0323	0,0401
D2	-	0,0022	0,0018
D	0,0833	0,0345	0,0420
E1	0,0119	0,0194	0,0182
F1	0,0476	0,0129	0,0182
G1	0,0595	0,0086	0,0164
H1	-	0,0086	0,0073
I1	-	0,0022	0,0018
I2	-	0,0022	0,0018
I3	0,0119	-	0,0018
I	0,0119	0,0043	0,0055
J1	-	0,0043	0,0036
K1	0,0119	0,0022	0,0036
L1	-	0,0043	0,0036
M1	0,0119	-	0,0018
N1	-	0,0022	0,0018
O1	-	0,0022	0,0018
P1	0,0119	-	0,0018
Q1	-	0,0022	0,0018
R1	0,0119	-	0,0018
S1	-	0,0022	0,0018
T1	-	0,0022	0,0018
Diversidade Haplotípica	0,7958 ± 0,0334	0,6048 ± 0,0252	0,6416 ± 0,0220
2n	84	464	548

4.5 Desequilíbrio de ligação

O desequilíbrio de ligação entre os *loci* estudados foi testado através dos programas Arlequin 3.5 e Haploview 4.2. Após a reconstrução dos haplótipos, já com a fase gamética conhecida, estes programas avaliam a presença de associações significativas entre alelos de dois pares de *loci* distintos. Dentre os 22 SNPs que apresentaram variação, o SNP +2013 foi desconsiderado de todas estas análises de desequilíbrio de ligação pelo fato de a única amostra que apresentava variação nesta posição ter sido descartada durante a comparação dos resultados gerados pelos métodos EM e PHASE. Adicionalmente, o SNP trialélico +1690 foi retirado das análises realizadas pelo programa Haploview, uma vez que o mesmo aceita apenas a inclusão de marcadores bialélicos.

Do total de 210 pares de SNPs gerados, 36 deles apresentaram desvios significativos de acordo com o teste exato de desequilíbrio de ligação ao nível de 5% (marcados em negrito na Tabela 7). O gráfico gerado pelo Haploview 4.2 (Figura 7) sumariza o desequilíbrio de ligação entre os 190 pares de SNPs avaliados, destacando suas posições e distâncias relativas ao longo do gene e seus valores de D' e LOD (*log of the likelihood odds ratio*). As cores dos quadrados representam a intensidade de desequilíbrio entre os pares. A cor branca representa pares com valor baixo de D' , indicando ausência de desequilíbrio; a cor vermelha representa pares com valor alto de D' e de LOD, indicando desequilíbrio elevado e significativo, enquanto a cor azul representa valores altos de D' , mas baixo LOD, representativo de um desequilíbrio elevado, mas não-significativo.

Todos os pares de SNPs marcados em vermelho no gráfico do Haploview (figura 7) foram significativos pelos testes realizados pelo Arlequin, segundo o critério de 5% para o valor de p (Tabela 7), sendo que esses pares envolviam principalmente os *loci* +1558 e +2322.

Tabela 7 – Pares de SNPs analisados (SNP1 e SNP2) e seus respectivos valores de D' com intervalo de confiança (IC), r^2 , LOD e p com desvio padrão (DP).

SNP1	SNP2	D' (IC)	r^2	LOD	p ($\pm$ DP)
1558GT	1580GA	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,05	1,000 $\pm$ 0,0000
1558GT	1627TC	1,0 (0,15 - 0,99)	0,0160	0,99	0,102 $\pm$ 0,0030
1558GT	1645GA	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,05	1,000 $\pm$ 0,0000
1558GT	1654GA	0,6 (0,06 - 0,89)	0,0020	0,28	0,494 $\pm$ 0,0051
1558GT	1664CT	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,05	1,000 $\pm$ 0,0000
1558GT	1690GA	-	-	-	0,329 $\pm$ 0,0041
1558GT	1698GA	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,05	1,000 $\pm$ 0,0000
1558GT	1805GA	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,10	1,000 $\pm$ 0,0000
1558GT	1831CGT	1,0 (0,07 - 0,98)	0,0020	0,48	0,608 $\pm$ 0,0049
1558GT	1844TC	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,05	1,000 $\pm$ 0,0000
1558GT	1846GC	1,0 (0,05 - 0,97)	0,0010	0,19	0,354 $\pm$ 0,0052
1558GT	1858CT	1,0 (0,09 - 0,99)	0,0030	0,58	0,365 $\pm$ 0,0047
1558GT	1868GA	1,0 (0,48 - 1)	0,0120	2,51	0,00465 $\pm$ 0,0007
1558GT	1877CG	1,0 (0,15 - 0,99)	0,0160	0,99	0,11 $\pm$ 0,0028
1558GT	1966TC	1,0 (0,05 - 0,97)	0,0010	0,19	0,354 $\pm$ 0,0041
1558GT	2097CT	1,0 (0,05 - 0,97)	0,0010	0,19	0,35 $\pm$ 0,0050
1558GT	2260GC	1,0 (0,07 - 0,98)	0,0020	0,48	0,608 $\pm$ 0,0046
1558GT	2280CT	1,0 (0,06 - 0,98)	0,0020	0,34	0,55 $\pm$ 0,0049
1558GT	2322AG	1,0 (0,62 - 1)	0,0180	3,70	0,000396 $\pm$ 0,0002
1558GT	2346GA	1,0 (0,06 - 0,98)	0,0020	0,34	0,545 $\pm$ 0,0057
1580GA	1627TC	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1580GA	1645GA	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1580GA	1654GA	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,02	1,000 $\pm$ 0,0000
1580GA	1664CT	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1580GA	1690GA	-	-	-	1,000 $\pm$ 0,0000
1580GA	1698GA	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1580GA	1805GA	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1580GA	1831CGT	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,01	1,000 $\pm$ 0,0000
1580GA	1844TC	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1580GA	1846GC	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1580GA	1858CT	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,01	1,000 $\pm$ 0,0000
1580GA	1868GA	1,0 (0,15 - 0,99)	0,0180	1,04	0,000 $\pm$ 0,0000
1580GA	1877CG	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1580GA	1966TC	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1580GA	2097CT	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1580GA	2260GC	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,01	1,000 $\pm$ 0,0000
1580GA	2280CT	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,01	0,0123 $\pm$ 0,0010
1580GA	2322AG	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,06	1,000 $\pm$ 0,0000
1580GA	2346GA	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,01	0,0136 $\pm$ 0,0011
1627TC	1645GA	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1627TC	1654GA	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,02	1,000 $\pm$ 0,0000
1627TC	1664CT	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1627TC	1690GA	-	-	-	1,000 $\pm$ 0,0000
1627TC	1698GA	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1627TC	1805GA	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000

Continuação Tabela 4

SNP1	SNP2	D' (IC)	r^2	LOD	p ($\pm$ DP)
1627TC	1831CGT	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,01	1,000 $\pm$ 0,0000
1627TC	1844TC	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1627TC	1846GC	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1627TC	1858CT	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,01	1,000 $\pm$ 0,0000
1627TC	1868GA	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,04	0,0923 $\pm$ 0,0028
1627TC	1877CG	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1627TC	1966TC	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1627TC	2097CT	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1627TC	2260GC	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,01	1,000 $\pm$ 0,0000
1627TC	2280CT	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,01	0,0144 $\pm$ 0,0012
1627TC	2322AG	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,06	1,000 $\pm$ 0,0000
1627TC	2346GA	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,01	0,0132 $\pm$ 0,0012
1645GA	1654GA	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,02	1,000 $\pm$ 0,0000
1645GA	1664CT	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1645GA	1690GA	-	-	-	1,000 $\pm$ 0,0000
1645GA	1698GA	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1645GA	1805GA	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1645GA	1831CGT	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,01	1,000 $\pm$ 0,0000
1645GA	1844TC	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1645GA	1846GC	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1645GA	1858CT	1,0 (0,2 - 0,99)	0,0820	1,68	0,0189 $\pm$ 0,0013
1645GA	1868GA	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,04	0,0952 $\pm$ 0,0033
1645GA	1877CG	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1645GA	1966TC	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1645GA	2097CT	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1645GA	2260GC	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,01	1,000 $\pm$ 0,0000
1645GA	2280CT	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,01	0,0125 $\pm$ 0,0011
1645GA	2322AG	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,06	1,000 $\pm$ 0,0000
1645GA	2346GA	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,01	0,0136 $\pm$ 0,0010
1654GA	1664CT	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,02	1,000 $\pm$ 0,0000
1654GA	1690GA	-	-	-	1,000 $\pm$ 0,0000
1654GA	1698GA	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,02	1,000 $\pm$ 0,0000
1654GA	1805GA	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,04	0,0769 $\pm$ 0,0027
1654GA	1831CGT	1,0 (0,05 - 0,97)	0,0010	0,20	0,368 $\pm$ 0,0046
1654GA	1844TC	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,02	1,000 $\pm$ 0,0000
1654GA	1846GC	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,08	1,000 $\pm$ 0,0000
1654GA	1858CT	1,0 (0,05 - 0,98)	0,0010	0,24	1,000 $\pm$ 0,0000
1654GA	1868GA	1,0 (0,16 - 0,99)	0,0050	1,02	0,0605 $\pm$ 0,0019
1654GA	1877CG	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,02	1,000 $\pm$ 0,0000
1654GA	1966TC	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,08	1,000 $\pm$ 0,0000
1654GA	2097CT	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,08	1,000 $\pm$ 0,0000
1654GA	2260GC	1,0 (0,05 - 0,97)	0,0010	0,20	0,359 $\pm$ 0,0052
1654GA	2280CT	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0010	0,14	0,281 $\pm$ 0,0043
1654GA	2322AG	0,904 (0,73 - 0,97)	0,2470	17,93	0 $\pm$ 0,0000
1654GA	2346GA	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0010	0,14	0,262 $\pm$ 0,0046
1664CT	1690GA	-	-	-	1,000 $\pm$ 0,0000
1664CT	1698GA	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000

Continuação Tabela 4

SNP1	SNP2	D' (IC)	r^2	LOD	p ($\pm DP$)
1664CT	1805GA	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1664CT	1831CGT	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,01	1,000 $\pm$ 0,0000
1664CT	1844TC	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1664CT	1846GC	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1664CT	1858CT	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,01	1,000 $\pm$ 0,0000
1664CT	1868GA	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,04	0,092 $\pm$ 0,0027
1664CT	1877CG	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1664CT	1966TC	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1664CT	2097CT	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1664CT	2260GC	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,01	1,000 $\pm$ 0,0000
1664CT	2280CT	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,01	0,0109 $\pm$ 0,0010
1664CT	2322AG	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,06	1,000 $\pm$ 0,0000
1664CT	2346GA	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,01	0,013 $\pm$ 0,0012
1690GA	1698GA	-	-	-	1,000 $\pm$ 0,0000
1690GA	1805GA	-	-	-	0,0218 $\pm$ 0,0012
1690GA	1831CGT	-	-	-	1,000 $\pm$ 0,0000
1690GA	1844TC	-	-	-	1,000 $\pm$ 0,0000
1690GA	1846GC	-	-	-	1,000 $\pm$ 0,0000
1690GA	1858CT	-	-	-	0,00149 $\pm$ 0,0004
1690GA	1868GA	-	-	-	0,309 $\pm$ 0,0039
1690GA	1877CG	-	-	-	1,000 $\pm$ 0,0000
1690GA	1966TC	-	-	-	1,000 $\pm$ 0,0000
1690GA	2097CT	-	-	-	1,000 $\pm$ 0,0000
1690GA	2260GC	-	-	-	1,000 $\pm$ 0,0000
1690GA	2280CT	-	-	-	0,0641 $\pm$ 0,0018
1690GA	2322AG	-	-	-	0,427 $\pm$ 0,0047
1690GA	2346GA	-	-	-	0,0589 $\pm$ 0,0023
1698GA	1805GA	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1698GA	1831CGT	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,01	1,000 $\pm$ 0,0000
1698GA	1844TC	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1698GA	1846GC	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1698GA	1858CT	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,01	1,000 $\pm$ 0,0000
1698GA	1868GA	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,04	0,0872 $\pm$ 0,0027
1698GA	1877CG	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1698GA	1966TC	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1698GA	2097CT	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1698GA	2260GC	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,01	1,000 $\pm$ 0,0000
1698GA	2280CT	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,01	0,0121 $\pm$ 0,0009
1698GA	2322AG	1,0 (0,13 - 0,99)	0,0120	0,88	0,135 $\pm$ 0,0033
1698GA	2346GA	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,01	0,0105 $\pm$ 0,0009
1805GA	1831CGT	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,02	0,0372 $\pm$ 0,0016
1805GA	1844TC	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1805GA	1846GC	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,01	0,0132 $\pm$ 0,0010
1805GA	1858CT	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,02	1,000 $\pm$ 0,0000
1805GA	1868GA	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,08	0,175 $\pm$ 0,0037
1805GA	1877CG	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1805GA	1966TC	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,01	0,0124 $\pm$ 0,0011

Continuação Tabela 4

SNP1	SNP2	D' (IC)	r^2	LOD	p ($\pm$ DP)
1805GA	2097CT	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,01	0,0135 $\pm$ 0,0010
1805GA	2260GC	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,02	0,033 $\pm$ 0,0015
1805GA	2280CT	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,01	1,000 $\pm$ 0,0000
1805GA	2322AG	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0010	0,12	0,243 $\pm$ 0,0042
1805GA	2346GA	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,01	1,000 $\pm$ 0,0000
1831CGT	1844TC	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,01	1,000 $\pm$ 0,0000
1831CGT	1846GC	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,03	1,000 $\pm$ 0,0000
1831CGT	1858CT	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,10	1,000 $\pm$ 0,0000
1831CGT	1868GA	1,0 (0,07 - 0,98)	0,0020	0,42	0,222 $\pm$ 0,0046
1831CGT	1877CG	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,01	1,000 $\pm$ 0,0000
1831CGT	1966TC	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,03	1,000 $\pm$ 0,0000
1831CGT	2097CT	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,03	1,000 $\pm$ 0,0000
1831CGT	2260GC	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,08	0,17 $\pm$ 0,0039
1831CGT	2280CT	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,06	1,000 $\pm$ 0,0000
1831CGT	2322AG	1,0 (0,09 - 0,99)	0,0030	0,62	0,133 $\pm$ 0,0041
1831CGT	2346GA	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,06	1,000 $\pm$ 0,0000
1844TC	1846GC	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1844TC	1858CT	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,01	1,000 $\pm$ 0,0000
1844TC	1868GA	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,04	0,0888 $\pm$ 0,0028
1844TC	1877CG	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1844TC	1966TC	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1844TC	2097CT	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1844TC	2260GC	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,01	1,000 $\pm$ 0,0000
1844TC	2280CT	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,01	0,0134 $\pm$ 0,0012
1844TC	2322AG	1,0 (0,13 - 0,99)	0,0120	0,88	0,14 $\pm$ 0,0033
1844TC	2346GA	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,01	0,0113 $\pm$ 0,0010
1846GC	1858CT	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,04	1,000 $\pm$ 0,0000
1846GC	1868GA	1,0 (0,05 - 0,97)	0,0010	0,17	0,323 $\pm$ 0,0049
1846GC	1877CG	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1846GC	1966TC	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,01	1,000 $\pm$ 0,0000
1846GC	2097CT	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,01	1,000 $\pm$ 0,0000
1846GC	2260GC	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,03	1,000 $\pm$ 0,0000
1846GC	2280CT	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,02	0,0477 $\pm$ 0,0023
1846GC	2322AG	1,0 (0,05 - 0,98)	0,0010	0,25	0,427 $\pm$ 0,0050
1846GC	2346GA	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,02	0,0522 $\pm$ 0,0022
1858CT	1868GA	1,0 (0,08 - 0,98)	0,0020	0,50	0,321 $\pm$ 0,0051
1858CT	1877CG	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,01	1,000 $\pm$ 0,0000
1858CT	1966TC	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,04	1,000 $\pm$ 0,0000
1858CT	2097CT	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,04	1,000 $\pm$ 0,0000
1858CT	2260GC	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,10	1,000 $\pm$ 0,0000
1858CT	2280CT	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,07	1,000 $\pm$ 0,0000
1858CT	2322AG	1,0 (0,11 - 0,99)	0,0030	0,74	0,38 $\pm$ 0,0044
1858CT	2346GA	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,07	1,000 $\pm$ 0,0000
1868GA	1877CG	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,04	0,0905 $\pm$ 0,0027
1868GA	1966TC	0,175 (0,02 -0,64)	0,0020	0,19	0,0425 $\pm$ 0,0019
1868GA	2097CT	1,0 (0,05 - 0,97)	0,0010	0,17	0,315 $\pm$ 0,0050
1868GA	2260GC	1,0 (0,07 - 0,98)	0,0020	0,42	0,235 $\pm$ 0,0037

Continuação Tabela 4

SNP1	SNP2	D' (IC)	r^2	LOD	p ($\pm DP$)
1868GA	2280CT	0,214(0,03 - 0,57)	0,0060	0,48	0,0172 $\pm$ 0,0011
1868GA	2322AG	1,0 (0,58 - 1)	0,0150	3,22	0,00277 $\pm$ 0,0005
1868GA	2346GA	1,0 (0,06 - 0,98)	0,0010	0,29	0,484 $\pm$ 0,0048
1877CG	1966TC	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1877CG	2097CT	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,00	1,000 $\pm$ 0,0000
1877CG	2260GC	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,01	1,000 $\pm$ 0,0000
1877CG	2280CT	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,01	0,0105 $\pm$ 0,0011
1877CG	2322AG	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,06	1,000 $\pm$ 0,0000
1877CG	2346GA	1,0 (0,04 - 0,96)	0,0000	0,01	0,0132 $\pm$ 0,0011
1966TC	2097CT	0,244(0,06 - 0,59)	0,0600	1,23	0,0286 $\pm$ 0,0018
1966TC	2260GC	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,03	1,000 $\pm$ 0,0000
1966TC	2280CT	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,02	0,0517 $\pm$ 0,0022
1966TC	2322AG	0,424(0,08 - 0,79)	0,0090	0,69	0,00901 $\pm$ 0,0009
1966TC	2346GA	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,02	0,0452 $\pm$ 0,0019
2097CT	2260GC	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,03	1,000 $\pm$ 0,0000
2097CT	2280CT	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,02	0,051 $\pm$ 0,0020
2097CT	2322AG	0,424(0,08 - 0,79)	0,0090	0,69	0,00703 $\pm$ 0,0008
2097CT	2346GA	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,02	0,0492 $\pm$ 0,0020
2260GC	2280CT	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,06	1,000 $\pm$ 0,0000
2260GC	2322AG	1,0 (0,09 - 0,99)	0,0030	0,62	0,116 $\pm$ 0,0033
2260GC	2346GA	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,06	1,000 $\pm$ 0,0000
2280CT	2322AG	1,0 (0,07 - 0,98)	0,0020	0,43	0,232 $\pm$ 0,0042
2280CT	2346GA	1,0 (0,04 - 0,97)	0,0000	0,04	0,0898 $\pm$ 0,0033
2322AG	2346GA	0,67 (0,3 - 0,88)	0,0390	2,77	0 $\pm$ 0,0000

Figura 7 – Gráfico gerado pelo Haploview 4.2 mostrando o desequilíbrio de ligação entre 20 pares de loci selecionados do MC1R em nossas amostras. A cor vermelha dos quadrados indica valores de D' próximos a 1 (valores menores que 1 estão indicados), branco indica valores de D' próximos de 0 e azul indica valores de D' próximos a 1 e LOD menor que 2.

4.6 Network

Foi construída uma *network* utilizando-se o programa Network 4.6, relacionando os 31 haplótipos gerados por nossas reconstruções (figura 8). Nela, os haplótipos são representados pelos círculos enquanto as linhas que os unem, representam as 22 mutações avaliadas que os diferenciam. O diâmetro de cada círculo é proporcional à frequência do haplótipo em questão.

Observa-se, pela disposição dos haplótipos, que 15 haplótipos derivam por um único passo mutacional do haplótipo ancestral A1. Dentre estes 15 haplótipos estão outros quatro haplótipos relativamente frequentes (A2, B1, C1 e G1), a partir dos quais derivam de dois a seis haplótipos secundários. Apenas um haplótipo da rede (I2) não se conecta por um único passo mutacional a pelo menos um destes cinco haplótipos centrais.

Figura 8 – Rede de Haplótipos gerada pelo *Network 4.6* através do algoritmo *Median-Joining* contendo os haplótipos do MC1R encontrados em nossas amostras. Cada circunferência representa um haplótipo, com sua nomenclatura à esquerda. O tamanho de cada circunferência é proporcional à frequência do haplótipo na amostra. Os números em vermelho representam os SNPs que diferenciam cada haplótipo.

4.7 Associações encontradas

Foram avaliadas as associações entre fenótipos e genótipos, representadas pelos respectivos valores obtidos de significância (p) pelo teste exato de Fisher e seus valores de *Odds Ratio* (OR). As Tabelas 8 e 9 possuem as categorias fenotípicas utilizadas nas análises, separadas por *locus* a fim de se avaliar a presença da associação. Estão mostradas as associações com valores de probabilidade inferiores a 10%, a fim de apresentar não apenas as associações significativas ao nível de 5%, mas também algumas tendências de associação que possam ser melhor avaliadas em estudos subseqüentes em outras amostras populacionais.

A Tabela 8 mostra as associações encontradas a nível alélico e genotípico, enquanto a Tabela 9 mostra as associações a nível haplotípico e de proteínas.

Tabela 8 - Associações dos Alelos e Genótipos de cada *locus* com as características fenotípicas avaliadas. OR: Odds Ratio (valores de *p* não significativos estão sublinhados)

SNP	Alelo/Genótipo	Característica	Valor p	OR
+ 1 5 5 8	T	Cabelo Castanho	0,0004	2,8784
	G	Cabelo Preto	0,0006	3,4892
	GG	Cabelo Castanho	0,0003	0,3004
	GT	Cabelo Castanho	0,0005	3,4497
	GG	Cabelo Preto	0,0019	3,3077
	GT	Cabelo Preto	0,0155	0,3661
	G	Olhos Azuis	0,0152	10,4990
	T	Olhos Verdes	0,0061	2,2951
	GG	Olhos Azuis	0,0181	10,5200
	GT	Olhos Azuis	0,0315	0,1107
	GG	Olhos Verdes	0,0080	0,4150
	GT	Olhos Verdes	0,0252	2,2061
	G	Pele Escura	0,0013	10,6479
	GG	Pele Escura	0,0034	10,4712
	GT	Pele Escura	0,0094	0,1119
+ 1 6 4 5	T	Presença de Sardas	0,0319	2,1233
	TT	Presença de Sardas	0,0506	5,7317
+ 1 6 4 5	A	Cabelo Ruivo	0,0247	122,7800
	AG	Cabelo Ruivo	0,0247	127,6200
	GG	Cabelo Ruivo	0,0247	0,0078
+ 1 6 5 4	A	Pele Clara	<u>0,0929</u>	2,3058
	G	Pele Escura	0,0357	8,8170
	AG	Pele Escura	<u>0,0907</u>	0,1302
	GG	Pele Escura	<u>0,0533</u>	8,5080
	A	Presença de Sardas	<u>0,0796</u>	2,3333
+ 1 8 3 1	T	Cabelo Ruivo	0,0002	23,8667
	C	Cabelo Castanho	0,0470	3,7339
	CC	Cabelo Ruivo	0,0019	0,0455
	CT	Cabelo Ruivo	0,0265	11,7333
	TT	Cabelo Ruivo	0,0250	126,2300
	T	Presença de Sardas	0,0390	3,4940
+ 1 8 4 6	G	Pele Clara	<u>0,0534</u>	9,8110
	C	Pele Média	0,0124	18,1710
	C	Olhos Castanho Escuros	0,0217	14,5910

Continuação Tabela 8

SNP	Alelo/Genótipo	Característica	Valor p	OR
+1858	T	Cabelo Ruivo	0,0385	8,1364
	C	Cabelo Preto	<u>0,0702</u>	6,3000
	CC	Cabelo Ruivo	0,0312	0,0947
	CT	Cabelo Ruivo	0,0263	11,7778
	CC	Olhos Azuis	0,0450	0,2024
	CT	Olhos Azuis	0,0353	5,5809
	T	Presença de Sardas	0,0085	4,8815
+1868	CC	Ausência de Sardas	0,0255	4,2125
	A	Cabelo Preto	0,0090	2,1916
	AA	Cabelo Preto	0,0344	4,8258
	AG	Olhos Castanho Claros	0,0040	3,1250
+2097	AA	Olhos Castanho Escuros	0,0154	6,8000
	C	Pele Clara	0,0256	12,0360
	CC	Pele Clara	0,0251	12,2640
	CT	Pele Clara	0,0251	0,0815
	T	Cabelo Preto	0,0457	8,0652
	CC	Cabelo Preto	0,0450	0,1216
+2260	CT	Cabelo Preto	0,0450	8,2222
	C	Cabelo Ruivo	0,0031	14,5636
	G	Cabelo Preto	<u>0,0701</u>	6,2682
	CG	Cabelo Ruivo	0,0025	19,6500
+2322	GG	Cabelo Ruivo	0,0025	0,0509
	A	Cabelo Castanho	0,0023	2,1758
	G	Cabelo Preto	0,0002	2,5351
	AA	Cabelo Castanho	0,0042	2,2527
	AG	Cabelo Castanho	0,0174	0,5020
	AA	Cabelo Preto	0,0009	0,3827
	AG	Cabelo Preto	0,0080	2,1571
	GG	Cabelo Preto	0,0186	10,1648
	A	Olhos Verdes	0,0184	2,1757
	G	Olhos Castanho Escuros	0,0330	1,7271
	AA	Olhos Verdes	0,0131	2,4321
	AG	Olhos Verdes	0,0169	0,4139
	AA	Olhos Castanho Escuros	0,0498	0,5706
	A	Pele Clara	<u>0,0522</u>	1,6242
	G	Pele Escura	0,0008	2,7339
	AA	Pele Clara	0,0303	1,8228
	AG	Pele Clara	0,0352	0,5344
	AA	Pele Escura	0,0032	0,3344
	AG	Pele Escura	0,0173	2,3843
	GG	Pele Escura	0,0418	6,2632

Continuação Tabela 8

SNP	Alelo/Genótipo	Característica	Valor p	OR
+ 2 3 4 6	G	Cabelo Castanho	0,0045	11,1508
	A	Cabelo Preto	0,0017	8,8994
	AG	Cabelo Castanho	0,0042	0,0864
	GG	Cabelo Castanho	0,0042	11,5702
	AG	Cabelo Preto	0,0015	9,3176
	GG	Cabelo Preto	0,0015	0,1073
	G	Olhos Verdes	0,0426	8,5330
	A	Olhos Castanho Escuros	0,0041	7,4328
	AG	Olhos Verdes	0,0407	0,1136
	GG	Olhos Verdes	0,0407	8,7990
	AG	Olhos Cast Escuro	0,0038	7,7344
	GG	Olhos Cast Escuro	0,0038	0,1293
	G	Pele Clara	0,0313	4,9802
	A	Pele Escura	2,19817E-05	16,5405
	AG	Pele Clara	0,0297	0,1950
	GG	Pele Clara	0,0297	5,1270
	AG	Pele Escura	1,65215E-05	18,4242
	GG	Pele Escura	1,65215E-05	0,0543

Tabela 9 – Associações dos Haplótipos (Hapl) e Proteínas (Prot) com as características fenotípicas avaliadas. OR: Odds Ratio (valores de p não significativos estão sublinhados)

Haplótipo/Proteína	Característica	Valor p	OR
Hapl A1	Cabelo Castanho	0,0470	1,4151
Hapl A1	Ausência de Sardas	0,0003	2,4384
Hapl A2	Pele Clara	0,0316	0,4672
Hapl A2	Pele Escura	0,0075	2,8701
Hapl A2	Cabelo Preto	0,0144	2,2976
Hapl A3	Pele Clara	0,0245	0,0817
Hapl A3	Pele Escura	0,0017	25,3514
Hapl A3	Olhos Castanho Escuros	0,0073	18,6970
Hapl A3	Cabelo Preto	0,0476	7,9341
Hapl A4	Pele Escura	0,0224	9,3600
Hapl A4	Cabelo Preto	0,0476	7,9341
Hapl A5	Pele Escura	0,0200	30,7520
Prot A	Pele Clara	0,0078	0,6071
Prot A	Pele Escura	0,0006	2,9202
Prot A	Ausência de Sardas	8,32229E-07	3,3345
Hapl B1	Pele Escura	0,0033	0,1022
Hapl B1	Olhos Azuis	0,0259	0,0977
Hapl B1	Olhos Verdes	0,0032	2,4393
Hapl B1	Cabelo Castanho	0,0023	2,6000
Hapl B1	Cabelo Preto	0,0013	0,3087
Hapl B1	Presença de Sardas	0,0289	2,1200
Prot B	Pele Escura	0,0033	0,1022
Prot B	Olhos Azuis	0,0259	0,0977
Prot B	Olhos Verdes	0,0032	2,4393
Prot B	Cabelo Castanho	0,0023	2,6000
Prot B	Cabelo Preto	0,0013	0,3087
Prot B	Presença de Sardas	0,0289	2,1200
Hapl C1	Olhos Verdes	0,0090	0,3122
Hapl C1	Cabelo Preto	0,0220	2,0798
Prot C	Olhos Verdes	0,0250	0,3673
Prot C	Cabelo Preto	0,0167	2,0864
Hapl F1 / Prot F	Cabelo Ruivo	0,0005	32,5102

Continuação Tabela 9

Haplótipo/Proteína	Característica	Valor p	OR
Hapl G1 / Prot G	Cabelo Loiros	0,0152	6,1548
Hapl G1 / Prot G	Presença de Sardas	0,0057	7,2785
Hapl H1	Pele Média	0,0124	18,1750
Hapl H1	Olhos Castanho Escuros	0,0196	15,2220
Prot H	Pele Clara	<u>0,0516</u>	0,1003
Prot H	Pele Média	0,0124	18,1750
Prot H	Olhos Castanho Escuros	0,0196	15,2220
Hapl N1/Prot N	Cabelo Ruivo	0,0182	170,0500

5 – DISCUSSÃO

5.1 Dificuldades laboratoriais

As principais dificuldades encontradas para a realização deste projeto estavam relacionadas à coleta e classificação das amostras. Houve grande dificuldade nas coletas de amostras em certo período da pesquisa, devido ao movimento no Hemocentro do HCFMRP-USP, principal local de obtenção de voluntários, ter se reduzido enormemente durante alguns meses. Além disso, a classificação dos indivíduos no que se refere à pigmentação da pele também constituiu um processo complexo. A classificação utilizada por Fitzpatrick (1988), apesar de relativamente precisa e de fácil utilização, não foi exatamente simples de ser aplicada às nossas amostras. As categorias de I a VI de Fitzpatrick levam em consideração a exposição ao sol e a ocorrência de bronzeamento e queimaduras. No entanto, essas categorias parecem ter sido elaboradas para classificação ligada ao risco de doenças de pele, uma vez que a mesma subdivide os tons de pele clara em várias categorias (I, II e III), enquanto deixa a pele negra restrita a apenas uma delas (VI).

Desse modo, as categorias sofreram pequenas alterações na classificação de nossas amostras. A reação ao sol passou a não ser o fator determinante na categorização dos tipos I a VI, uma vez que praticamente todos os indivíduos respondiam “nunca” quando perguntados se se queimavam quando tomavam sol. Além disso, pareceu extremamente impreciso situar indivíduos de tons de pele distintos na categoria VI somente por considerar a presença de “pele negra”. Sendo assim, passamos a classificar na categoria VI somente indivíduos de pele marcadamente escura e incluir na categoria V os indivíduos de pele negra de tons mais claros.

Além das questões relacionadas à coleta e classificação das amostras, é importante mencionar que houve, ainda, certa dificuldade na padronização da PCR do gene MC1R, uma vez que o protocolo descrito nunca havia sido utilizado em nosso laboratório por nenhum pesquisador.

5.2 Aspectos Populacionais

5.2.1 Polimorfismos genéticos do gene MC1R

A análise dos 29 SNPs conhecidos do gene *MC1R* revelou que 7 deles não apresentavam qualquer variação nas amostras avaliadas. Observa-se que esses 7 *loci* apresentam seus alelos menos freqüentes em freqüências extremamente baixas (maioria em torno de 1%) nos bancos de dados de outros estudos realizados (www.genecards.org), podendo ser esse um dos motivos de não termos encontrado qualquer variabilidade nos mesmos em nossas amostras.

Um levantamento de diversos trabalhos da literatura feito por Savage et al. (2008) contendo as freqüências de diversos SNPs do *MC1R* revelou diferenças consideráveis entre as populações selecionadas. Quando comparamos nossos dados de freqüência com as freqüências mundiais de 19 *loci* que são comuns entre os trabalhos (Tabela 10), observamos que enquanto as populações do Brasil, do norte e sul da Europa e dos Estados Unidos apresentavam variação em entre 57,89% e 84,21% nos marcadores, as amostras populacionais da África (26,32%) e da Ásia (31,58%) apresentavam reduzida variabilidade.

Tabela 10 – Distribuição das frequências relativas de 19 *loci* do gene *MC1R* entre as populações africana, asiática, européia e norte-americana (Savage et al., 2008) comparadas àquelas obtidas nos presente trabalho.

SNPs	África	Ásia	Norte da Europa	Sul da Europa	EUA	Brasil
+1513	0	0	0	0,24	0	0
+1558	0	0	10,69	15,75	13,21	10,14
+1580	0	1,17	0	0,06	0	0,18
+1627	0	0	0,15	0,12	0,19	0,18
+1632	0	0	1	0,12	1,51	0
+1654	0	13,41	8	3,7	9,06	4,29
+1664	0	0	0,08	0,12	0	0,18
+1698	1,71	0	0	0,12	0	0,36
+1739	0	1,75	0	0,06	0	0
+1805	0	0	0,62	1,31	0,75	0,54
+1831	0	0	5,62	3,16	6,42	2,34
+1844	0	0	0,23	0,48	1,51	0,36
+1858	0	0	8,31	1,85	7,17	2,33
+1868	0	75,51	4,62	1,61	4,15	9,35
+1884	0,43	0	0	0	0	0
+1966	2,14	0,15	0,08	0	0	0,72
+2260	0	0	1	1,43	2,45	2,35
+2280	2,99	0	0	0	0	1,42
+2322	44,44	13,27	7,69	2,33	10,75	13,88
<i>n</i>	117	343	650	838	265	284

A análise destes dados permite ainda concluir que não é inesperado o fato de que 11 destes *loci* tenham se apresentado monomórficos (+1513, +1580, +1627, +1632, +1664, +1698, +1739, +1805, +1844, +1884, +1966), segundo o critério de 99%, uma vez que todos esses marcadores possuem uma frequência extremamente baixa em todas as outras amostras populacionais analisadas. Considerando-se os outros 8 *loci* polimórficos, quando as populações são comparadas entre si, observa-se diferenças notáveis nas frequências em algumas delas. Quatro destes SNPs foram monomórficos nos africanos e asiáticos analisados, dois SNPs foram monomórficos

apenas entre os africanos, e um deles foi polimórfico apenas entre africanos. Um único SNP (+2322) se mostrou polimórfico em todas as populações consideradas; ainda assim, a frequência do alelo menos freqüente variou de 2,33% (sul da Europa) a 44,44% (África). Vale a pena ressaltar que todos esses *loci* polimórficos diferiam visivelmente entre as populações avaliadas por Savage et al. (2008).

5.2.2 Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Os 4 desvios encontrados nos *loci* +1558, +1846, +1868 e +1966 estão fora do esperado para o nível de significância de 5%, que aceitaria em torno de 1 desvio em um grupo de 22 testes. Esta diferença é estatisticamente significativa ($\chi^2 = 8,0478$; $p = 0,0046$). É interessante ressaltar que dois destes marcadores (+1558 e +1868) estão entre os três SNPs que possuem alelos classificados como variação comum, isto é, possuem alelos com frequência superior a 5%.

Mesmo que fosse encontrado um valor de desvio dentro do esperado para os testes, isso não significaria que a população em questão esteja totalmente livre da ação de fatores evolutivos. Muitas das premissas do princípio de equilíbrio podem estar sendo quebradas simultaneamente, fazendo com que os fatores de desvio estejam se anulando uns aos outros (Guo e Thompson, 1992). Dentre esses possíveis desvios concomitantes, podemos mencionar alguns como a ocorrência de mistura étnica, de acasalamentos não aleatórios, de deriva genética, de seleção e de endogamia, entre outras.

Em nossas amostras, muito provavelmente, um dos fatores de desvio atuante seja a presença de mistura étnica. Sabe-se da alta miscigenação da população de Ribeirão Preto, já tendo sido caracterizada para marcadores de ancestralidade, com proporções européia, africana e ameríndia de 59%, 34% e 7% em média, 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). De fato, estes quatro marcadores apresentam deficiência de heterozigotos.

Outro aspecto que pode ter influenciado significativamente está relacionado ao processo de amostragem. As primeiras 150 amostras foram coletadas de forma completamente aleatória. Entretanto, após verificarmos que alguns fenótipos estavam pouco representados, buscamos enriquecer a amostra quanto aos fenótipos menos freqüentes em nossa população, fazendo com que os indivíduos não fossem amostrados aleatoriamente. De fato, a realização do teste de aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg realizado com a amostra de 150 indivíduos inicialmente coletados evidencia desvios do equilíbrio apenas com relação aos SNPs +1846 e +1966 (dados não apresentados), o que é estatisticamente esperado ($\chi^2 = 0,7751$; $p = 0,3786$).

Portanto, estes fatores podem ter contribuído simultaneamente para a determinação dos desvios observados em relação às proporções esperadas segundo o modelo de Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

5.2.3 Haplótipos do gene MC1R

Através da reconstrução de haplótipos em nossas amostras, observamos que o haplótipo mais freqüente A1 (Tabela 3 a 6) também se trata do haplótipo considerado ancestral, contendo apenas os alelos selvagens (Tabela 2). O banco de dados do dbSNP (Sherry et al., 2001) confirma que os alelos que constituem o haplótipo A1 são os ancestrais em humanos, enquanto que o UCSC *Genome Browser* (Kent et al., 2002; Fujita et al., 2011) informa qual alelo desses marcadores é encontrado em outras espécies de primatas, embora não especifique se os marcadores são monomórficos em tais espécies e qual o tamanho amostral considerado. A composição dos dados destes SNPs indica que orangotangos compartilham o haplótipo A1 com humanos, enquanto chimpanzés e macacos *rhesus* possuem os haplótipos A2 e D1, respectivamente. É interessante ressaltar que estes três haplótipos estão entre os cinco haplótipos mais freqüentes em humanos (Figura 8) e diferem entre si em apenas uma ou duas posições (+1654 e/ou +2322) (Tabela 2). Tal fato nos permite sugerir que os haplótipos A1 e/ou A2 estavam representados no *pool* gênico ancestral dos grandes primatas.

O haplótipo A1 se posiciona no centro da rede haplotípica construída para o gene MC1R (Figura 8). Todos os demais haplótipos encontrados se diferenciam do haplótipo A1 por um (15 dos haplótipos), dois (14) ou três(1) passos mutacionais. Este padrão de rede haplotípica, conhecido como *star-like* ou *star-shaped*, normalmente é interpretado como sendo consistente tanto com eventos populacionais (expansão demográfica recente), quanto com seleção purificadora, por serem processos que resultam em um excesso de haplótipos pouco freqüentes e que diferem por poucos passos mutacionais a partir de um haplótipo ancestral (Nachman et al., 1996; Forster

et al., 2001). Entretanto, o fato de os haplótipos B1, C1 e D1, que codificam proteínas distintas, estarem em frequências relativamente elevadas pode estar refletindo seleção positiva a favor de novas variantes protéicas que teria ocorrido após a expansão do homem moderno em direção à eurásia.

Quando se considera a estrutura dos haplótipos do gene *MC1R*, observa-se que a magnitude do desequilíbrio de ligação entre os SNPs é elevada. O parâmetro D' atingiu valor máximo em 95,79% dos 190 pares de SNPs analisados. Apesar dos valores altos de D' encontrados ao longo de todo o gene, observamos a predominância de baixos valores de r^2 (Figura 7 e Tabela 7) em praticamente todos os pares, chegando ao máximo a 0,247 no par +1654/+2322. 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 $(D')^2$ (Hartl e Clark, 2007). Enquanto D' , na ausência de um dos quatro haplótipos possíveis para um par de SNPs bialélicos, 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 e Clark, 2007).

Portanto, a combinação dos valores desses índices permite indicar a presença de desequilíbrio de ligação completo (valor de D' igual a 1, independente do valor de r^2 ; caso o valor de r^2 também fosse igual a 1, seria observado um desequilíbrio de ligação perfeito) entre 95,79% dos SNPs do gene *MC1R*, o que caracteriza que o gene *MC1R* é alvo de poucos eventos de recombinação.

Por fim, o teste exato de desequilíbrio de ligação proporciona informações relacionadas à significância do desequilíbrio. Dos 210 pares de *loci* submetidos a esta análise, apenas 36 se mostraram significantes ao nível de 5% e 50 ao nível de 10%. Sabe-se que a presença de *loci* que possuem alelos com frequências menores que 5%, como é o nosso caso, pode reduzir o poder estatístico dos testes da análise de desequilíbrio. Isto é consistente com a presente análise, na qual 31 dos 36 testes (86,11%) foram significantes ao nível de 5%; enquanto 45 dos 50 testes (90%) significantes ao nível de 10% envolvem ao menos um dos SNPs do par considerado polimórfico. Dos demais 160 testes, apenas 99 (61,88%) envolvem um ou dois SNPs considerados polimórficos (Tabela 7).

5.3 Associações encontradas

Alguns aspectos da melanogênese podem ser comprometidos ou potencializados pelas mutações no *MC1R*, notadamente a capacidade do receptor se ligar ao hormônio sinalizador, a capacidade dele se ligar à proteína G e produzir cAMP e a viabilidade dele se expressar na superfície celular do melanócito. Sendo assim, as associações com características de pigmentação encontradas no presente estudo podem ser interpretadas com base em aspectos evolutivos, estruturais do gene e da proteína *MC1R*, e em resultados de alguns estudos funcionais *in vitro* realizados com o *MC1R*.

A estrutura da proteína codificada pelo gene *MC1R* revela a existência de alguns *loops* intracelulares (Figura 9). O segundo *loop* intracelular do *MC1R* foi apontado como sendo uma região altamente conservada entre os vertebrados, bem

como entre os subtipos humanos de receptores de melanocortina (*MC2R*, *MC3R*, *MC4R* e *MC5R*) (Sanchez-Laorden et al., 2009). Esse domínio dos GPCRs (receptores associados à proteína G) foi demonstrado como sendo um dos mais importantes no funcionamento desses receptores, por ser justamente o sítio de acoplamento e ativação das proteínas G (Shan et al., 2010).

Se considerarmos a disposição do receptor na membrana e seus domínios isoladamente (hélices transmembrana, *loops* intracelulares e *loops* extracelulares), podemos observar que a maior parte das associações de SNPs (+1831, +1846, +1858, +1868) encontradas no presente estudo relacionam-se com aqueles aminoácidos situados nesse segundo *loop* intracelular (Figura 9). Do total de 317 aminoácidos do *MC1R*, 21% estão situados em *loops* intracelulares, sendo que 8 destes correspondem a sítios contendo mutações (12%). Comparando-se a ocorrência de mutações nos domínios mencionados, essa proporção de 12% é a mais elevada entre eles (9% para hélices transmembrana e 4% para *loops* extracelulares), mostrando que essa região do gene *MC1R* sofreu alteração no regime seletivo a ela imposto, deixando de ser conservada para se tornar alvo de mutações sinônimas e não-sinônimas.

Não seria de se esperar que houvesse tantas mutações num trecho tão conservado evolutivamente e tão essencial na função do receptor. No entanto, o fato de, ao longo da evolução, o homem ter perdido os pêlos que o protegiam da radiação solar pode ser a explicação para tais mutações nesse trecho. A partir do momento que as migrações para fora da África começaram, para regiões de menor incidência solar, pode-se considerar que houve um relaxamento da pressão seletiva sobre o *MC1R*, permitindo o surgimento e manutenção de mutações que gerassem novos receptores

com função reduzida, inviáveis até então numa região tão sujeita a radiação UV como a África. Esses receptores menos eficientes, por outro lado, possivelmente foram selecionados positivamente em regiões de baixa latitude por gerarem fenótipos mais claros, úteis na fixação da vitamina D, pela absorção através da pele da pouca quantidade de luz disponível (Rees, 2003; Soejima e Koda, 2007).

5.3.1 Mutações não sinônimas

A literatura aponta para alguns estudos *in vitro* realizados com o *MC1R* selvagem (proteína A) e suas variantes (Val60Leu, Asp84Glu, Val92Met, Arg142His, Arg151Cys, Ile155Thr, Arg160Trp, Arg163Gln e Asp294His) (vide Tabela 1), utilizando-se de estímulos com o hormônio α -melanócito estimulante (α -MSH). Foi observado que quase a totalidade dos receptores que possuíam alguma variante apresentavam níveis reduzidos de cAMP quando comparados aos níveis gerados pelo receptor selvagem (Beaumont et al., 2007; Perez Oliva et al., 2009). Esse fato evidencia a interrupção de uma das etapas de sinalização do *MC1R*, ou seja, a incapacidade desses receptores se ligarem à proteína G, responsável pela ativação da adenilato-ciclase e conseqüente produção do cAMP, demonstrando assim a função reduzida de sinalização desses receptores mutantes (Beaumont et al., 2007). Apenas uma dessas variantes (Val92Met) apresentou níveis de cAMP maiores ou iguais aos gerados pelo receptor selvagem.

Ao observarmos nossos dados relativos aos *loci* +1831 (Arg151Cys), +1858 (Arg160Trp) e +2260 (Asp294His) (Tabela 8) pode-se sugerir então que as associações de cabelos ruivos encontradas em nossas amostras sejam devidas ao fato de essas

mutações acima gerarem variantes do receptor MC1R deficientes no acoplamento à proteína G e, conseqüentemente, na produção de cAMP. A mutação Asp294His até apresenta uma pequena redução na afinidade pelo α -MSH, no entanto, como seus níveis de cAMP são extremamente baixos, esse fato seria provavelmente explicado unicamente pela incapacidade de se acoplar a proteína G (Beaumont et al., 2007).

Mesmo não tendo sido associada significativamente à nenhum fenótipo no presente estudo, a mutação Arg142His também é mencionada como sendo importante no MC1R, uma vez que a essa posição do aminoácido está situada no meio de um *motif* DRY (Asp Arg Tyr), que foi apontado como sendo de grande importância no acoplamento do receptor à proteína G (Beaumont et al., 2007).

Os GPCRs, como o *MC1R*, em geral passam por certas etapas da dinâmica celular, que envolvem desde sua maturação no retículo endoplasmático (RE) até seu transporte para a membrana plasmática. Um sistema de controle de qualidade celular envolvendo chaperonas do RE avalia a existência de proteínas consideradas aberrantes ou montadas erroneamente, as retendo no RE, até que sejam degradadas por proteossomos no citossol (Anelli e Sitia, 2008).

Assim, a disponibilidade de GPCRs na superfície celular depende diretamente desse tráfego de receptores originado do RE. Estudos recentes mostraram que algumas variantes do MC1R podem apresentar padrões anômalos desse transporte intracelular, resultando numa localização celular alterada do receptor (Beaumont et al., 2007; Sanchez-Laorden et al., 2007; Perez Oliva et al., 2009; Sanchez-Laorden et al., 2009). Enquanto o esperado seria que o receptor selvagem fosse encontrado na superfície celular dos melanócitos, estes estudos mostram que algumas variantes do

MC1R (Arg151Cys e Arg160Trp) podem ter seu número de receptores reduzido na superfície, devido à retenção no interior da célula parcial ou totalmente, geralmente no RE; enquanto outras mutações (Asp294His) podem até ter uma densidade de superfície maior que o selvagem (Sanchez-Laorden et al., 2007).

As associações encontradas de alelos com cabelos ruivos (+1831 T [Arg151Cys] e +1858 T [Arg160Trp]), olhos azuis e sardas (+1858 T), poderiam, portanto, ser explicadas por esse processo de retenção.

Um estudo de Pérez Oliva et. al. (2009) mostrou que algumas mutações do *MC1R*, presentes no primeiro domínio transmembrana, se associaram com a retenção do receptor no RE, permitindo concluir em seu trabalho que esse domínio teria importância no tráfego celular. Nosso único *locus* localizado nessa primeira hélice transmembrana (+1558) mostrou algumas associações, como o alelo G associado a cabelos pretos, pele escura e olhos azuis, e o alelo T associado a cabelos castanhos, olhos verdes e presença de sardas.

Essa associação de olhos azuis e pele negra em um mesmo alelo pode ser aparentemente contraditória, no entanto, sabe-se que o *MC1R* 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*), influenciando a proporção feo/eumelanina e aqueles atuantes no transporte de proteínas melanossomais (*SLC45A2*) (Ito e Wakamatsu, 2010). Além disso, sabe-se que algumas mutações do *MC1R* podem afetar de maneiras diversas a proporção feo/eumelanina nos diferentes

tecidos, com a ocorrência de indivíduos de pele escura e cabelos claros e vice-versa (Van Raamsdonk et al., 2009).

Recentemente foi demonstrado que o *MC1R* passa por um processo de dimerização, provavelmente no RE, no qual as proteínas expressas seriam acopladas em pares antes de serem enviadas à superfície celular (Sanchez-Laorden et al., 2006). Esse é um processo comum em vários dos GPCRs, possivelmente relacionado aos processos de sinalização, regulação, expressão na superfície celular e transporte desses receptores (Sanchez-Laorden et al., 2009).

Existe a hipótese de que esse processo de dimerização possa atuar como um efeito dominante negativo no *MC1R*. Como mencionado anteriormente, algumas variantes de GPCRs podem ficar retidas no RE, não chegando a se expressar na superfície celular. Essa hipótese afirma que, através da dimerização, existe a possibilidade de um receptor totalmente funcional acabar não se expressando adequadamente na superfície por ter ficado preso no RE, dimerizado a uma dessas variantes retidas. Obviamente, alguns receptores funcionais poderiam se dimerizar entre si, chegando à superfície celular normalmente; porém, vale ressaltar que a expressão superficial na presença de uma variante retida acabará reduzindo a capacidade de sinalização deste receptor como um todo na célula (Beaumont et al., 2007).

Essa seria uma explicação possível para as associações com sardas, olhos azuis e cabelos ruivos mencionadas anteriormente nos *loci* +1831, +1858 e +2260 mesmo esses alelos estando em heterozigose (Tabela 8). Estudos *in vitro* mostram que, de fato, as proteínas do *MC1R* que contêm essas variantes podem se dimerizar com uma

proteína funcional, mantendo ambas retidas no RE e resultando em uma redução drástica de sua expressão na superfície do melanócito e, por consequência, a manifestação em fenótipos claros, associados à feomelanina (Beaumont et al., 2007).

Por fim, os alelos A dos *loci* +1645 e +1654 se mostraram associados a cabelos ruivos, pele clara e presença de sardas. Apesar de essas mutações ainda não terem sido relacionadas a nenhuma alteração funcional no MC1R, as associações encontradas sugerem que os receptores que as possuem favorecem a síntese de feomelanina. Seria aceito pressupor que essas variantes tenham aumentado suas frequências nos humanos a partir do momento que as populações chegaram à regiões de menor incidência solar, como a Europa.

Quando se considera estas mutações arranjadas em haplótipos, verifica-se que os haplótipos B1, F1, G1, H1 e N1 e suas respectivas proteínas estão associados à pigmentação clara (Tabela 9) e função reduzida do gene MC1R, enquanto que o C1, associado com cabelos pretos, estaria relacionado a maior atividade do gene MC1R.

5.3.2 Mutações sinônimas

Nota-se pelas associações e estudos relatados acima que, com raras exceções, as mutações levam a redução de função do receptor. Nossos resultados apresentados são consistentes com a hipótese de que a proteína A (receptor ancestral) apresenta elevada atividade, uma vez que o conjunto de haplótipos que a codificam (haplótipos A1, A2, A3, A4 e A5, os quais diferem apenas por mutações sinônimas) se encontraram

associados à pele escura, olhos castanho escuros, ausência de sardas e cabelos castanhos e pretos (Tabela 9).

Existe a idéia que todas as mutações sinônimas são neutras à seleção natural, já que elas não têm qualquer efeito sob a respectiva proteína, inferindo-se a partir disso que nenhuma alteração fenotípica ocorreria. No entanto, avanços científicos vêm mostrando que ainda não conhecemos todos os meios de atuação e força da seleção natural sob esse tipo de mutação (Chamary et al., 2006). Alguns mecanismos celulares que desempenham papéis importantíssimos no processo de expressão gênica podem ser alvos da influência de algumas mutações sinônimas. Focando na tradução das proteínas, para um dado conjunto de códons sinônimos, pode não existir uma quantidade idêntica dos diferentes tRNAs que se ligam a esses códons. A partir desse fato, pode-se presumir que a seleção natural favoreceria aqueles códons que fossem traduzidos mais rapidamente, ou seja, aqueles que possuísem maior quantidade de tRNA disponível. Assim, uma mutação sinônima seria capaz de, em teoria, favorecer ou dificultar a taxa de tradução de toda uma proteína.

Outro fator potencialmente dependente das mutações sinônimas é a estabilidade do mRNA nas células, já que algumas estruturas secundárias do mRNA podem conferir resistência à degradação prematura (Chamary e Hurst, 2005). Assim, a seleção poderia favorecer aquelas mutações que aumentassem a chance de pareamentos entre bases na estrutura secundária do mRNA, resultantes em estruturas resistentes.

Das sete mutações sinônimas analisadas no *MC1R*, observamos associações de dois SNPs com fenótipo de pigmentação em nossas análises (+2097 e +2322) (Tabela

8). O alelo C do *locus* +2097 se associou à pele clara, enquanto o alelo T se mostrou associado à presença de cabelos pretos. No caso do *locus* +2322, observa-se que o alelo A se relaciona com olhos verdes, pele clara e cabelos castanhos, enquanto o alelo G se associa à fenótipos de hiperpigmentação (pele escura, cabelos pretos e olhos castanho escuros). As mutações relacionadas à fenótipos mais claros poderiam gerar códons sinônimos que, como citado acima, resultassem em alterações nos processos de tradução ou na estabilidade do mRNA nos melanócitos, mudando a biodisponibilidade das proteínas que as possuísem e conseqüentemente o processo de melanogênese da célula.

5.3.3 Região 3' não traduzida

Foram encontradas associações com um SNP situado fora da região codificante (+2346), mais exatamente na região 3' não traduzida (3'UTR) do *MC1R*. Atualmente, diversos estudos vêm mostrando que a região 3'UTR é um dos principais alvos de micro RNAs (miRNAs). Em células de mamíferos, os miRNAs são capazes de desestabilizar seus transcritos-alvo através de vários mecanismos, como a desadenilação e a remoção do *cap* 5' (Lim et al., 2005).

Considerando-se que algumas mutações nessa região podem gerar trechos-alvo no mRNA para os miRNAs, as associações de *loci* encontradas nesse trecho provavelmente estariam relacionadas à atuação dos miRNAs. O alelo A do *locus* +2346 se associou à características de alta pigmentação, como cabelos pretos, pele escura e olhos castanho escuros; por outro lado, o alelo G se associou a cabelos castanhos, pele clara e olhos verdes (Tabela 8). Análises *in silico* (dados não apresentados)

evidenciaram a existência de mais de 10 miRNAs que apresentam maior afinidade por esta porção da região 3'UTR na presença do alelo G do que na presença do alelo A. O alelo G poderia atuar diminuindo a estabilidade do mRNA do *MC1R* como um todo, levando à quedas nos níveis de expressão, que poderiam resultar em fenótipos claros, como em nosso caso, pele clara e olhos verdes. Entretanto, esta hipótese precisa ser comprovada por meio de estudos funcionais que avaliem se tais microRNAs se expressariam nos melanócitos e se haveria alteração de expressão causada pelos miRNAs. Considerando-se as associações dos haplótipos aqui relatadas (Tabela 9), observa-se que os haplótipos que contém o alelo A nesse *locus* (Haplótipos A3 e A5) apresentam associações com pele escura, olhos castanho escuros e cabelos pretos, o que é consistente com o raciocínio apresentado. Pode-se sugerir que estes haplótipos tenham níveis de expressão ainda maiores do que os outros haplótipos que codificam a mesma proteína A, resultando em uma maior produção de eumelanina.

Figura 9 – Estrutura secundária do MC1R. 28 SNPs da região codificadora utilizados no presente trabalho se encontram evidenciados por círculos de cores distintas, representando as mutações sinônimas e não sinônimas, segundo a legenda acima. O segundo loop intracelular está evidenciado em cinza. IL: loop intracelular; EL: loop extracelular (Adaptado de Sanchez-Laorden (2009))

6 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Este foi o primeiro estudo de associação de fenótipos de pigmentação em uma população tão miscigenada quanto a brasileira envolvendo o MC1R. O presente estudo mostra a relevância da região codificadora do MC1R e consistência com diversos estudos funcionais. Observa-se um conjunto de SNPs associados claramente à fenótipos relacionados à feomelanina, enquanto outros se relacionam à ocorrência de eumelanina. Nosso estudo permitiu a constatação dessas associações a níveis alélico, genotípico, haplotípico e de proteína tanto com SNPs sinônimos quanto não-sinônimos.

A avaliação de um SNP da 3'UTR e seus microRNAs, sugere que a regulação da expressão gênica do *MC1R* pode ser tão importante quanto as variações estruturais da proteína. As regiões promotora e UTR, normalmente envolvidas no controle da expressão gênica são pouco estudadas .

Atualmente não se tem muito conhecimento a respeito da possível influência da região promotora na atuação do MC1R. Ibarrola-Villava et al. (2010) apresentam o único trabalho envolvendo a análise da região promotora deste gene, no qual foram utilizados 3 *tag* SNPs da promotora do MC1R para verificação das frequências dos haplótipos gerados na população espanhola, em comparação com aquelas do HapMap. Observaram que as frequências dos haplótipos formados diferiam entre as populações européia, africana e asiática, sem realizarem, no entanto, nenhuma tentativa de associação com qualquer fenótipo de pigmentação. Nenhum trabalho envolvendo a região 3'UTR do MC1R foi encontrado durante o desenvolvimento de nosso trabalho.

Em estudos futuros seria de grande interesse a genotipagem da região promotora e da 3'UTR do *MC1R*, a fim de se avaliar sua influência na pigmentação em humanos. Variações nestas regiões poderiam elucidar a atuação sobre o MC1R, principalmente em relação a possíveis aumentos ou reduções nos níveis de expressão gênica, que poderiam se refletir em variações fenotípicas da pele, olhos e cabelos.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, A.;MARTIN, P.;ALBARRAN, C.;GARCIA, P.;FERNANDEZ DE SIMON, L.;JESUS ITURRALDE, M.;FERNANDEZ-RODRIGUEZ, A.;ATIENZA, I.;CAPILLA, J.;GARCIA-HIRSCHFELD, J.;MARTINEZ, P.;VALLEJO, G.;GARCIA, O.;GARCIA, E.;REAL, P.;ALVAREZ, D.;LEON, A.;SANCHO, M. Challenges of DNA profiling in mass disaster investigations. **Croat Med J**, v. 46, n. 4, p. 540-8, Aug 2005.

ANELLI, T.;SITIA, R. Protein quality control in the early secretory pathway. **EMBO J**, v. 27, n. 2, p. 315-27, Jan 23 2008.

BANDELT, H. J.;FORSTER, P.;ROHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Mol Biol Evol**, v. 16, n. 1, p. 37-48, Jan 1999.

BARRETT, J. C.;FRY, B.;MALLER, J.;DALY, M. J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v. 21, n. 2, p. 263-5, Jan 15 2005.

BASTIAENS, M.;TER HUURNE, J.;GRUIS, N.;BERGMAN, W.;WESTENDORP, R.;VERMEER, B. J.;BOUWES BAVINCK, J. N. The melanocortin-1-receptor gene is the major freckle gene. **Hum Mol Genet**, v. 10, n. 16, p. 1701-8, Aug 1 2001.

BEAUMONT, K. A.;SHEKAR, S. N.;NEWTON, R. A.;JAMES, M. R.;STOW, J. L.;DUFFY, D. L.;STURM, R. A. Receptor function, dominant negative activity and phenotype correlations for MC1R variant alleles. **Hum Mol Genet**, v. 16, n. 18, p. 2249-60, Sep 15 2007.

BOND, J. W. Value of DNA evidence in detecting crime. **J Forensic Sci**, v. 52, n. 1, p. 128-36, Jan 2007.

BRANICKI, W.;BRUDNIK, U.;KUPIEC, T.;WOLANSKA-NOWAK, P.;WOJAS-PELC, A. Determination of phenotype associated SNPs in the MC1R gene. **J Forensic Sci**, v. 52, n. 2, p. 349-54, Mar 2007.

BRANICKI, W.;BRUDNIK, U.;WOJAS-PELC, A. Interactions between HERC2, OCA2 and MC1R may influence human pigmentation phenotype. **Ann Hum Genet**, v. 73, n. 2, p. 160-70, Mar 2009.

BRENNER, C. H.;WEIR, B. S. Issues and strategies in the DNA identification of World Trade Center victims. **Theor Popul Biol**, v. 63, n. 3, p. 173-8, May 2003.

BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**, v. 234, n. 2, p. 177-86, Jul 8 1999.

BUDIMLIJA, Z. M.;PRINZ, M. K.;ZELSON-MUNDORFF, A.;WIERSEMA, J.;BARTELINK, E.;MACKINNON, G.;NAZZARUOLO, B. L.;ESTACIO, S. M.;HENNESSEY, M. J.;SHALER, R. C. World Trade Center human identification project: experiences with individual body identification cases. **Croat Med J**, v. 44, n. 3, p. 259-63, Jun 2003.

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, Jul 2005.

BUTLER, J. M. **Forensic DNA typing : biology, technology, and genetics of STR markers**. 2nd. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press, 2005. xvii, 660 p. p.

CAVALLI-SFORZA, L. L.;MENOZZI, P.;PIAZZA, A. **The history and geography of human genes**. Princeton, N.J.: Princeton University Press, 1994. xi, 541, 518 p. p.

CHAMARY, J. V.;HURST, L. D. Evidence for selection on synonymous mutations affecting stability of mRNA secondary structure in mammals. **Genome Biol**, v. 6, n. 9, p. R75, 2005.

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, Feb 2006.

CULOTTA, E. Genetics. Ancient DNA reveals Neandertals with red hair, fair complexions. **Science**, v. 318, n. 5850, p. 546-7, Oct 26 2007.

DUFFY, D. L.;ZHAO, Z. Z.;STURM, R. A.;HAYWARD, N. K.;MARTIN, N. G.;MONTGOMERY, G. W. Multiple pigmentation gene polymorphisms account for a substantial proportion of risk of cutaneous malignant melanoma. **J Invest Dermatol**, v. 130, n. 2, p. 520-8, Feb 2010.

EDWARDS, M.;BIGHAM, A.;TAN, J.;LI, S.;GOZDZIK, A.;ROSS, K.;JIN, L.;PARRA, E. J. Association of the OCA2 polymorphism His615Arg with melanin content in east Asian populations: further evidence of convergent evolution of skin pigmentation. **PLoS Genet**, v. 6, n. 3, p. e1000867, Mar 2010.

ELFAKIR, A.;EZZEDINE, K.;LATREILLE, J.;AMBROISINE, L.;JDID, R.;GALAN, P.;HERCBERG, S.;GRUBER, F.;MALVY, D.;TSCHACHLER, E.;GUINOT, C. Functional MC1R-gene variants are associated with increased risk for severe photoaging of facial skin. **J Invest Dermatol**, v. 130, n. 4, p. 1107-15, Apr 2010.

EMMETT, A.;UCHIDA, T.;WAGNER, R. F., JR. Sunburn risk factors for beachgoing children. **Dermatol Online J**, v. 14, n. 1, p. 28, 2008.

EXCOFFIER, L.;LISCHER, H. E. L. 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. 564-567, May 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, Sep 1995.

FERREIRA, L. B.;MENDES-JUNIOR, C. T.;WIEZEL, C. E.;LUIZON, M. R.;SIMOES, A. L. Genomic ancestry of a sample population from the state of Sao Paulo, Brazil. **Am J Hum Biol**, v. 18, n. 5, p. 702-5, Sep-Oct 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, Jun 1988.

FORSTER, P.;TORRONI, A.;RENFREW, C.;ROHL, A. Phylogenetic star contraction applied to Asian and Papuan mtDNA evolution. **Mol Biol Evol**, v. 18, n. 10, p. 1864-81, Oct 2001.

FRANÇA, G. V. D. **Medicina legal**. 6.a edição. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2001. xiii, 579 p. p.

FRUDAKIS, T.;TERRAVAINEN, T.;THOMAS, M. Multilocus OCA2 genotypes specify human iris colors. **Hum Genet**, v. 122, n. 3-4, p. 311-26, Nov 2007.

FUJIMOTO, A.;KIMURA, R.;OHASHI, J.;OMI, K.;YULIWULANDARI, R.;BATUBARA, L.;MUSTOFA, M. S.;SAMAKKARN, U.;SETTHEETHAM-ISHIDA, W.;ISHIDA, T.;MORISHITA, Y.;FURUSAWA,

T.;NAKAZAWA, M.;OHTSUKA, R.;TOKUNAGA, K. A scan for genetic determinants of human hair morphology: EDAR is associated with Asian hair thickness. **Hum Mol Genet**, v. 17, n. 6, p. 835-43, Mar 15 2008.

FUJITA, P. A.;RHEAD, B.;ZWEIG, A. S.;HINRICHS, A. S.;KAROLCHIK, D.;CLINE, M. S.;GOLDMAN, M.;BARBER, G. P.;CLAWSON, H.;COELHO, A.;DIEKHANS, M.;DRESZER, T. R.;GIARDINE, B. M.;HARTE, R. A.;HILLMAN-JACKSON, J.;HSU, F.;KIRKUP, V.;KUHN, R. M.;LEARNED, K.;LI, C. H.;MEYER, L. R.;POHL, A.;RANEY, B. J.;ROSENBLOOM, K. R.;SMITH, K. E.;HAUSSLER, D.;KENT, W. J. The UCSC Genome Browser database: update 2011. **Nucleic Acids Res**, v. 39, n. Database issue, p. D876-82, Jan 2011.

GERSTENBLITH, M. R.;GOLDSTEIN, A. M.;FARGNOLI, M. C.;PERIS, K.;LANDI, M. T. Comprehensive evaluation of allele frequency differences of MC1R variants across populations. **Hum Mutat**, v. 28, n. 5, p. 495-505, May 2007.

GOODWIN, W.;LINACRE, A.;HADI, S. **An introduction to forensic genetics**. 2nd. Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell, 2011. p. p.

GRAF, J.;VOISEY, J.;HUGHES, I.;VAN DAAL, A. Promoter polymorphisms in the MATP (SLC45A2) gene are associated with normal human skin color variation. **Hum Mutat**, v. 28, n. 7, p. 710-7, Jul 2007.

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

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, Jun 1992.

HAN, J.;KRAFT, P.;NAN, H.;GUO, Q.;CHEN, C.;QURESHI, A.;HANKINSON, S. E.;HU, F. B.;DUFFY, D. L.;ZHAO, Z. Z.;MARTIN, N. G.;MONTGOMERY, G. W.;HAYWARD, N. K.;THOMAS, G.;HOOVER, R. N.;CHANOCK, S.;HUNTER, D. J. A genome-wide association study identifies novel alleles associated with hair color and skin pigmentation. **PLoS Genet**, v. 4, n. 5, p. e1000074, May 2008.

HARDING, R. M.;HEALY, E.;RAY, A. J.;ELLIS, N. S.;FLANAGAN, N.;TODD, C.;DIXON, C.;SAJANTILA, A.;JACKSON, I. J.;BIRCH-MACHIN, M. A.;REES, J. L. Evidence for variable selective pressures at MC1R. **Am J Hum Genet**, v. 66, n. 4, p. 1351-61, Apr 2000.

HARTL, D. L.;CLARK, A. G. **Principles of population genetics**. 4th. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, 2007. xv, 652 p. p.

IBARROLA-VILLAVA, M.;FERNANDEZ, L. P.;PITA, G.;BRAVO, J.;FLORISTAN, U.;SENDAGORTA, E.;FEITO, M.;AVILES, J. A.;MARTIN-GONZALEZ, M.;LAZARO, P.;BENITEZ, J.;RIBAS, G. Genetic analysis of three important genes in pigmentation and melanoma susceptibility: CDKN2A, MC1R and HERC2/OCA2. **Exp Dermatol**, v. 19, n. 9, p. 836-44, Sep 2010.

ITO, S.;WAKAMATSU, K. Human hair melanins: what we have learned and have not learned from mouse coat color pigmentation. **Pigment Cell Melanoma Res**, Sep 14 2010.

KABBARAH, O.;CHIN, L. Advances in malignant melanoma: genetic insights from mouse and man. **Front Biosci**, v. 11, p. 928-42, 2006.

KAYSER, M.;LIU, F.;JANSSENS, A. C.;RIVADENEIRA, F.;LAO, O.;VAN DUIJN, K.;VERMEULEN, M.;ARP, P.;JHAMAI, M. M.;VAN IJCKEN, W. F.;DEN DUNNEN, J. T.;HEATH, S.;ZELENKA, D.;DESPRIET, D. D.;KLAVER, C. C.;VINGERLING, J. R.;DE JONG, P. T.;HOFMAN, A.;AULCHENKO, Y. S.;UITTERLINDEN, A. G.;OOSTRA, B. A.;VAN DUIJN, C. M. Three genome-wide association studies and a linkage analysis identify HERC2 as a human iris color gene. **Am J Hum Genet**, v. 82, n. 2, p. 411-23, Feb 2008.

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, Jun 2009.

KENT, W. J.;SUGNET, C. W.;FUREY, T. S.;ROSKIN, K. M.;PRINGLE, T. H.;ZAHLER, A. M.;HAUSSLER, D. The human genome browser at UCSC. **Genome Res**, v. 12, n. 6, p. 996-1006, Jun 2002.

LALUEZA-FOX, C.;ROMPLER, H.;CARAMELLI, D.;STAUBERT, C.;CATALANO, G.;HUGHES, D.;ROHLAND, N.;PILLI, E.;LONGO, L.;CONDEMI, S.;DE LA RASILLA, M.;FORTEA, J.;ROSAS, A.;STONEKING, M.;SCHONEBERG, T.;BERTRANPETIT, J.;HOFREITER, M. A melanocortin 1 receptor allele suggests varying pigmentation among Neanderthals. **Science**, v. 318, n. 5855, p. 1453-5, Nov 30 2007.

LIM, L. P.;LAU, N. C.;GARRETT-ENGELE, P.;GRIMSON, A.;SCHELTER, J. M.;CASTLE, J.;BARTEL, D. P.;LINSLEY, P. S.;JOHNSON, J. M. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. **Nature**, v. 433, n. 7027, p. 769-73, Feb 17 2005.

LOUIS, E. J.;DEMPSTER, E. R. An exact test for Hardy-Weinberg and multiple alleles. **Biometrics**, v. 43, n. 4, p. 805-11, Dec 1987.

MAKOVA, K.;NORTON, H. Worldwide polymorphism at the MC1R locus and normal pigmentation variation in humans. **Peptides**, v. 26, n. 10, p. 1901-8, Oct 2005.

MCEVOY, B.;BELEZA, S.;SHRIVER, M. D. The genetic architecture of normal variation in human pigmentation: an evolutionary perspective and model. **Hum Mol Genet**, v. 15 Spec No 2, p. R176-81, Oct 15 2006.

MENGEL-FROM, J.;WONG, T. H.;MORLING, N.;REES, J. L.;JACKSON, I. J. Genetic determinants of hair and eye colours in the Scottish and Danish populations. **BMC Genet**, v. 10, p. 88, 2009.

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, Feb 11 1988.

MUNIZ, Y. C.;FERREIRA, L. B.;MENDES-JUNIOR, C. T.;WIEZEL, C. E.;SIMOES, A. L. Genomic ancestry in urban Afro-Brazilians. **Ann Hum Biol**, v. 35, n. 1, p. 104-11, Jan-Feb 2008.

MYLES, S.;SOMEL, M.;TANG, K.;KELSO, J.;STONEKING, M. Identifying genes underlying skin pigmentation differences among human populations. **Hum Genet**, v. 120, n. 5, p. 613-21, Jan 2007.

NACHMAN, M. W.;BROWN, W. M.;STONEKING, M.;AQUADRO, C. F. Nonneutral mitochondrial DNA variation in humans and chimpanzees. **Genetics**, v. 142, n. 3, p. 953-63, Mar 1996.

NAKAYAMA, K.;SOEMANTRI, A.;JIN, F.;DASHNYAM, B.;OHTSUKA, R.;DUANCHANG, P.;ISA, M. N.;SETTHEETHAM-ISHIDA, W.;HARIHARA, S.;ISHIDA, T. Identification of novel functional

variants of the melanocortin 1 receptor gene originated from Asians. **Hum Genet**, v. 119, n. 3, p. 322-30, Apr 2006.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 1987. x, 512 p. p.

NORTON, H. L.;KITLES, R. A.;PARRA, E.;MCKEIGUE, P.;MAO, X.;CHENG, K.;CANFIELD, V. A.;BRADLEY, D. G.;MCEVOY, B.;SHRIVER, M. D. Genetic evidence for the convergent evolution of light skin in Europeans and East Asians. **Mol Biol Evol**, v. 24, n. 3, p. 710-22, Mar 2007.

O'RAHILLY, S. Human genetics illuminates the paths to metabolic disease. **Nature**, v. 462, n. 7271, p. 307-14, Nov 19 2009.

ODUNZE, M.;COHN, A.;FEW, J. W. Restylane and people of color. **Plast Reconstr Surg**, v. 120, n. 7, p. 2011-6, Dec 2007.

PARRA, F. C.;AMADO, R. C.;LAMBERTUCCI, J. R.;ROCHA, J.;ANTUNES, C. M.;PENA, S. D. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 1, p. 177-82, Jan 7 2003.

PEREZ OLIVA, A. B.;FERNENDEZ, L. P.;DETORRE, C.;HERRAIZ, C.;MARTINEZ-ESCRIBANO, J. A.;BENITEZ, J.;LOZANO TERUEL, J. A.;GARCIA-BORRON, J. C.;JIMENEZ-CERVANTES, C.;RIBAS, G. Identification and functional analysis of novel variants of the human melanocortin 1 receptor found in melanoma patients. **Hum Mutat**, v. 30, n. 5, p. 811-22, May 2009.

PEROLA, M.;OHMAN, M.;HIEKKALINNA, T.;LEPPAVUORI, J.;PAJUKANTA, P.;WESSMAN, M.;KOSKENVUO, M.;PALOTIE, A.;LANGE, K.;KAPRIO, J.;PELTONEN, L. Quantitative-trait-locus analysis of body-mass index and of stature, by combined analysis of genome scans of five Finnish study groups. **Am J Hum Genet**, v. 69, n. 1, p. 117-23, Jul 2001.

PRINZ, M.;CARRACEDO, A.;MAYR, W. R.;MORLING, N.;PARSONS, T. J.;SAJANTILA, A.;SCHEITHAUER, R.;SCHMITTER, H.;SCHNEIDER, P. M. 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, Mar 2007.

PROTA, G.;HU, D. N.;VINCENSI, M. R.;MCCORMICK, S. A.;NAPOLITANO, A. Characterization of melanins in human irides and cultured uveal melanocytes from eyes of different colors. **Exp Eye Res**, v. 67, n. 3, p. 293-9, Sep 1998.

PULKER, H.;LAREU, M. V.;PHILLIPS, C.;CARRACEDO, A. Finding genes that underlie physical traits of forensic interest using genetic tools. **Forensic Sci Int-Gen**, v. 1, n. 2, p. 100-104, Jun 2007.

RANA, B. K.;HEWETT-EMMETT, D.;JIN, L.;CHANG, B. H.;SAMBUUGHIN, N.;LIN, M.;WATKINS, S.;BAMSHAD, M.;JORDE, L. B.;RAMSAY, M.;JENKINS, T.;LI, W. H. High polymorphism at the human melanocortin 1 receptor locus. **Genetics**, v. 151, n. 4, p. 1547-57, Apr 1999.

REES, J. L. Genetics of hair and skin color. **Annu Rev Genet**, v. 37, p. 67-90, 2003.

ROBBINS, L. S.;NADEAU, J. H.;JOHNSON, K. R.;KELLY, M. A.;ROSELLI-REHFUSS, L.;BAACK, E.;MOUNTJOY, K. G.;CONE, R. D. Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. **Cell**, v. 72, n. 6, p. 827-34, Mar 26 1993.

ROUSSET, F. GENEPOP ' 007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. **Mol Ecol Resour**, v. 8, n. 1, p. 103-106, Jan 2008.

RUIZ-RODRIGUEZ, R.;LOPEZ, L.;CANDELAS, D.;PEDRAZ, J. Photorejuvenation using topical 5-methyl aminolevulinate and red light. **J Drugs Dermatol**, v. 7, n. 7, p. 633-7, Jul 2008.

SAFRAN, M.;DALAH, I.;ALEXANDER, J.;ROSEN, N.;INY STEIN, T.;SHMOISH, M.;NATIV, N.;BAHIR, I.;DONIGER, T.;KRUG, H.;SIROTA-MADI, A.;OLENDER, T.;GOLAN, Y.;STELZER, G.;HAREL, A.;LANCET, D. GeneCards Version 3: the human gene integrator. **Database (Oxford)**, v. 2010, p. baq020, 2010.

SANCHEZ-LAORDEN, B. L.;HERRAIZ, C.;VALENCIA, J. C.;HEARING, V. J.;JIMENEZ-CERVANTES, C.;GARCIA-BORRON, J. C. Aberrant trafficking of human melanocortin 1 receptor variants associated with red hair and skin cancer: Steady-state retention of mutant forms in the proximal golgi. **J Cell Physiol**, v. 220, n. 3, p. 640-54, Sep 2009.

SANCHEZ-LAORDEN, B. L.;JIMENEZ-CERVANTES, C.;GARCIA-BORRON, J. C. Regulation of human melanocortin 1 receptor signaling and trafficking by Thr-308 and Ser-316 and its alteration in variant alleles associated with red hair and skin cancer. **J Biol Chem**, v. 282, n. 5, p. 3241-51, Feb 2 2007.

SANCHEZ-LAORDEN, B. L.;SANCHEZ-MAS, J.;MARTINEZ-ALONSO, E.;MARTINEZ-MENARGUEZ, J. A.;GARCIA-BORRON, J. C.;JIMENEZ-CERVANTES, C. Dimerization of the human melanocortin 1 receptor: functional consequences and dominant-negative effects. **J Invest Dermatol**, v. 126, n. 1, p. 172-81, Jan 2006.

SAVAGE, S. A.;GERSTENBLITH, M. R.;GOLDSTEIN, A. M.;MIRABELLO, L.;FARGNOLI, M. C.;PERIS, K.;LANDI, M. T. Nucleotide diversity and population differentiation of the melanocortin 1 receptor gene, MC1R. **BMC Genet**, v. 9, p. 31, 2008.

SHAN, J.;WEINSTEIN, H.;MEHLER, E. L. Probing the structural determinants for the function of intracellular loop 2 in structurally cognate G-protein-coupled receptors. **Biochemistry**, v. 49, n. 50, p. 10691-701, Dec 21 2010.

SHERRY, S. T.;WARD, M. H.;KHOLODOV, M.;BAKER, J.;PHAN, L.;SMIGIELSKI, E. M.;SIROTKIN, K. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. **Nucleic Acids Res**, v. 29, n. 1, p. 308-11, Jan 1 2001.

SMITH, D. R.;SPAULDING, D. T.;GLENN, H. M.;FULLER, B. B. The relationship between Na(+)/H(+) exchanger expression and tyrosinase activity in human melanocytes. **Exp Cell Res**, v. 298, n. 2, p. 521-34, Aug 15 2004.

SOBRINO, B.;BRION, M.;CARRACEDO, A. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. **Forensic Sci Int**, v. 154, n. 2-3, p. 181-94, Nov 25 2005.

SOEJIMA, M.;KODA, Y. Population differences of two coding SNPs in pigmentation-related genes SLC24A5 and SLC45A2. **Int J Legal Med**, v. 121, n. 1, p. 36-9, Jan 2007.

STEPHENS, M.;SCHEET, P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. **Am J Hum Genet**, v. 76, n. 3, p. 449-62, Mar 2005.

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, Apr 2001.

STOKOWSKI, R. P.;PANT, P. V.;DADD, T.;FEREDAY, A.;HINDS, D. A.;JARMAN, C.;FILSELL, W.;GINGER, R. S.;GREEN, M. R.;VAN DER OUDERAA, F. J.;COX, D. R. A genomewide association study of skin pigmentation in a South Asian population. **Am J Hum Genet**, v. 81, n. 6, p. 1119-32, Dec 2007.

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

STURM, R. A.;BOX, N. F.;RAMSAY, M. Human pigmentation genetics: the difference is only skin deep. **Bioessays**, v. 20, n. 9, p. 712-21, Sep 1998.

STURM, R. A.;DUFFY, D. L.;ZHAO, Z. Z.;LEITE, F. P.;STARK, M. S.;HAYWARD, N. K.;MARTIN, N. G.;MONTGOMERY, G. W. A single SNP in an evolutionary conserved region within intron 86 of the *HERC2* gene determines human blue-brown eye color. **Am J Hum Genet**, v. 82, n. 2, p. 424-31, Feb 2008.

STURM, R. A.;FRUDAKIS, T. N. Eye colour: portals into pigmentation genes and ancestry. **Trends Genet**, v. 20, n. 8, p. 327-32, Aug 2004.

STURM, R. A.;TEASDALE, R. D.;BOX, N. F. Human pigmentation genes: identification, structure and consequences of polymorphic variation. **Gene**, v. 277, n. 1-2, p. 49-62, Oct 17 2001.

SULEM, P.;GUDBJARTSSON, D. F.;STACEY, S. N.;HELGASON, A.;RAFNAR, T.;MAGNUSSON, K. P.;MANOLESCU, A.;KARASON, A.;PALSSON, A.;THORLEIFSSON, G.;JAKOBSDOTTIR, M.;STEINBERG, S.;PALSSON, S.;JONASSON, F.;SIGURGEIRSSON, B.;THORISDOTTIR, K.;RAGNARSSON, R.;BENEDIKTSDOTTIR, K. R.;ABEN, K. K.;KIEMENEY, L. A.;OLAFSSON, J. H.;GULCHER, J.;KONG, A.;THORSTEINSDOTTIR, U.;STEFANSSON, K. Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. **Nat Genet**, v. 39, n. 12, p. 1443-52, Dec 2007.

SZELL, M.;BALTAS, E.;BODAI, L.;BATA-CSORGO, Z.;NAGY, N.;DALLOS, A.;POURFARZI, R.;SIMICS, E.;KONDOROSI, I.;SZALAI, Z.;TOTH, G. K.;HUNYADI, J.;DOBOZY, A.;KEMENY, L. The Arg160Trp allele of melanocortin-1 receptor gene might protect against vitiligo. **Photochem Photobiol**, v. 84, n. 3, p. 565-71, May-Jun 2008.

VAN RAAMSDONK, C. D.;BARSH, G. S.;WAKAMATSU, K.;ITO, S. Independent regulation of hair and skin color by two G protein-coupled pathways. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 22, n. 6, p. 819-26, Dec 2009.

WALSH, S. J. Recent advances in forensic genetics. **Expert Rev Mol Diagn**, v. 4, n. 1, p. 31-40, Jan 2004.

WANG, L.;MCLEOD, H. L.;WEINSHILBOUM, R. M. Genomics and drug response. **N Engl J Med**, v. 364, n. 12, p. 1144-53, Mar 24 2011.

WATSON, A. New tools. A new breed of high-tech detectives. **Science**, v. 289, n. 5481, p. 850-4, Aug 11 2000.

WEEDEN, T.;STEFANO, J.;DUAN, S.;EDLING, A.;HOU, L.;CHUANG, W. L.;PERRICONE, M. A.;PAN, C.;DZURIS, J. L. A retro-inverso alpha-melanocyte stimulating hormone analog with MC1R-binding selectivity. **J Pept Sci**, v. 17, n. 1, p. 47-55, Jan 2011.

WONG, T. H.;REES, J. L. The relation between melanocortin 1 receptor (MC1R) variation and the generation of phenotypic diversity in the cutaneous response to ultraviolet radiation. **Peptides**, v. 26, n. 10, p. 1965-71, Oct 2005.

YAMAGUCHI, Y.;BRENNER, M.;HEARING, V. J. The regulation of skin pigmentation. **J Biol Chem**, v. 282, n. 38, p. 27557-61, Sep 21 2007.

YANG, Y.;DICKINSON, C.;HASKELL-LUEVANO, C.;GANTZ, I. Molecular basis for the interaction of [Nle⁴,D-Phe⁷]melanocyte stimulating hormone with the human melanocortin-1 receptor. **J Biol Chem**, v. 272, n. 37, p. 23000-10, Sep 12 1997.

APÊNDICES

APÊNDICE 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: ____ anos	Estatura: ____ cm	Peso: ____ kg	Sexo: ☐ M ☐ F	Tipo de cabelo: _____ (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): _____				

APÊNDICE 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 saudáveis, 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

APÊNDICE 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,

Prof.ª. 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

APÊNDICE 4

Frequências Alélicas e Genotípicas relativas, distribuídas em categorias segundo a cor dos **olhos** (p_{EHW} – significância do Equilíbrio de Hardy-Weinberg/ H_o – Heterozigose Observada/ H_s – Heterozigose Esperada)

	SNP	Azuis	Verdes	Mel	Castanho Claros	Castanho Escuros	Total
+1558	G	1,0000	0,8356	0,9231	0,8897	0,9252	0,8989
	T	-	0,1644	0,0769	0,1103	0,0748	0,1011
	GG	1,0000	0,7123	0,9231	0,8088	0,8505	0,8191
	GT	-	0,2466	-	0,1618	0,1495	0,1596
	TT	-	0,0411	0,0769	0,0294	-	0,0213
	$2n$	42	146	26	136	214	564
	p_{EHW}	-	0,3902	0,04	0,1706	1,0000	0,049
	H_o	-	0,2466	-	0,1618	0,1495	0,1596
	H_s	-	0,2766	0,1477	0,1977	0,1390	0,1820
+1580	A	-	-	-	-	0,0047	0,0018
	G	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9953	0,9982
	AA	-	-	-	-	-	-
	AG	-	-	-	-	0,0093	0,0035
	GG	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9907	0,9965
	$2n$	42	148	26	136	214	566
	p_{EHW}	-	-	-	-	-	-
	H_o	-	-	-	-	0,0094	0,0035
	H_s	-	-	-	-	0,0094	0,0035
+1627	C	-	-	-	0,0074	-	0,0018
	T	1,0000	1,0000	1,0000	0,9926	1,0000	0,9982
	CC	-	-	-	-	-	-
	CT	-	-	-	0,0147	-	0,0035
	TT	1,0000	1,0000	1,0000	0,9853	1,0000	0,9965
	$2n$	42	148	26	136	214	566
	p_{EHW}	-	-	-	-	-	-
	H_o	-	-	-	0,0147	-	0,0035
	H_s	-	-	-	0,0147	-	0,0035
+1645	A	0,0238	-	-	-	-	0,0018
	G	0,9762	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9982
	AA	-	-	-	-	-	-
	AG	0,0476	-	-	-	-	0,0035
	GG	0,9524	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9965
	$2n$	42	148	26	136	214	566
	p_{EHW}	-	-	-	-	-	-
	H_o	0,0476	-	-	-	-	0,0035
	H_s	0,0476	-	-	-	-	0,0035
+1654	A	0,0714	0,0203	0,0417	0,0441	0,0514	0,0426
	G	0,9286	0,9797	0,9583	0,9559	0,9486	0,9574
	AA	-	-	-	0,0147	0,0093	0,0071
	AG	0,1429	0,0405	0,0833	0,0588	0,0841	0,0709
	GG	0,8571	0,9595	0,9167	0,9265	0,9065	0,9220
	$2n$	42	148	24	136	214	564
	p_{EHW}	1,0000	1,0000	-	0,1086	0,2369	0,0813
	H_o	0,1429	0,0405	0,0833	0,0588	0,0841	0,0709
	H_s	0,1359	0,0400	0,0833	0,0850	0,0980	0,0816

Continuação

	SNP	Azuis	Verdes	Mel	Castanho Claros	Castanho Escuros	Total
+ 1 6 6 4	C	1,0000	0,9932	1,0000	1,0000	1,0000	0,9982
	T	-	0,0068	-	-	-	0,0018
	CC	1,0000	0,9865	1,0000	1,0000	1,0000	0,9965
	CT	-	0,0135	-	-	-	0,0035
	TT	-	-	-	-	-	-
	2n	42	148	26	136	214	566
	pEHW	-	-	-	-	-	-
	Ho	-	0,0135	-	-	-	0,0035
	Hs	-	0,0135	-	-	-	0,0035
+ 1 6 9 0	A	-	-	-	0,0147	-	0,0036
	G	1,0000	0,9932	1,0000	0,9853	0,9952	0,9929
	T	-	0,0068	-	-	0,0048	0,0036
	AA	-	-	-	-	-	-
	AG	-	-	-	0,0294	-	0,0071
	GG	1,0000	0,9863	1,0000	0,9706	0,9905	0,9857
	AT	-	-	-	-	-	-
	GT	-	0,0137	-	-	0,0095	0,0071
	TT	-	-	-	-	-	-
	2n	42	146	26	136	210	560
	pEHW	-	-	-	1,0000	-	1,0000
	Ho	-	0,0137	-	0,0294	0,0095	0,0143
	Hs	-	0,0137	-	0,0292	0,0095	0,0142
+ 1 6 9 8	A	-	-	-	-	0,0095	0,0036
	G	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9905	0,9964
	AA	-	-	-	-	-	-
	AG	-	-	-	-	0,0190	0,0071
	GG	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9810	0,9929
	2n	42	146	26	136	210	560
	pEHW	-	-	-	-	1,0000	1,0000
	Ho	-	-	-	-	0,0191	0,0071
	Hs	-	-	-	-	0,0190	0,0071
+ 1 8 0 5	A	-	0,0135	-	-	0,0047	0,0053
	G	1,0000	0,9865	1,0000	1,0000	0,9953	0,9947
	AA	-	-	-	-	-	-
	AG	-	0,0270	-	-	0,0093	0,0106
	GG	1,0000	0,9730	1,0000	1,0000	0,9907	0,9894
	2n	40	148	26	136	214	564
	pEHW	-	1,0000	-	-	-	1,0000
	Ho	-	0,0270	-	-	0,0094	0,0106
	Hs	-	0,0268	-	-	0,0094	0,0106

Continuação

	SNP	Azuis	Verdes	Mel	Castanho Claros	Castanho Escuros	Total
+ 1 8 3 1	C	1,0000	0,9797	1,0000	0,9627	0,9766	0,9768
	T	-	0,0203	-	0,0373	0,0234	0,0232
	CC	1,0000	0,9595	1,0000	0,9403	0,9533	0,9571
	CT	-	0,0405	-	0,0448	0,0467	0,0393
	TT	-	-	-	0,0149	-	0,0036
	2n	38	148	26	134	214	560
	pEHW	-	1,0000	-	0,0743	1,0000	0,1337
	Ho	-	0,0405	-	0,0448	0,0467	0,0393
	Hs	-	0,0400	-	0,0724	0,0459	0,0454
+ 1 8 4 4	C	-	0,0068	-	0,0075	-	0,0036
	T	1,0000	0,9932	1,0000	0,9925	1,0000	0,9964
	CC	-	-	-	-	-	-
	CT	-	0,0137	-	0,0149	-	0,0071
	TT	1,0000	0,9863	1,0000	0,9851	1,0000	0,9929
	2n	38	146	26	134	216	560
	pEHW	-	-	-	-	-	1,0000
	Ho	-	0,0137	-	0,0149	-	0,0071
	Hs	-	0,0137	-	0,0149	-	0,0071
+ 1 8 4 6	C	-	-	-	-	0,0185	0,0071
	G	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9815	0,9929
	CC	-	-	-	-	0,0185	0,0071
	CG	-	-	-	-	-	-
	GG	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9815	0,9929
	2n	38	146	26	134	216	560
	pEHW	-	-	-	-	0,0001	0,0000
	Ho	-	-	-	-	-	-
	Hs	-	-	-	-	0,0365	0,0142
+ 1 8 5 8	C	0,9250	0,9726	1,0000	0,9776	0,9861	0,9769
	T	0,0750	0,0274	-	0,0224	0,0139	0,0231
	CC	0,8500	0,9589	1,0000	0,9552	0,9722	0,9573
	CT	0,1500	0,0274	-	0,0448	0,0278	0,0391
	TT	-	0,0137	-	-	-	0,0036
	2n	40	146	26	134	216	562
	pEHW	1,0000	0,0412	-	1,0000	1,0000	0,1332
	Ho	0,1500	0,0274	-	0,0448	0,0278	0,0391
	Hs	0,1423	0,0537	-	0,0441	0,0275	0,0453
+ 1 8 6 8	A	0,1316	0,0411	0,0385	0,1119	0,1250	0,0964
	G	0,8684	0,9589	0,9615	0,8881	0,8750	0,9036
	AA	0,1053	-	-	-	0,0833	0,0393
	AG	0,0526	0,0822	0,0769	0,2239	0,0833	0,1143
	GG	0,8421	0,9178	0,9231	0,7761	0,8333	0,8464
	2n	38	146	26	134	216	560
	pEHW	0,0116	1,0000	-	1,0000	0,0000	0,0000
	Ho	0,0526	0,0822	0,0769	0,2239	0,0833	0,1143
	Hs	0,2347	0,0794	0,0769	0,2003	0,2198	0,1746

Continuação

	SNP	Azuis	Verdes	Mel	Castanho Claros	Castanho Escuros	Total
+ 1 8 7 7	C	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9954	0,9982
	G	-	-	-	-	0,0046	0,0018
	CC	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9907	0,9964
	CG	-	-	-	-	0,0093	0,0036
	GG	-	-	-	-	-	-
	2n	38	146	26	134	216	560
	pEHW	-	-	-	-	-	-
	Ho	-	-	-	-	0,0093	0,0036
	Hs	-	-	-	-	0,0093	0,0036
+ 1 9 6 6	C	-	-	-	0,0149	0,0093	0,0071
	T	1,0000	1,0000	1,0000	0,9851	0,9907	0,9929
	CC	-	-	-	0,0149	0,0093	0,0071
	CT	-	-	-	-	-	-
	TT	1,0000	1,0000	1,0000	0,9851	0,9907	0,9929
	2n	40	148	26	134	214	562
	pEHW	-	-	-	0,0075	0,0047	0,0000
	Ho	-	-	-	-	-	-
	Hs	-	-	-	0,0296	0,0186	0,0142
+ 2 0 1 3	A	-	-	-	-	0,0047	0,0018
	G	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9953	0,9982
	AA	-	-	-	-	-	-
	AG	-	-	-	-	0,0094	0,0036
	GG	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9906	0,9964
	2n	40	148	24	134	212	558
	pEHW	-	-	-	-	-	-
	Ho	-	-	-	-	0,0094	0,0036
	Hs	-	-	-	-	0,0094	0,0036
+ 2 0 9 7	C	1,0000	1,0000	1,0000	0,9926	0,9811	0,9911
	T	-	-	-	0,0074	0,0189	0,0089
	CC	1,0000	1,0000	1,0000	0,9853	0,9623	0,9821
	CT	-	-	-	0,0147	0,0377	0,0179
	TT	-	-	-	-	-	-
	2n	40	148	24	136	212	560
	pEHW	-	-	-	-	1,0000	1,0000
	Ho	-	-	-	0,0147	0,0377	0,0179
	Hs	-	-	-	0,0147	0,0372	0,0177
+ 2 2 6 0	C	0,0250	0,0139	0,0385	0,0373	0,0187	0,0233
	G	0,9750	0,9861	0,9615	0,9627	0,9813	0,9767
	CC	-	-	-	-	-	-
	CG	0,0500	0,0278	0,0769	0,0746	0,0374	0,0466
	GG	0,9500	0,9722	0,9231	0,9254	0,9626	0,9534
	2n	40	144	26	134	214	558
	pEHW	-	1,0000	-	1,0000	1,0000	1,0000
	Ho	0,0500	0,0278	0,0769	0,0746	0,0374	0,0466
	Hs	0,0500	0,0276	0,0769	0,0724	0,0369	0,0456

Continuação

	SNP	Azuis	Verdes	Mel	Castanho Claros	Castanho Escuros	Total
+ 2 2 8 0	C	0,9750	0,9932	1,0000	0,9853	0,9769	0,9841
	T	0,0250	0,0068	-	0,0147	0,0231	0,0159
	CC	0,9500	0,9865	1,0000	0,9706	0,9537	0,9682
	CT	0,0500	0,0135	-	0,0294	0,0463	0,0318
	TT	-	-	-	-	-	-
	2n	40	148	26	136	216	566
	pEHW	-	-	-	1,0000	1,0000	1,0000
	Ho	0,0500	0,0135	-	0,0294	0,0463	0,0318
	Hs	0,0500	0,0135	-	0,0292	0,0454	0,0314
+ 2 3 2 2	A	0,8750	0,9189	0,8846	0,8529	0,8178	0,8599
	G	0,1250	0,0811	0,1154	0,1471	0,1822	0,1401
	AA	0,7500	0,8514	0,7692	0,7206	0,6729	0,7411
	AG	0,2500	0,1351	0,2308	0,2647	0,2897	0,2376
	GG	-	0,0135	-	0,0147	0,0374	0,0213
	2n	40	148	26	136	214	564
	pEHW	1,0000	0,3837	1,0000	1,0000	0,7472	0,8017
	Ho	0,2500	0,1351	0,2308	0,2647	0,2897	0,2376
	Hs	0,2244	0,1500	0,2123	0,2527	0,2995	0,2413
+ 2 3 4 6	A	-	-	-	0,0159	0,0429	0,0202
	G	1,0000	1,0000	1,0000	0,9841	0,9571	0,9798
	AA	-	-	-	-	-	-
	AG	-	-	-	0,0317	0,0857	0,0404
	GG	1,0000	1,0000	1,0000	0,9683	0,9143	0,9596
	2n	38	144	26	126	210	544
	pEHW	-	-	-	1,0000	1,0000	1,0000
	Ho	-	-	-	0,0318	0,0857	0,0404
	Hs	-	-	-	0,0315	0,0824	0,0397

Frequências Alélicas e Genotípicas relativas, distribuídas em categorias segundo a cor da **pele** (pEHW – significância do Equilíbrio de Hardy-Weinberg/ *Ho* – Heterozigose Observada/ *Hs* – Heterozigose Esperada)

	SNP	Clara	Média	Escura	Total
+ 1 5 5 8	G	0,8810	0,8883	0,9878	0,8989
	T	0,1190	0,1117	0,0122	0,1011
	GG	0,7959	0,7872	0,9756	0,8191
	GT	0,1701	0,2021	0,0244	0,1596
	TT	0,0340	0,0106	-	0,0213
	2n	294	188	82	564
	pEHW	0,0337	1,0000	-	0,049
	Ho	0,1701	0,2021	0,0244	0,1596
	Hs	0,2105	0,1995	0,0244	0,1820
+ 1 5 8 0	A	0,0034	-	-	0,0018
	G	0,9966	1,0000	1,0000	0,9982
	AA	-	-	-	-
	AG	0,0068	-	-	0,0035
	GG	0,9932	1,0000	1,0000	0,9965
	2n	296	188	82	566
	pEHW	-	-	-	-
	Ho	0,0068	-	-	0,0035
	Hs	0,0068	-	-	0,0035
+ 1 6 2 7	C	0,0034	-	-	0,0018
	T	0,9966	1,0000	1,0000	0,9982
	CC	-	-	-	-
	CT	0,0068	-	-	0,0035
	TT	0,9932	1,0000	1,0000	0,9965
	2n	296	188	82	566
	pEHW	-	-	-	-
	Ho	0,0068	-	-	0,0035
	Hs	0,0068	-	-	0,0035
+ 1 6 4 5	A	0,0034	-	-	0,0018
	G	0,9966	1,0000	1,0000	0,9982
	AA	-	-	-	-
	AG	0,0068	-	-	0,0035
	GG	0,9932	1,0000	1,0000	0,9965
	2n	296	188	82	566
	pEHW	-	-	-	-
	Ho	0,0068	-	-	0,0035
	Hs	0,0068	-	-	0,0035
+ 1 6 5 4	A	0,0578	0,0372	-	0,0426
	G	0,9422	0,9628	1,0000	0,9574
	AA	0,0136	-	-	0,0071
	AG	0,0884	0,0745	-	0,0709
	GG	0,8980	0,9255	1,0000	0,9220
	2n	294	188	82	564
	pEHW	0,0697	1,0000	-	0,0813
	Ho	0,0884	0,0745	-	0,0709
	Hs	0,1093	0,0721	-	0,0816

Continuação

	SNP	Clara	Média	Escura	Total
+ 1 6 6 4	C	0,9966	1,0000	1,0000	0,9982
	T	0,0034	-	-	0,0018
	CC	0,9932	1,0000	1,0000	0,9965
	CT	0,0068	-	-	0,0035
	TT	-	-	-	-
	2n	296	188	82	566
	pEHW	-	-	-	-
	Ho	0,0068	-	-	0,0035
	Hs	0,0068	-	-	0,0035
+ 1 6 9 0 T	A	0,0034	0,0054	-	0,0036
	G	0,9966	0,9892	0,9875	0,9929
	T	-	0,0054	0,0125	0,0036
	AA	-	-	-	-
	AG	0,0068	0,01075	-	0,0071
	GG	0,9932	0,9785	0,9750	0,9857
	AT	-	-	-	-
	GT	-	0,01075	0,0250	0,0071
	TT	-	-	-	-
	2n	294	186	80	560
	pEHW	-	1,0000	-	1,0000
	Ho	0,0068	0,0215	0,0250	0,0143
	Hs	0,0068	0,0215	0,0250	0,0142
+ 1 6 9 8	A	0,0034	-	0,0125	0,0036
	G	0,9966	1,0000	0,9875	0,9964
	AA	-	-	-	-
	AG	0,0068	-	0,0250	0,0071
	GG	0,9932	1,0000	0,9750	0,9929
	2n	294	186	80	560
	pEHW	-	-	-	1,0000
	Ho	0,0068	-	0,0250	0,0071
	Hs	0,0068	-	0,0250	0,0071
+ 1 8 0 5	A	0,0068	0,0053	-	0,0053
	G	0,9932	0,9947	1,0000	0,9947
	AA	-	-	-	-
	AG	0,0136	0,0106	-	0,0106
	GG	0,9864	0,9894	1,0000	0,9894
	2n	294	188	82	564
	pEHW	1,0000	-	-	1,0000
	Ho	0,0136	0,0106	-	0,0106
	Hs	0,0136	0,0106	-	0,0106

Continuação

	SNP	Clara	Média	Escura	Total
+ 1 8 3 1	C	0,9692	0,9946	0,9634	0,9768
	T	0,0308	0,0054	0,0366	0,0232
	CC	0,9452	0,9892	0,9268	0,9571
	CT	0,0480	0,0108	0,0732	0,0393
	TT	0,0068	-	-	0,0036
	2n	292	186	82	560
	pEHW	0,1193	-	1,0000	0,1337
	Ho	0,0480	0,0108	0,0732	0,0393
	Hs	0,0600	0,0108	0,0714	0,0454
+ 1 8 4 4	C	0,0069	-	-	0,0036
	T	0,9931	1,0000	1,0000	0,9964
	CC	-	-	-	-
	CT	0,0138	-	-	0,0071
	TT	0,9862	1,0000	1,0000	0,9929
	2n	290	188	82	560
	pEHW	1,0000	-	-	1,0000
	Ho	0,0138	-	-	0,0071
	Hs	0,0138	-	-	0,0071
+ 1 8 4 6	C	-	0,0213	-	0,0071
	G	1,0000	0,9787	1,0000	0,9929
	CC	-	0,0213	-	0,0071
	CG	-	-	-	-
	GG	1,0000	0,9787	1,0000	0,9929
	2n	290	188	82	560
	pEHW	-	0,0001	-	0,0000
	Ho	-	-	-	-
	Hs	-	0,0419	-	0,0142
+ 1 8 5 8	C	0,9658	0,9840	1,0000	0,9769
	T	0,0342	0,0160	-	0,0231
	CC	0,9384	0,9681	1,0000	0,9573
	CT	0,0548	0,0319	-	0,0391
	TT	0,0068	-	-	0,0036
	2n	292	188	82	562
	pEHW	0,1473	1,0000	-	0,1332
	Ho	0,0548	0,0319	-	0,0391
	Hs	0,0664	0,0316	-	0,0453
+ 1 8 6 8	A	0,1034	0,1011	0,0610	0,0964
	G	0,8966	0,8989	0,9390	0,9036
	AA	0,0483	0,0426	-	0,0393
	AG	0,1103	0,1170	0,1220	0,1143
	GG	0,8414	0,8404	0,8780	0,8464
	2n	290	188	82	560
	pEHW	0,0001	0,0054	1,0000	0,0000
	Ho	0,1103	0,1170	0,1220	0,1143
	Hs	0,1861	0,1827	0,1159	0,1746

Continuação

	SNP	Clara	Média	Escura	Total
+ 1 8 7 7	C	1,0000	0,9947	1,0000	0,9982
	G	-	0,0053	-	0,0018
	CC	1,0000	0,9894	1,0000	0,9964
	CG	-	0,0106	-	0,0036
	GG	-	-	-	-
	2n	290	188	82	560
	pEHW	-	-	-	-
	Ho	-	0,0106	-	0,0036
	Hs	-	0,0106	-	0,0036
+ 1 9 6 6	C	0,0069	1,0000	0,0244	0,0071
	T	0,9931	-	0,9756	0,9929
	CC	0,0069	1,0000	0,0244	0,0071
	CT	-	-	-	-
	TT	0,9931	-	0,9756	0,9929
	2n	290	190	82	562
	pEHW	0,0035	-	0,0123	0,0000
	Ho	-	-	-	-
	Hs	0,0138	-	0,0482	0,0142
+ 2 0 1 3	A	-	-	0,0125	0,0018
	G	1,0000	1,0000	0,9875	0,9982
	AA	-	-	-	-
	AG	-	-	0,0250	0,0036
	GG	1,0000	1,0000	0,9750	0,9964
	2n	288	190	80	558
	pEHW	-	-	-	-
	Ho	-	-	0,0250	0,0036
	Hs	-	-	0,0250	0,0036
+ 2 0 9 7	C	1,0000	0,9842	0,9750	0,9911
	T	-	0,0158	0,0250	0,0089
	CC	1,0000	0,9684	0,9500	0,9821
	CT	-	0,0316	0,0500	0,0179
	TT	-	-	-	-
	2n	290	190	80	560
	pEHW	-	1,0000	1,0000	1,0000
	Ho	-	0,0316	0,0500	0,0179
	Hs	-	0,0312	0,0494	0,0177
+ 2 2 6 0	C	0,0274	0,0215	0,0125	0,0233
	G	0,9726	0,9785	0,9875	0,9767
	CC	-	-	-	-
	CG	0,0548	0,0430	0,0250	0,0466
	GG	0,9452	0,9570	0,9750	0,9534
	2n	292	186	80	558
	pEHW	1,0000	1,0000	-	1,0000
	Ho	0,0548	0,0430	0,0250	0,0466
	Hs	0,0535	0,0423	0,0250	0,0456

Continuação

	SNP	Clara	Média	Escura	Total
+ 2 2 8 0	C	0,9898	0,9842	0,9634	0,9841
	T	0,0102	0,0158	0,0366	0,0159
	CC	0,9796	0,9684	0,9268	0,9682
	CT	0,0204	0,0316	0,0732	0,0318
	TT	-	-	-	-
	2n	294	190	82	566
	pEHW	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	Ho	0,0204	0,0316	0,0732	0,0318
	Hs	0,0203	0,0312	0,0714	0,0314
+ 2 3 2 2	A	0,8878	0,8723	0,7317	0,8599
	G	0,1122	0,1277	0,2683	0,1401
	AA	0,7959	0,7447	0,5366	0,7411
	AG	0,1837	0,2553	0,3902	0,2376
	GG	0,0204	-	0,0732	0,0213
	2n	294	188	82	564
	pEHW	0,3929	0,3495	1,0000	0,8017
	Ho	0,1837	0,2553	0,3902	0,2376
	Hs	0,2000	0,2239	0,3975	0,2413
+ 2 3 4 6	A	0,0071	0,0056	0,0976	0,0202
	G	0,9929	0,9944	0,9024	0,9798
	AA	-	-	-	-
	AG	0,0142	0,0111	0,1951	0,0404
	GG	0,9858	0,9889	0,8049	0,9596
	2n	282	180	82	544
	pEHW	1,0000	-	1,0000	1,0000
	Ho	0,0142	0,0111	0,1951	0,0404
	Hs	0,0141	0,0111	0,1783	0,0397

Frequências Alélicas e Genotípicas relativas, distribuídas em categorias segundo a cor dos **cabelos** (*p*EHW – significância do Equilíbrio de Hardy-Weinberg/ *H_o* – Heterozigose Observada/ *H_s* – Heterozigose Esperada)

	SNP	Ruivos	Loiros	Castanhos	Pretos	Total
+ 1 5 5 8	G	1,0000	0,8939	0,8562	0,9583	0,8989
	T	-	0,1061	0,1438	0,0417	0,1011
	GG	1,0000	0,8485	0,7397	0,9167	0,8191
	GT	-	0,0909	0,2329	0,0833	0,1596
	TT	-	0,0606	0,0274	-	0,0213
	2 <i>n</i>	14	66	292	192	564
	<i>p</i> EHW	-	0,0248	0,4999	1,0000	0,049
	<i>H_o</i>	-	0,0909	0,2329	0,0833	0,1596
	<i>H_s</i>	-	0,1925	0,2471	0,0803	0,1820
+ 1 5 8 0	A	-	-	-	0,0052	0,0018
	G	1,0000	1,0000	1,0000	0,9948	0,9982
	AA	-	-	-	-	-
	AG	-	-	-	0,0104	0,0035
	GG	1,0000	1,0000	1,0000	0,9896	0,9965
	2 <i>n</i>	14	66	294	192	566
	<i>p</i> EHW	-	-	-	-	-
	<i>H_o</i>	-	-	-	0,0104	0,0035
	<i>H_s</i>	-	-	-	0,0104	0,0035
+ 1 6 2 7	C	-	-	0,0034	-	0,0018
	T	1,0000	1,0000	0,9966	1,0000	0,9982
	CC	-	-	-	-	-
	CT	-	-	0,0068	-	0,0035
	TT	1,0000	1,0000	0,9932	1,0000	0,9965
	2 <i>n</i>	14	66	294	192	566
	<i>p</i> EHW	-	-	-	-	-
	<i>H_o</i>	-	-	0,0068	-	0,0035
	<i>H_s</i>	-	-	0,0068	-	0,0035
+ 1 6 4 5	A	0,0714	-	-	-	0,0018
	G	0,9286	1,0000	1,0000	1,0000	0,9982
	AA	-	-	-	-	-
	AG	0,1429	-	-	-	0,0035
	GG	0,8571	1,0000	1,0000	1,0000	0,9965
	2 <i>n</i>	14	66	294	192	566
	<i>p</i> EHW	-	-	-	-	-
	<i>H_o</i>	0,1429	-	-	-	0,0035
	<i>H_s</i>	0,1429	-	-	-	0,0035
+ 1 6 5 4	A	-	0,0758	0,0308	0,0521	0,0426
	G	1,0000	0,9242	0,9692	0,9479	0,9574
	AA	-	-	0,0068	0,0104	0,0071
	AG	-	0,1515	0,0480	0,0833	0,0709
	GG	1,0000	0,8485	0,9452	0,9063	0,9220
	2 <i>n</i>	14	66	292	192	564
	<i>p</i> EHW	-	1,0000	0,1193	0,2186	0,0813
	<i>H_o</i>	-	0,1515	0,0480	0,0833	0,0709
	<i>H_s</i>	-	0,1422	0,0600	0,0993	0,0816

Continuação

	SNP	Ruivos	Loiros	Castanhos	Pretos	Total
+ 1 6 6 4	C	1,0000	1,0000	0,9966	1,0000	0,9982
	T	-	-	0,0034	-	0,0018
	CC	1,0000	1,0000	0,9932	1,0000	0,9965
	CT	-	-	0,0068	-	0,0035
	TT	-	-	-	-	-
	2n	14	66	294	192	566
	pEHW	-	-	-	-	-
	Ho	-	-	0,0068	-	0,0035
	Hs	-	-	0,0068	-	0,0035
+ 1 6 9 0 T	A	-	-	0,0068	-	0,0036
	G	1,0000	1,0000	0,9898	0,9947	0,9929
	T	-	-	0,0034	0,0053	0,0036
	AA	-	-	-	-	-
	AG	-	-	0,0136	-	0,0071
	GG	1,0000	1,0000	0,9796	0,9894	0,9857
	AT	-	-	-	-	-
	GT	-	-	0,0068	0,0106	0,0071
	TT	-	-	-	-	-
	2n	14	64	294	188	560
	pEHW	-	-	1,0000	-	1,0000
	Ho	-	-	0,0204	0,0106	0,0143
	Hs	-	-	0,0203	0,0106	0,0142
+ 1 6 9 8	A	-	-	0,0034	0,0053	0,0036
	G	1,0000	1,0000	0,9966	0,9947	0,9964
	AA	-	-	-	-	-
	AG	-	-	0,0068	0,0106	0,0071
	GG	1,0000	1,0000	0,9932	0,9894	0,9929
	2n	14	64	294	188	560
	pEHW	-	-	-	-	1,0000
	Ho	-	-	0,0068	0,0106	0,0071
	Hs	-	-	0,0068	0,0106	0,0071
+ 1 8 0 5	A	-	0,0152	0,0034	0,0053	0,0053
	G	1,0000	0,9848	0,9966	0,9947	0,9947
	AA	-	-	-	-	-
	AG	-	0,0303	0,0068	0,0105	0,0106
	GG	1,0000	0,9697	0,9932	0,9895	0,9894
	2n	14	66	294	190	564
	pEHW	-	-	-	-	1,0000
	Ho	-	0,0303	0,0068	0,0105	0,0106
	Hs	-	0,0303	0,0068	0,0105	0,0106

Continuação

	SNP	Ruivos	Loiros	Castanhos	Pretos	Total
+ 1 8 3 1	C	0,7143	0,9848	0,9897	0,9734	0,9768
	T	0,2857	0,0152	0,0103	0,0266	0,0232
	CC	0,5714	0,9697	0,9795	0,9468	0,9571
	CT	0,2857	0,0303	0,0205	0,0532	0,0393
	TT	0,1429	-	-	-	0,0036
	2n	14	66	292	188	560
	pEHW	0,4406	-	1,0000	1,0000	0,1337
	Ho	0,2857	0,0303	0,0206	0,0532	0,0393
	Hs	0,4396	0,0303	0,0204	0,0521	0,0454
+ 1 8 4 4	C	-	0,0152	0,0034	-	0,0036
	T	1,0000	0,9848	0,9966	1,0000	0,9964
	CC	-	-	-	-	-
	CT	-	0,0303	0,0069	-	0,0071
	TT	1,0000	0,9697	0,9931	1,0000	0,9929
	2n	14	66	290	190	560
	pEHW	-	-	-	-	1,0000
	Ho	-	0,0303	0,0069	-	0,0071
	Hs	-	0,0303	0,0069	-	0,0071
+ 1 8 4 6	C	-	-	0,0069	0,0105	0,0071
	G	1,0000	1,0000	0,9931	0,9895	0,9929
	CC	-	-	0,0069	0,0105	0,0071
	CG	-	-	-	-	-
	GG	1,0000	1,0000	0,9931	0,9895	0,9929
	2n	14	66	290	190	560
	pEHW	-	-	0,0035	0,0053	0,0000
	Ho	-	-	-	-	-
	Hs	-	-	0,0138	0,0209	0,0142
+ 1 8 5 8	C	0,8571	0,9394	0,9795	0,9947	0,9769
	T	0,1429	0,0606	0,0205	0,0053	0,0231
	CC	0,7143	0,9091	0,9589	0,9895	0,9573
	CT	0,2857	0,0606	0,0411	0,0105	0,0391
	TT	-	0,0303	-	-	0,0036
	2n	14	66	292	190	562
	pEHW	1,0000	0,0916	1,0000	-	0,1332
	Ho	0,2857	0,0606	0,0411	0,0105	0,0391
	Hs	0,2637	0,1156	0,0404	0,0105	0,0453
+ 1 8 6 8	A	-	0,0625	0,0788	0,1421	0,0964
	G	1,0000	0,9375	0,9212	0,8579	0,9036
	AA	-	-	0,0274	0,0737	0,0393
	AG	-	0,1250	0,1027	0,1368	0,1143
	GG	1,0000	0,8750	0,8699	0,7895	0,8464
	2n	14	64	292	190	560
	pEHW	-	1,0000	0,0055	0,0003	0,0000
	Ho	-	0,1250	0,1027	0,1368	0,1143
	Hs	-	0,1191	0,1456	0,2451	0,1746

Continuação

	SNP	Ruivos	Loiros	Castanhos	Pretos	Total
+ 1 8 7 7	C	1,0000	1,0000	0,9966	1,0000	0,9982
	G	-	-	0,0034	-	0,0018
	CC	1,0000	1,0000	0,9932	1,0000	0,9964
	CG	-	-	0,0068	-	0,0036
	GG	-	-	-	-	-
	2n	14	64	292	190	560
	pEHW	-	-	-	-	-
	Ho	-	-	0,0068	-	0,0036
	Hs	-	-	0,0069	-	0,0036
+ 1 9 6 6	C	1,0000	1,0000	0,0068	0,0104	0,0071
	T	-	-	0,9932	0,9896	0,9929
	CC	1,0000	1,0000	0,0068	0,0104	0,0071
	CT	-	-	-	-	-
	TT	-	-	0,9932	0,9896	0,9929
	2n	12	66	292		562
	pEHW	-	-	0,0034	0,0052	0,0000
	Ho	-	-	-	-	-
	Hs	-	-	0,0137	0,0207	0,0142
+ 2 0 1 3	A	-	-	-	0,0053	0,0018
	G	1,0000	1,0000	1,0000	0,9947	0,9982
	AA	-	-	-	-	-
	AG	-	-	-	0,0106	0,0036
	GG	1,0000	1,0000	1,0000	0,9894	0,9964
	2n	12	66	292	188	558
	pEHW	-	-	-	-	-
	Ho	-	-	-	0,0106	0,0036
	Hs	-	-	-	0,0106	0,0036
+ 2 0 9 7	C	1,0000	1,0000	0,9966	0,9787	0,9911
	T	-	-	0,0034	0,0213	0,0089
	CC	1,0000	1,0000	0,9931	0,9574	0,9821
	CT	-	-	0,0069	0,0426	0,0179
	TT	-	-	-	-	-
	2n	14	66	292	188	560
	pEHW	-	-	-	1,0000	1,0000
	Ho	-	-	0,0069	0,0426	0,0179
	Hs	-	-	0,0069	0,0419	0,0177
+ 2 2 6 0	C	0,2143	-	0,0310	0,0053	0,0233
	G	0,7857	1,0000	0,9690	0,9947	0,9767
	CC	-	-	-	-	-
	CG	0,4286	-	0,0621	0,0106	0,0466
	GG	0,5714	1,0000	0,9379	0,9894	0,9534
	2n	14	66	290	188	558
	pEHW	1,0000	-	1,0000	-	1,0000
	Ho	0,4286	-	0,0621	0,0106	0,0466
	Hs	0,3626	-	0,0604	0,0106	0,0456

Continuação

	SNP	Ruivos	Loiros	Castanhos	Pretos	Total
+ 2 2 8 0	C	1,0000	1,0000	0,9864	0,9740	0,9841
	T	-	-	0,0136	0,0260	0,0159
	CC	1,0000	1,0000	0,9728	0,9479	0,9682
	CT	-	-	0,0272	0,0521	0,0318
	TT	-	-	-	-	-
	2n	14	66	294	192	566
	pEHW	-	-	1,0000	1,0000	1,0000
	Ho	-	-	0,0272	0,0521	0,0318
	Hs	-	-	0,0269	0,0510	0,0314
+ 2 3 2 2	A	1,0000	0,8636	0,9041	0,7813	0,8599
	G	-	0,1364	0,0959	0,2188	0,1401
	AA	1,0000	0,7273	0,8151	0,6146	0,7411
	AG	-	0,2727	0,1781	0,3333	0,2376
	GG	-	-	0,0068	0,0521	0,0213
	2n	14	66	292	192	564
	pEHW	-	1,0000	1,0000	0,7687	0,8017
	Ho	-	0,2727	0,1781	0,3333	0,2376
	Hs	-	0,2392	0,1740	0,3436	0,2413
+ 2 3 4 6	A	0,0714	-	0,0035	0,0479	0,0202
	G	0,9286	1,0000	0,9965	0,9521	0,9798
	AA	-	-	-	-	-
	AG	0,1429	-	0,0071	0,0957	0,0404
	GG	0,8571	1,0000	0,9929	0,9043	0,9596
	2n	14	60	282	188	544
	pEHW	-	-	-	1,0000	1,0000
	Ho	0,1429	-	0,0071	0,0957	0,0404
	Hs	0,1429	-	0,0071	0,0917	0,0397

Frequências Alélicas e Genotípicas relativas, distribuídas em categorias segundo a ocorrência de sardas (p_{EHW} – significância do Equilíbrio de Hardy-Weinberg/ H_o – Heterozigose Observada/ H_s – Heterozigose Esperada)

	SNP	Presença	Ausência	Total
+ 1 5 5 8	G	0,8295	0,9118	0,8989
	T	0,1705	0,0882	0,1011
	GG	0,7273	0,8361	0,8191
	GT	0,2045	0,1513	0,1596
	TT	0,0682	0,0126	0,0213
	2n	88	476	564
	p_{EHW}	0,0857	0,4039	0,049
	H_o	0,2045	0,1513	0,1596
	H_s	0,2861	0,1612	0,1820
+ 1 5 8 0	A	0,0114	-	0,0018
	G	0,9886	1,0000	0,9982
	AA	-	-	-
	AG	0,0227	-	0,0035
	GG	0,9773	1,0000	0,9965
	2n	88	478	566
	p_{EHW}	-	-	-
	H_o	0,0227	-	0,0035
	H_s	0,0227	-	0,0035
+ 1 6 2 7	C	0,0114	-	0,0018
	T	0,9886	1,0000	0,9982
	CC	-	-	-
	CT	0,0227	-	0,0035
	TT	0,9773	1,0000	0,9965
	2n	88	478	566
	p_{EHW}	-	-	-
	H_o	0,0227	-	0,0035
	H_s	0,0227	-	0,0035
+ 1 6 4 5	A	-	0,0021	0,0018
	G	1,0000	0,9979	0,9982
	AA	-	-	-
	AG	-	0,0042	0,0035
	GG	1,0000	0,9958	0,9965
	2n	88	478	566
	p_{EHW}	-	-	-
	H_o	-	0,0042	0,0035
	H_s	-	0,0042	0,0035
+ 1 6 5 4	A	0,0795	0,0357	0,0426
	G	0,9205	0,9643	0,9574
	AA	0,0227	0,0042	0,0071
	AG	0,1136	0,0630	0,0709
	GG	0,8636	0,9328	0,9220
	2n	88	476	564
	p_{EHW}	0,2274	0,2562	0,0813
	H_o	0,1136	0,0630	0,0709
	H_s	0,1481	0,0690	0,0816

	SNP	Presença	Ausência	Total
+ 1 6 6 4	C	1,0000	0,9979	0,9982
	T	-	0,0021	0,0018
	CC	1,0000	0,9958	0,9965
	CT	-	0,0042	0,0035
	TT	-	-	-
	2n	88	478	566
	p_{EHW}	-	-	-
	H_o	-	0,0042	0,0035
	H_s	-	0,0042	0,0035
+ 1 6 9 0 T	A	-	0,0042	0,0036
	G	1,0000	0,9916	0,9929
	T	-	0,0042	0,0036
	AA	-	-	-
	AG	-	0,00845	0,0071
	GG	1,0000	0,9831	0,9857
	AT	-	-	-
	GT	-	0,00845	0,0071
	TT	-	-	-
	2n	86	474	560
	p_{EHW}	-	1,0000	1,0000
	H_o	-	0,0169	0,0143
	H_s	-	0,0168	0,0142
+ 1 6 9 8	A	0,0116	0,0021	0,0036
	G	0,9884	0,9979	0,9964
	AA	-	-	-
	AG	0,0233	0,0042	0,0071
	GG	0,9767	0,9958	0,9929
	2n	88	474	560
	p_{EHW}	-	-	1,0000
	H_o	0,0233	0,0042	0,0071
	H_s	0,0233	0,0042	0,0071
+ 1 8 0 5	A	0,0114	0,0042	0,0053
	G	0,9886	0,9958	0,9947
	AA	-	-	-
	AG	0,0227	0,0084	0,0106
	GG	0,9773	0,9916	0,9894
	2n	88	476	564
	p_{EHW}	-	1,0000	1,0000
	H_o	0,0227	0,0084	0,0106
	H_s	0,0227	0,0084	0,0106

Continuação

	SNP	Presença	Ausência	Total
+ 1 8 3 1	C	0,9432	0,9831	0,9768
	T	0,0568	0,0169	0,0232
	CC	0,9091	0,9661	0,9571
	CT	0,0682	0,0339	0,0393
	TT	0,0227	-	0,0036
	2n	88	472	560
	pEHW	0,1129	1,0000	0,1337
	Ho	0,0682	0,0339	0,0393
	Hs	0,1084	0,0334	0,0454
+ 1 8 4 4	C	-	0,0042	0,0036
	T	1,0000	0,9958	0,9964
	CC	-	-	-
	CT	-	0,0085	0,0071
	TT	1,0000	0,9915	0,9929
	2n	88	472	560
	pEHW	-	1,0000	1,0000
	Ho	-	0,0085	0,0071
	Hs	-	0,0085	0,0071
+ 1 8 4 6	C	-	0,0085	0,0071
	G	1,0000	0,9915	0,9929
	CC	-	0,0085	0,0071
	CG	-	-	-
	GG	1,0000	0,9915	0,9929
	2n	88	472	560
	pEHW	-	0,0000	0,0000
	Ho	-	-	-
	Hs	-	0,0168	0,0142
+ 1 8 5 8	C	0,9318	0,9852	0,9769
	T	0,0682	0,0148	0,0231
	CC	0,8864	0,9705	0,9573
	CT	0,0909	0,0295	0,0391
	TT	0,0227	-	0,0036
	2n	88	474	562
	pEHW	0,1664	1,0000	0,1332
	Ho	0,0909	0,0295	0,0391
	Hs	0,1285	0,0292	0,0453
+ 1 8 6 8	A	0,1477	0,0869	0,0964
	G	0,8523	0,9131	0,9036
	AA	0,0909	0,0297	0,0393
	AG	0,1136	0,1144	0,1143
	GG	0,7955	0,8559	0,8464
	2n	88	472	560
	pEHW	0,0024	0,0005	0,0000
	Ho	0,1136	0,1144	0,1143
	Hs	0,25	0,16	0,1746

	SNP	Presença	Ausência	Total
+ 1 8 7	C	1,0000	0,9979	0,9982
	G	-	0,0021	0,0018
	CC	1,0000	0,9958	0,9964
	CG	-	0,0042	0,0036
	GG	-	-	-
	2n	88	472	560
	pEHW	-	-	-
	Ho	-	0,0042	0,0036
	Hs	-	0,0042	0,0036
+ 1 9 6 6	C	0,0233	0,0042	0,0071
	T	0,9767	0,9958	0,9929
	CC	0,0233	0,0042	0,0071
	CT	-	-	-
	TT	0,9767	0,9958	0,9929
	2n	86	476	562
	pEHW	0,0118	0,0021	0,0000
	Ho	-	-	-
	Hs	0,0460	0,0084	0,0142
+ 2 0 1 3	A	-	0,0021	0,0018
	G	1,0000	0,9979	0,9982
	AA	-	-	-
	AG	-	0,0042	0,0036
	GG	1,0000	0,9958	0,9964
	2n	86	472	558
	pEHW	-	-	-
	Ho	-	0,0042	0,0036
	Hs	-	0,0042	0,0036
+ 2 0 9 7	C	1,0000	0,9894	0,9911
	T	-	0,0106	0,0089
	CC	1,0000	0,9788	0,9821
	CT	-	0,0212	0,0179
	TT	-	-	-
	2n	88	472	560
	pEHW	-	1,0000	1,0000
	Ho	-	0,0212	0,0179
	Hs	-	0,0210	0,0177
+ 2 2 6 0	C	0,0227	0,0234	0,0233
	G	0,9773	0,9766	0,9767
	CC	-	-	-
	CG	0,0455	0,0468	0,0466
	GG	0,9545	0,9532	0,9534
	2n	88	470	558
	pEHW	1,0000	1,0000	1,0000
	Ho	0,0455	0,0468	0,0466
	Hs	0,0449	0,0458	0,0456

Continuação

	SNP	Presença	Ausência	Total
+ 2 2 8 0	C	0,9886	0,9833	0,9841
	T	0,0114	0,0167	0,0159
	CC	0,9773	0,9665	0,9682
	CT	0,0227	0,0335	0,0318
	TT	-	-	-
	2n	88	478	566
	pEHW	-	1,0000	1,0000
	Ho	0,0227	0,0335	0,0318
	Hs	0,0227	0,0330	0,0314
+ 2 3 2 2	A	0,8864	0,8550	0,8599
	G	0,1136	0,1450	0,1401
	AA	0,7955	0,7311	0,7411
	AG	0,1818	0,2479	0,2376
	GG	0,0227	0,0210	0,0213
	2n	88	476	564
	pEHW	0,4371	1,0000	0,8017
	Ho	0,1818	0,2479	0,2376
	Hs	0,2038	0,2484	0,2413
+ 2 3 4 6	A	0,0122	0,0216	0,0202
	G	0,9878	0,9784	0,9798
	AA	-	-	-
	AG	0,0244	0,0433	0,0404
	GG	0,9756	0,9567	0,9596
	2n	82	462	544
	pEHW	-	1,0000	1,0000
	Ho	0,0244	0,0433	0,0404
	Hs	0,0244	0,0424	0,0397