FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FELÍCIA DE ARAÚJO LIMA

Estudos de associação de genes de pigmentação com cor da pele, cabelo e olhos para fenotipagem forense em amostra brasileira

São Paulo
2017

FELÍCIA DE ARAÚJO LIMA

Estudos de associação de genes de pigmentação com cor da pele, cabelo e olhos para fenotipagem forense em amostra brasileira

Versão Corrigida

A versão original se encontra disponível na FMUSP

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

Área de Concentração: Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Cintia Fridman Rave

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
©reprodução autorizada pelo autor

Lima, Felícia de Araújo
Estudos de associação de genes de pigmentação com cor da pele, cabelo e olhos para fenotipagem forense em amostra brasileira / Felícia de Araújo Lima. -- São Paulo, 2017.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientador: Cintia Fridman Rave.

Descritores: 1.Genética forense 2.Polimorfismo de nucleotídeo único 3.Estudos de associação genética 4.Fenótipo 5.Genótipo 6.Identificação de vítimas 7.Brasil

USP/FM/DBD-062/17

Nome: LIMA, Felícia de Araújo

Título: Estudos de associação de genes de pigmentação com cor da pele, cabelo e olhos para fenotipagem forense em amostra brasileira.

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedico esta dissertação...

À minha família, com amor, admiração e gratidão por sua compreensão, carinho, presença e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Deus por nunca permitir que minha fé seja abalada.

Desejo agradecer à minha orientadora Dra. Cintia Fridman pela paciência e oportunidades. O aprendizado foi imenso.

Aos meus pais Neuma e José, que sempre investiram em minha formação pessoal, acadêmica e moral, estando presentes em todas as minhas conquistas. A palavra obrigada não é suficiente para definir o tamanho de minha gratidão.

Às minhas irmãs Fabíola e Fabrícia, que sempre mostraram-se interessadas e presentes em meus estudos e em minha formação pessoal.

À minha sobrinha Alice, que já me fazia feliz mesmo antes de chegar em minha vida e, agora que chegou, agradeço por cada sorriso que posso presenciar.

Ao meu grande amigo e um tio sem igual por nunca ter me dito não nos momentos de necessidade, pelas piadas sempre na ponta da língua e por ter feito parte de cada uma das minhas vitórias. Tio Ivan, sua memória sempre permanecerá em mim.

À minha grande amiga Mari por ter me guiado por grande parte do caminho que segui nessa jornada e por seus ouvidos sempre dispostos a ouvir e boca sempre disposta a aconselhar. Torço por seu sucesso.

Às amigas Marina e Nathalie e Liliane pela paciência, mas principalmente pelas risadas e momentos que fizeram este mestrado mais colorido.

À todos os colegas do LIM 40 e do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica, Medicina Social e do Trabalho pelo companheirismo, boa convivência, cafezinhos, torcida, enfim, por todos os anos em que pudemos estar juntos.

Às agências de fomento CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro;

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, ao Programa de Fisiopatologia Experimental e ao LIM 40 do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica, Medicina Social e do Trabalho pela disponibilização do espaço e pelo apoio concedido para a realização desse estudo;

À todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, incluindo àquelas que concordaram em ceder minutos de seu tempo para a entrevista e coleta das amostras necessárias para que este estudo fosse adiante.

MUITO OBRIGADA!

“We are only as strong as we are united, as weak as we are divided.”
J.K. Rowling, Harry Potter and the Goblet of Fire

RESUMO

Lima FA. Estudo de associação de genes de pigmentação com cor da pele, do cabelo e dos olhos para finalidade de fenotipagem forense em amostra brasileira [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

A pigmentação humana é uma característica variável e complexa determinada por fatores genéticos e hormonais, exposição à radiação ultravioleta, idade, doenças, entre outros. Alguns polimorfismos em genes de pigmentação têm sido associados com a diversidade fenotípica de cor da pele, cabelo e olhos e em populações homogêneas. A técnica denominada Fenotipagem Forense pelo DNA (FDP) vem beneficiando a ciência forense em vários países e auxiliando investigações criminais por ser capaz de sugerir, com boa precisão, os possíveis fenótipos para as características externamente visíveis (EVCs) em amostras de origem desconhecida. No presente trabalho foram avaliadas as associações entre os SNPs presentes nos genes *SLC24A5* (rs1426654; rs16960620; rs2555364), *TYR* (rs1126809) e *ASIP* (rs6058017) com cor de pele, cabelo e olhos em indivíduos da população brasileira para apontar o possível uso desses marcadores na prática forense em populações miscigenadas. Os voluntários responderam um questionário no qual fizeram a autodeclaração dessas características e estes dados foram usados para as comparações entre genótipos e fenótipos. Os resultados mostraram que para os SNPs rs2555364 e rs1426654 o alelo ancestral esteve associado com as características cor de pele negra, cabelos castanhos ou pretos e olhos castanhos. Além disso, o alelo ancestral do SNP rs6058017 foi significativamente associado com cor de pele negra e olhos castanhos. Inversamente, os alelos variantes destes SNPs são correlacionados com características de pigmentação clara para as EVCs avaliadas, corroborando os estudos prévios realizados em diferentes populações. Esses resultados mostram que a informação molecular pode ser útil para a inferência de EVCs, e a técnica de FDP é uma importante ferramenta para estudos forenses em amostra brasileira.

Descritores: genética forense; polimorfismo de nucleotídeo único; estudos de associação genética; fenótipo; genótipo; identificação de vítimas; Brasil.

SUMMARY

Lima FA. Association study of pigmentation genes with skin, hair and eyes color for forensic phenotyping purposes in Brazilian sample [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

Human pigmentation is a variable and complex trait determined by genetic and hormonal factors, exposure to ultraviolet radiation, age, diseases, among others. Some polymorphisms in pigmentation genes have been associated with the phenotypic diversity of skin, hair and eyes color in homogeneous populations. Forensic DNA Phenotyping (FDP) is benefiting forensic science in several countries, helping in criminal investigations due to its ability to suggest, with good accuracy, the possible phenotypes for externally visible characteristics (EVCs) in samples of unknown origin. Herein, we evaluated the associations between the SNPs present in the genes *SLC24A5* (rs1426654; rs16960620; rs2555364), *TYR* (rs1126809) and *ASIP* (rs6058017) with skin, hair and eyes color in individuals of the Brazilian population in order to point out the possible use of these markers in forensic practice in admixed populations. The volunteers answered a questionnaire in which they self reported these characteristics for comparison between genotypes and phenotypes. The results showed that for the SNPs rs2555364 and rs1426654 the ancestral allele was associated with characteristics of black skin color, brown or black hair and brown eyes. In addition, the ancestral allele of the SNP rs6058017 was significantly associated with black skin color and brown eyes. Inversely, the variant alleles of these SNPs are correlated with fair pigmentation characteristics for the evaluated EVCs, corroborating the previous studies performed in different populations. These results show that molecular information may be useful for the inference of EVCs, and the FDP technique is an important tool for forensic studies in a Brazilian sample.

Descriptors: forensic genetics; polymorphism, single nucleotide; genetic association studies; phenotype; genotype; victims Identification; Brazil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do processo de síntese de melanina.....30

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Número de indivíduos autodeclarados para cada uma das categorias de cor da pele. 50

Gráfico 2: Número de indivíduos autodeclarados para cada uma das categorias de cor do cabelo. 51

Gráfico 3: Número de indivíduos autodeclarados para cada uma das categorias de cor dos olhos.....51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos *primers* usados para amplificação das regiões de interesse do presente estudo. 45

Tabela 2: Descrição das frequências genotípicas e alélicas (minor allele frequency, MAF), e do resultado do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, para a amostra total estudada para os SNPs do gene *SLC24A5*.....52

Tabela 3: Resultado das associações entre o polimorfismo rs16960620 (*SLC24A5*) e as variáveis Cor de pele, olhos e cabelos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo de Genótipos. 53

Tabela 4: Resultado das associações entre o polimorfismo rs16960620 (*SLC24A5*) e as variáveis Cor de pele, olhos e cabelos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo Dominante. 55

Tabela 5: Resultado das associações entre o polimorfismo rs16960620 (*SLC24A5*) e as variáveis Cor de pele, olhos e cabelos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo Recessivo. 57

Tabela 6: Resultado das associações entre o polimorfismo rs2555364 (*SLC24A5*) e as variáveis Cor de pele, olhos e cabelos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo de Genótipos. 59

Tabela 7: Modelo de regressão logística para identificar se o polimorfismo rs2555364 (*SLC24A5*) foi capaz de predizer cor da pele, cor do cabelo e cor dos olhos no Modelo de Genótipos.....61

Tabela 8: Resultado das associações entre o polimorfismo rs2555364 (SLC24A5) e as variáveis cor de pele, cabelo e olhos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo Dominante. 62

Tabela 9: Modelo de regressão logística para identificar se o polimorfismo rs2555364 (*SLC24A5*) foi capaz de predizer cor da pele e cor dos olhos no Modelo Dominante.....63

Tabela 10: Resultado das associações entre o polimorfismo rs2555364 (SLC24A5) e as variáveis cor da pele, cabelos e olhos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo Recessivo. 65

Tabela 11: Modelo de regressão logística para identificar se o polimorfismo rs2555364 foi capaz de predizer cor da pele, cabelo e olhos no Modelo Recessivo. 67

Tabela 12: Resultado das associações entre o polimorfismo rs1426654 (SLC24A5) e as variáveis Cor de pele, olhos e cabelos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo de Genótipos. 68
Tabela 13: Modelo de regressão logística para identificar se o polimorfismo rs1426654 foi capaz de predizer cor da pele, cabelo e olhos no Modelo de Genótipos. 70
Tabela 14: Resultado das associações entre o polimorfismo rs1426654 (SLC24A5) e as variáveis Cor de pele, olhos e cabelos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo Dominante. 71
Tabela 15: Modelo de regressão logística para identificar se o polimorfismo rs1426654 foi capaz de predizer cor da pele, no Modelo Dominante. 73
Tabela 16: Resultado das associações entre o polimorfismo rs1426654 (SLC24A5) e as variáveis cor da pele, olhos e cabelos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo Recessivo. 74
Tabela 17: Modelo de regressão logística para identificar se o polimorfismo rs1426654 foi capaz de predizer cor da pele, cabelo e olhos no Modelo Recessivo. 76
Tabela 18: Descrição das frequências genotípicas e alélicas (minor allele frequency, MAF), e do resultado do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, para a amostra estudada para o SNP do gene *ASIP*. 77
Tabela 19: Resultado das associações entre o polimorfismo rs6058017 (ASIP) e as variáveis cor da pele, olhos e cabelos (também na forma agrupada em duas categorias), para o Modelo de Genótipos. 78
Tabela 20: Modelo de regressão logística para identificar se o polimorfismo rs6058017 foi capaz de predizer cor da pele e olhos no Modelo de Genótipos. 79
Tabela 21: Resultado das associações entre o polimorfismo rs6058017 (ASIP) e as variáveis cor da pele, cabelo e olhos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo Dominante. 81
Tabela 22: Modelo de regressão logística para identificar se o polimorfismo rs6058017 foi capaz de predizer cor da pele e olhos, no Modelo Dominante. 83

Tabela 23: Resultado das associações entre o polimorfismo rs6058017 (ASIP) e as variáveis cor da pele, cabelo e olhos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo Recessivo. 84
Tabela 24: Modelo de regressão logística para identificar se o polimorfismo rs6058017 foi capaz de predizer cor da pele e olhos, no Modelo Recessivo. 85
Tabela 25: Descrição das frequências genotípicas, alélicas (minor allele frequency, MAF), e do resultado do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, para a amostra estudada para o SNP do gene TYR. 86
Tabela 26: Resultado das associações entre o polimorfismo rs1126809 (TYR) e as variáveis cor da pele, olhos e cabelos (também na forma agrupada em duas categorias), para o Modelo de Genótipo.....87
Tabela 27: Resultado das associações entre o polimorfismo rs1126809 (TYR) e as variáveis cor de pele, cabelo e olhos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo Dominante.....89
Tabela 28: Resultado das associações entre o polimorfismo rs1126809 (TYR) e as variáveis Cor de pele, olhos e cabelos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo Recessivo. 91

LISTA DE ABREVIATURAS

3'UTR	Região Não Traduzida na Extremidade 3'
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AIMs	Ancestry Informative Markers - Marcadores Informativos de Ancestralidade
ASIP	Agouti Signaling Protein Gene
cAMP	Monofosfato Cíclico de Adenosina
CAPPesq	Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa
CODIS	Combined DNA Index System
DHI	5,6-dihidroxi
DHICA	5,6-dihidroxi-2-carboxílico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Tri-Fosfatados
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
EUA	Estados Unidos da América
EVCs	Externally Visible Characteristics – Características Externamente Visíveis
FBI	Federal Bureau of Investigation
FDP	Forensic DNA Phenotyping - Fenotipagem Forense pelo DNA
HERC2	HECT Domain and RCC1-like Domain 2 Gene
IC	Intervalo de Confiança
INDEL	Polimorfismo do tipo Inserção-Deleção
IRF4	Interferon Regulatory, Factor 4 Gene
LIM	Laboratório de Investigação Médica
MAF	*Minor allele frequency*
MC1R	Melanocortin 1 receptor
MITF	Fator de Transcrição Associado a Microftalmia
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCKX5	Sodium/Potassium/Calcium Exchanger 5

LISTA DE ABREVIATURAS

OCA1	Albinismo Oculocutâneo Tipo 1
OCA2	Albinism Oculocutaneous, Type 2 Gene
OCA6	Albinismo Oculocutâneo Tipo 6
OR	Odds Ratio
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PKA	Proteína Quinase A
POMC	Pró-opiomelanocortina
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SLC24A5	Solute Carrier Family 24, Member 5 Gene
SLC45A2	Solute Carrier Family 45, member 2 Gene
SNP	Single Nucleotide Polymorphism – Polimorfismos de Nucleotídeo Único
STRs	Short Tandem Repeats - Repetições Curtas em Tandem
TYR	Tyrosinase Gene
UVR	Radiação Ultravioleta
VDR	Vitamin D Receptor Gene
α-MSH	Hormônio Estimulante de Melanócito Tipo Alpha
β-MSH	Hormônio Estimulante de Melanócito Tipo Beta

LISTA DE SÍMBOLOS

X^2	Qui Quadrado
Ca2+	Cálcio
K+	potássio
Na	sódio

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS
RESUMO
SUMMARY
LISTA DE FIGURAS
LISTA DE GRÁFICOS
LISTA DE TABELAS
LISTA DE ABREVIATURAS
LISTA DE SÍMBOLOS
1 INTRODUÇÃO 22
1.1 Fenotipagem Forense pelo DNA 23
1.2 Evolução da Pigmentação Humana 26
1.3 Pigmentação Humana e Melanogênese 28
2 OBJETIVOS 40
2.1 Geral 40
2.2 Específicos 40
3 MATERIAL E MÉTODOS 42
3.1 Casuística 42
3.2 Extração do DNA 43
3.3 Amplificação do DNA 43
3.4 Reação de Sequenciamento 46
3.5 Análise Estatística 47
4 RESULTADOS 50
4.1 *SLC24A5* 52
4.2 *ASIP* 77
4.3 *TYR* 86
5 DISCUSSÃO 95
6 CONCLUSÕES 106
REFERÊNCIAS 109
ANEXO A 124

ANEXO B 127
ANEXO C 129
ANEXO D 132
ANEXO E 133
APÊNDICE A.....136
APÊNDICE B.....142

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A análise do DNA para investigações forenses se baseia no conceito de que cada indivíduo é único geneticamente, exceto em casos de gêmeos monozigóticos. Fundamentando-se neste princípio, quando analisado com precisão, o DNA obtido de amostras biológicas é capaz de individualizar este material por meio da comparação direta do perfil genético obtido da amostra biológica de origem desconhecida (amostra questionável) com o perfil de uma amostra referência (Butler, 2011; Pena et al, 1995). A técnica comparativa que investiga os perfis de STRs (do inglês, *Short Tandem Repeats*) é a mais aplicada em testes de identificação e individualização e tem aplicações forenses como: testar a paternidade e/ou outros vínculos genéticos e identificar geneticamente vítimas ou criminosos e também pessoas desaparecidas (Butler, 2011; Zieger; Utz, 2015).

O sistema CODIS (*Combined DNA Index System*) é uma base de dados de DNA, fundada pelo FBI na década de 1990 com a finalidade de auxiliar os laboratórios criminais americanos na identificação de suspeitos de crimes. Atualmente, a maioria dos marcadores do tipo STR que compõem o CODIS são os utilizados pela comunidade forense internacional e também na área de pesquisa cientpifica. A partir de 1° de Janeiro de 2017 o CODIS passou a incorporar sete marcadores STRs adicionais (D1S1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D19S433, D22S1045) aos 13 já existentes (CSF1PO, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, FGA, THO1, TPOX e vWA), totalizando 20 marcadores genéticos do tipo STR, presentes tanto em cromossomos autossômicos como em cromossomos sexuais (https://www.fbi.gov/about-us/lab/biometric-analysis/codis/). A partir das análises desses marcadores, cria-se um perfil de DNA e a informação é armazenada em bancos de DNA civis ou criminais (locais, estaduais e federais) para permitir a busca informatizada com o intuito de identificar pessoas desaparecidas ou suspeitos de crimes (FBI – https://www.fbi.gov/about-us/lab/biometric-analysis/codis/; Hares, 2015). Uma das maiores limitações desta técnica é a necessidade de uma amostra referência para comparação. Nos casos criminais, na falta imediata desse tipo de amostra, o perfil gerado da amostra questionável é armazenado em bancos de dados, para futuras

comparações (Butler, 2011; Kayser; de Knijff 2011; Kayser; Schneider, 2009; Zieger; Utz, 2015).

Mesmo diante desta problemática, o uso dos STRs nas ciências forenses é amplo e ainda será mantido por muitos anos no futuro, pois esses marcadores fazem parte de bancos de dados de DNA que crescem cada vez mais em todo o mundo (Butler, 2011; Kayser; Schneider, 2009). Ainda assim, a análise de marcadores adicionais pode ser fundamental para obtenção de maiores detalhes sobre a amostra desconhecida e o sujeito a quem ela pertence, como STRs dos cromossomos X e Y e polimorfismos no DNA mitocondrial (Diegoli, 2015; Melton; Holland; Holland, 2012).

1.1 Fenotipagem Forense pelo DNA

Nos últimos anos têm sido estudadas novas técnicas auxiliares à de STRs que podem, por exemplo, identificar o tipo de tecido celular do qual a amostra é proveniente, a estimativa de idade do indivíduo “doador” daquela amostra (Butler, 2011; Kayser, 2015; Walsh et al, 2011) e, até mesmo, sugerir algumas características fenotípicas de um indivíduo (padrão de calvície, estrutura do cabelo, cor dos cabelos, olhos e pele) (Frudakis, 2008; Kayser, 2015; Kayser; de Knijff, 2011; Pośpiech et al, 2015; Zbieć-Piekarska; Spólnicka; Kupiec, 2015).

Estudos com polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) que buscam compreender a relação de determinados fatores genéticos com certas características fenotípicas são crescentes e têm gerado resultados promissores no auxílio às ciências forenses (Glazier; Nadeau; Aitman, 2002; Maroñas et al, 2015; Pulker et al, 2007). Esse conhecimento pode ser usado de modo auxiliar na ciência molecular forense para diminuir a busca por suspeitos, vítimas ou pessoas desaparecidas em investigações criminais e/ou civis (Frudakis; Terravainen; Thomas, 2007; Sulem et al, 2007).

Os primeiros estudos relacionando genótipos a fenótipos foram realizados com o uso de amostras das populações americana e europeia e identificaram regiões no DNA que são representativas na caracterização da coloração branca da pele, bem como na cor de cabelo ruivo e loiro e também na variação da pigmentação da íris, apontando a importância de compreender a relação entre

genótipos e fenótipos complexos, como cor da pele, cabelo e olhos (Frudakis; Terravainen; Thomas, 2007; Sulem et al, 2007). O processo de predizer os fenótipos de um indivíduo, com finalidade forense, a partir da verificação de suas amostras biológicas é conhecido como Fenotipagem Forense pelo DNA ou FDP (do inglês *Forensic DNA Phenotyping*) (Kayser, 2015; Kayser; Schneider, 2009), termo que foi apresentado e descrito primeiramente pelos investigadores Koops & Schellekens em 2008. Para este tipo de abordagem obtêm-se o DNA a partir da amostra biológica de origem desconhecida e, com base na análise de marcadores validados para os fenótipos pesquisados, é possível inferir características externamente visíveis, ou EVCs (do inglês *Externally Visible Characteristics*), dentre elas a cor da pele, a cor do cabelo e a cor dos olhos. Logo, a Fenotipagem Forense pelo DNA fornece mais detalhes sobre o sujeito ao qual determinada amostra biológica pertence, sem a necessidade de uma amostra referência para análise comparativa (Frudakis, 2008; Kayser; Schneider, 2009; Liu; Wen; Kayser, 2013; Maroñas et al, 2015).

Em 2009, um estudo conduzido na Europa verificou a associação entre 37 SNPs de pigmentação e a cor dos olhos e, ao fazer o genótipo de amostras pertencentes a 6.168 holandeses, desenvolveu um modelo capaz de inferir essa característica. Os dados obtidos mostraram que 67,6% dos indivíduos tinham olhos azuis, 22,8% foram sugestivos para olhos castanhos e 9,6% foram sugestivos de indivíduos com pigmentação intermediária da íris (nem azul nem castanha) (Liu et al, 2009). Com base no estudo anterior, o mesmo grupo criou um sistema de análise multiplex, denominado IrisPlex, no qual seis (*HERC2* rs12913832, *OCA2* rs1800407, *SLC24A4* rs12896399, *SLC45A2* rs16891982, *TYR* rs1393350, e *IRF4* rs12203592) dentre os 37 SNPs foram validados quanto a sua capacidade preditiva para a pigmentação da íris, sendo que o modelo estatístico desenvolvido garante 90% de precisão na obtenção do dado (Walsh et al, 2011; Walsh et al, 2012).

Em 2013, esse mesmo grupo apresentou uma atualização do ensaio, denominada de HIrisPlex, demonstrando a possibilidade de predizer simultaneamente tanto a cor do cabelo quanto a cor da íris (cor dos olhos). Neste estudo foi verificada a sensibilidade de predição desses dois fenótipos por meio da análise multiplex de 24 marcadores moleculares, sendo 23 do tipo SNP (incluindo os 6 SNPs presentes no IrisPlex) e uma alteração do tipo INDEL (Polimorfismo do tipo Inserção-Deleção), presentes em 11 genes. Além da alta capacidade para predição

de cor de olhos, já observada pelos pesquisadores utilizando o sistema IrisPlex, o sistema HIrisPlex se mostrou altamente eficiente na predição de cor de cabelo preto, ruivo, castanho e loiro com acurácia de 87,5%, 80%, 78,5% e 69,5%, respectivamente (Walsh et al, 2013; Walsh et al, 2014).

Os dois sistemas, IrisPlex e HIrisPlex, já estão validados para uso forense na Holanda, onde as pesquisas foram desenvolvidas, e o algoritmo correspondente está disponível publicamente (http://hirisplex.erasmusmc.nl/), sendo possível inserir as informações dos genótipos dos 24 marcadores validados e, baseado nos modelos estatísticos dos dois sistemas, o possível fenótipo do indivíduo é produzido (Walsh et al, 2014).

Além disso, a validação do Sistema HIrisPlex para predição de EVCs mostrou ser eficaz em amostras de DNA mesmo muito tempo após a morte de um indivíduo, como foi apresentado em um estudo de 2016, no qual o Sistema HIrisPlex foi aplicado em 49 amostras de DNA obtidas a partir de ossos ou dentes de vítimas da Segunda Guerra Mundial, gerando resultado de todos os SNPs para a predição da cor de cabelo e olhos (Chaitanya et al, 2016).

Outro trabalho que objetivou avaliar a confiabilidade da predição de fenótipos de pigmentação com o uso de uma grande base de dados de marcadores genéticos em indivíduos com fenótipos conhecidos e, a partir da análise molecular tentou predizer o fenótipo de pigmentação de espécimes pré-históricos de *Homo* e de indivíduos contemporâneos cujas características externamente visíveis não são conhecidas, realizou a comparação dos dados fenotípicos preditos e observados por meio da análise de 124 SNPs em 33 regiões gênicas e sete regiões intergênicas de 30 indivíduos, cinco deles pré-históricos, cujos genomas nucleares completos estão disponíveis nas bases de dados públicas, tais como UCSC. Este estudo mostrou que para os fenótipos preditos por meio da análise molecular versus observados, a percentagem de concordância foi: para cor da pele: 64%; para cor do cabelo: 44% e para cor dos olhos: 36%, já para os resultados obtidos pela análise molecular versus o fenótipo sugerido, essas percentagens foram de 60% para cor da pele, 42% para cor do cabelo e 67% para cor dos olhos. (Cerqueira et al., 2012). Este estudo permitiu demonstrar a aplicabilidade que marcadores de pigmentação podem ter na determinação de fenótipos na área forense.

As pesquisas relacionadas a FDP têm se aprimorado cada vez mais e mostrado que a análise do DNA pode sugerir, até mesmo, a morfologia dos fios de cabelo e estimar a idade de uma pessoa (Pośpiech et al, 2015; Zbieć-Piekarska; Spólnicka; Kupiec, 2015). O uso dessas informações aumenta a possibilidade da realização de reconstrução facial – com o uso de programas de computação - mais fiel ao real, auxiliando investigações forenses (Pośpiech et al, 2015; Zbieć-Piekarska; Spólnicka; Kupiec, 2015).

1.2 Evolução da Pigmentação Humana

Compreender a ação do processo de seleção natural em referência às variações na pigmentação humana faz parte da história científica e influencia diversas áreas de estudos, como a genética, a antropologia, a história humana, a fisiologia, a medicina e, mais recentemente, as ciências forenses (Jablonski, 2004; Rees; Harding, 2012).

A reconstrução da história evolutiva se baseia nas evidências relatadas pelas comparações feitas entre essas ciências, bem como o estudo de complexos bioquímicos e gênicos que determinam a função de cada tipo de pigmento (Jablonski; Chaplin, 2000; Jablonski, 2012; Hellenthal et al, 2014).

Os fatores ambientais e climáticos são importantes na determinação de algumas variações fenotípicas e a pigmentação humana é um fenótipo complexo que sofre ação desses fatores (Barreiro et al, 2008; Jablonski; Chaplin, 2010).

A região geográfica em que uma população habita está diretamente associada com a quantidade de radiação ultravioleta (UVR) que os indivíduos recebem, visto que mudanças nos níveis de UVR ao redor do planeta correspondem a 86% da variação na pigmentação da pele humana (Chaplin, 2004; Jablonski; Chaplin, 2014). O tipo de pigmentação produzida está associado ao processo de foto proteção, uma vez que a melanina é considerada um protetor natural contra as nocividades causadas pelas radiações solares, que incluem: dano ao DNA ocasionando falhas no metabolismo, na estrutura e nas funções celulares; além disso, os genes envolvidos na pigmentação humana podem estar relacionados à captação de UVR e estão entre aqueles com os sinais mais evidentes de seleção natural (Jablonski; Chaplin, 2010; Parra, 2007; Rees, 2003).

A exposição excessiva à UVR também promove o decaimento na concentração plasmática de folato, elemento necessário para a síntese e reparo do DNA, cuja deficiência pode causar malformações fetais. Sendo um componente que está sob influência da ação da UVR, acredita-se que a manutenção do folato também esteja relacionada ao processo de seleção natural que promoveu as variações na pigmentação (Juzeniene et al, 2009; Lucock, 2000; Robins, 2005).

A exposição a UVR é ainda fundamental para a síntese de vitamina D, que tem como uma das suas funções manter a homeostase de cálcio no plasma, sendo que a deficiência desta vitamina pode promover o surgimento de problemas ósseos (Holick, 2004; Patience, 2015).

O modelo de explicação para as variações na pigmentação humana mais aceito nos dias atuais descreve que os primeiros *Homo sapiens* que habitavam a África equatorial perderam os pelos que cobriam a pele devido à necessidade de perder calor corporal durante grande esforço e condições de altas temperaturas. A pele nua possibilitou maior interação do corpo com o meio ambiente e maior exposição à UVR e a outros fatores físicos, químicos e biológicos, gerando fortes processos de pressão seletiva que resultaram na capacidade de produzir eumelanina (pigmento escuro), oferecendo foto proteção à pele (Jablonski; Chaplin, 2014; Norton et al, 2007; Sturm, 2009).

Ao longo da evolução, alguns grupos de humanos se dispersaram indo para o sul da África, enquanto outros saíram do continente e passaram a habitar regiões com menor incidência de UVR, como a Europa e a Ásia. Essas migrações, em conjunto com a diversidade de condições ambientais, principalmente a menor captação de UVR em diferentes latitudes do planeta, resultou em diminuição da biossíntese de vitamina D. Com a possibilidade de dano pela deficiência de vitamina D, essas populações foram submetidas à pressão seletiva, que favoreceu indivíduos com pele clara capazes de captar UVR suficiente para produção de vitamina D sem que ocorresse a degradação de folato (Beleza et al, 2013; Chaplin; Jablonski, 2009; Jablonski; Chaplin, 2010; Jablonski; Chaplin, 2014; Juzeniene et al, 2009; Robins, 2005).

Uma vez que os genes envolvidos no processo de pigmentação como um todo são os mesmos para pele, olhos e cabelo, essas características estão relacionadas e, acredita-se que a evolução adaptativa do processo de pigmentação

desses traços tenha acontecido ao mesmo tempo, sendo que as diferenças observadas podem representar efeitos pleiotrópicos dos genes de pigmentação da pele, que agiram também influenciando as variações na cor dos olhos e do cabelo (Hellenthal et al, 2014; Jablonski; Chaplin, 2014).

1.3 Pigmentação Humana e Melanogênese

A pigmentação em humanos é uma característica fenotípica muito variável e complexa, determinada pela interação de fatores genéticos com fatores ambientais, idade, doenças, drogas, hormônios, além da exposição à radiação ultravioleta (UVR) (Pneuman et al, 2012; Sturm; Larsson, 2009).

O polímero responsável pela pigmentação humana é a melanina, um biopolímero complexo capaz de absorver radicais livres gerados no citoplasma, luz visível e radiação ionizante, inclusive ultravioleta, bem como neutralizar espécies reativas de oxigênio (ROS) (Chang, 2012; Jablonski, 2012).

A síntese de melanina tem origem a partir das células produtoras de pigmento, os melanócitos e se dá por um processo biológico denominado melanogênese. Os melanócitos se originam na crista neural e migram para a camada basal da epiderme, para os folículos capilares e para as células da íris dos olhos. Durante a melanogênese ocorre a combinação de reações catalíticas e químicas, principalmente dentro dos melanossomos, organelas presentes nos melanócitos. O processo biossintético que origina a melanina pode produzir dois tipos desse biopolímero: a eumelanina e/ou a feomelanina. A eumelanina é mais densa e insolúvel e é predominantemente escura na sua forma, definindo fenótipos com tons marrons e negros, sendo mais eficaz na foto proteção. Já a feomelanina define fenótipos de cor amarelada ou avermelhada. O padrão de síntese e a distribuição de melanina determinam a real cor da pele, bem como dos olhos e do cabelo (Chang, 2012; Costin; Hearing, 2007; Videira; Moura; Magina, 2013).

A melanogênese é um processo complexo e depende de muitas vias que, quando alteradas, podem ocasionar hipo/hiperpigmentação, devido à quantidade de melanina presente dentro dos melanossomos, com ou sem alteração no número dessas organelas, uma vez que o número de melanossomos em indivíduos de pele negra ou branca, por exemplo, é praticamente o mesmo, porém estes variam de

densidade e tamanho. Pode ocorrer ainda a combinação entre os dois tipos de melanina, por exemplo, quantidades pequenas de eumelanina no cabelo, podem se misturar com feomelanina e formar os fenótipos intermediários (Park et al, 2009; Videira; Moura; Magina, 2013).

A captação de UVR através da pele é o principal fator intrínseco que regula a melanogênese, e a indução da pigmentação pode se dar de dois modos: 1) imediato, processo que se inicia após 5 a 10 minutos de exposição à UVR, não é dependente da síntese de maiores quantidades de melanina e sim do processo de redistribuição dos melanossomos na epiderme e oxidação da melanina aí existente. Neste caso, a pigmentação é de curto prazo e desaparece poucos dias após seu estímulo inicial. 2) tem início 3 a 4 dias após exposição a UVR, resulta principalmente no aumento nos níveis de eumelanina na epiderme para fornecer foto proteção e desaparece dentro de semanas (Agar; Young, 2005; Kollias et al, 1991; Rouzaud et al, 2005; Yamaguchi; Hearing, 2009).

Como mencionado, a síntese de melanina tem início, principalmente, pela influência da exposição solar e seu estímulo pode ser tanto autócrino como parácrino. O gene da Próopiomelanocortina (*POMC*) codifica uma proteína precursora de vários hormônios que é expressa na hipófise e estimulada pela captação de UVR. Esse polipeptídio é clivado para formar vários derivados, dentre eles o hormônio estimulante de Melanócito alfa (α-MSH), que ativa o processo de melanogênese (Lin et al, 2007; Nan et al, 2009a).

Quando α-MSH se liga ao seu receptor (MC1R), na membrana dos melanócitos, o hormônio desencadeia um aumento intracelular de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP). Por sua vez, cAMP ativa a enzima proteína quinase A (PKA), que em um processo de cascata, realiza a fosforilação de fatores de transcrição que regulam a expressão do Fator de Transcrição Associado a Microftalmia (MITF). Após essas etapas, MITF ativa a expressão de enzimas participantes da melanogênese. Além do α-MSH, outros derivados de POMC, tais como β-MSH (do inglês *beta-Melanocyte-stimulating hormone*) e ACTH (Hormônio adrenocorticotrófico), também podem estimular a melanogênese pelas mesmas vias de ativação (Ebanks; Wickett; Boissy, 2009; Videira; Moura; Magina, 2013) (Figura 1).

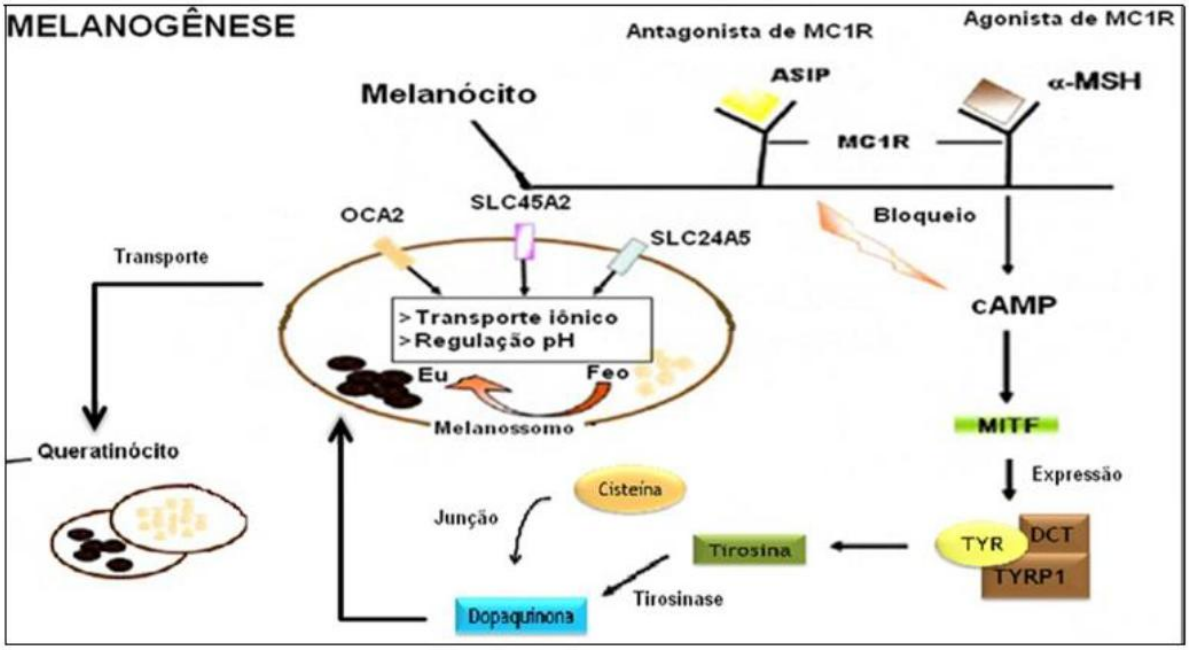


Figura 1: Esquema da síntese de melanina. Hormônio α-MSH se liga ao receptor MC1R, desencadeando aumento de cAMP e ativação do fator de transcrição MITF. MITF favorece expressão de genes, como o *TYR. TYR* codifica tirosinase que converte tirosina em dopaquinona. Em seguida, dopaquinona se conjuga à cisteína e o produto desta reação é oxidado, produzindo melanina que será transportada para os melanossomos, onde ocorre a maturação deste polímero. Os genes *SLC24A5, SLC45A2* e *OCA2* são os responsáveis por codificar proteínas de transporte iônico e regulação do pH. A ação antagonista ocorre quando a proteína ASIP se liga ao receptor MC1R e favorece a síntese de feomelanina por desbalancear os níveis de *TYR* e *SLC24A5*. A melanina produzida é depois transportada para os queratinócitos circundantes. (adaptado de Scherer e Kumar, 2010)

Uma das enzimas cuja expressão é regulada por MITF é a tirosinase, enzima chave no processo de melanogênese, pois na primeira etapa desta via, a tirosinase promove a conversão de tirosina em dopaquinona. Dois eventos distintos podem ocorrer a partir daqui: 1) a dopaquinona pode conjugar-se com DHI (5,6-dihidroxi) ou DHICA (5,6-dihidroxi-2-carboxílico), levando a síntese de eumelanina; 2) a dopaquinona pode conjugar-se com cisteínil-dopa, levando a síntese de feomelanina (Scherer; Kumar, 2010; Schiaffino, 2010; Videira; Moura; Magina, 2013).

Após a conjugação da dopaquinona com cisteínil-dopa, DHI ou DHICA, o produto é levado para dentro dos melanossomos. Dentro dessas organelas o controle do pH e a quantidade de íons presente, fatores cuja manutenção depende de proteínas transportadoras de solutos, como a NCKX5 (do inglês *sodium/potassium/calcium exchanger 5*), são determinantes na maturação da melanina e também podem definir o tipo de pigmento que será sintetizado, uma vez que ambientes com pH mais básico favorecem a produção de eumelanina, enquanto

que ambientes com pH mais ácido favorecem a síntese feomelanina (Lamason et al, 2005; Scherer; Kumar, 2010; Videira; Moura; Magina, 2013; Wilson et al, 2013).

A síntese de feomelanina também pode ser direcionada pela ação de um antagonista de MC1R, denominado ASIP (proteína sinalizadora de agouti), que ao se ligar neste receptor bloqueia toda a cascata e favorece a síntese do polímero menos maduro de melanina (Bonilla et al, 2005; Suzuki et al, 1997).

Depois de produzida, a melanina é transportada para os queratinócitos da pele ou da raiz dos pelos, sendo ainda retida nas células da íris dos olhos. Na epiderme, cada melanócito interage com aproximadamente 30 a 40 queratinócitos, transmitindo melanossomos maduros para o citoplasma destas células, por meio de exocitose, fusão das membranas plasmáticas, transferência de vesículas ou citofagocitose (Sturm, 2006; Tsatmali; Ancans; Thody, 2002; Videira; Moura; Magina, 2013).

Nos olhos, os melanócitos possuem duas origens distintas: neuroectodérmica ou estromal. A pigmentação castanha se caracteriza pela presença abundante de melanina no estroma e na camada basal anterior, já as colorações azul e verde da íris ocorrem quando há menor quantidade de melanina nessas camadas. Enquanto que na pele ocorrem produção e secreção contínua de melanina, nos olhos, os melanossomos presentes na íris são armazenados e acumulados no citoplasma dos melanócitos e as diferenças na pigmentação resultam de quantidades e tipos de melanina presentes nos melanossomos (Sturm; Larsson, 2009).

Nos fios de cabelo, a cor é o resultado de melanócitos no bulbo e o pigmento é adicionado aos queratinócitos em crescimento que irão tornar-se a haste do cabelo e, assim como no caso da coloração da pele e da íris, as diferenças vistas nas cores dos fios de cabelo, dependem da quantidade e do tipo de melanina depositado nos melanossomos (Rees, 2003).

Resumidamente, a regulação da melanogênese em humanos é controlada em diferentes níveis. Durante o desenvolvimento embrionário os melanócitos são células derivadas da crista neural e quando maduros migram para os tecidos onde vão se estabelecer. O padrão de migração está sob controle genético e representa o primeiro nível de regulação da melanogênese. A síntese de melanina também é regulada a nível celular por controle da formação dos melanossomos, que podem ser produzidos em vários tamanhos e densidades, dependendo do seu conteúdo de

melanina. Finalmente, a melanogênese é regulada em nível subcelular, onde ocorre controle da expressão dos genes envolvidos nesse processo (Ebanks; Wickett; Boissy, 2009; Park et al, 2009; Schallreuter et al, 2008; Videira; Moura; Magina, 2013).

Embora a síntese de melanina seja um processo único, os melanócitos estão localizados em regiões específicas e representam grupos celulares independentes, podendo, nesse caso, ocorrer vias de regulação ou interações específicas, ocasionando as diferentes combinações observadas nas diferentes populações, como por exemplo, populações com indivíduos de pele escura, porém olhos claros (Costin; Hearing, 2007; Lin et al, 2007; Sturm; Duffy, 2012; Videira; Moura; Magina, 2013).

A seguir serão descritos alguns genes que desempenham papel importante no processo de pigmentação, bem como seus polimorfismos e o que estes ocasionam na produção de melanina.

1.3.1 *SLC24A5*

O gene *SLC24A5* (*Solute Carrier Family 24, Member 5*) está localizado no braço longo do cromossomo 15 (15q21.1) e pertence a família de transportadores de solutos dependentes de potássio, existindo forte evidência da associação deste gene com as variações de pigmentação de pele, cabelo e olhos (Lamason et al, 2005; Sabeti et al, 2007).

O gene foi primeiramente descrito em estudos da espécie *Danio rerio* (*zebrafish*), nos quais as variações gênicas de *SLC24A5* foram pertinentes com a coloração mais clara observada nos peixes. Em seguida, um homólogo deste gene foi identificado em humanos como sendo responsável por codificar a proteína NCKX5 (Lamason et al, 2005; Wilson et al, 2013).

Embora a função exata do gene *SLC24A5* não seja totalmente conhecida, duas funções potenciais podem ser citadas: 1) influenciar a variação na pigmentação por mecanismos ainda desconhecidos que afetam os níveis de esteróis celulares (Wilson et al, 2013) e 2) codificar a proteína responsável por transportar $Ca2^{+}$ e K^{+} para melanossomos realizando a troca por sódio (Lamason et al, 2005). Esta proteína possui estrutura com trechos hidrofóbicos e hidrofílicos intercalados e um

ensaio de marcação celular mostrou que NCKX5 se localiza no interior das células fazendo parte das proteínas da rede trans-Golgi. Ela é descrita como uma proteína transportadora de solutos que exerce seu papel nos melanossomos agindo em canais iônicos dependentes de potássio e regulando o pH dentro dessas organelas e a proteína defeituosa leva ao albinismo oculocutâneo tipo 6 (OCA6). (Wilson et al, 2013).

A maturação e a manutenção da melanina são reguladas principalmente pela concentração de cálcio (Ca2+) dentro dos melanossomos, e estudos funcionais sugeriram um modelo de atuação de NCKX5 na absorção de cálcio dentro das organelas e apontaram ainda que o gene *SLC24A5* é mais expresso em células da derme, dos tecidos oculares e também em células com melanoma. Com isso, pode-se concluir que a expressão de SLC24A5 é importante para as células produtoras de melanina (Altimimi; Schnetkamp, 2007; Wilson et al,2013).

Ao estudar as associações do gene *SLC24A5* com a produção de melanina encontrou-se um SNP localizado na porção codificadora do gene que se caracteriza pela troca de uma guanina (G) por uma adenina (A) no terceiro éxon (rs1426654). Esta troca resulta na mudança do aminoácido alanina por treonina na posição 111 (Ala111Tre) da proteína NCKX5 (Lamason et al, 2005; Jackson, 2006).

Essa mudança diminui a escala de troca iônica em nível transmembrana nos indivíduos que apresentam o alelo variante tanto em heterozigose como em homozigose, tendo como resultado menor maturação de melanina e consequente síntese de feomelanina, resultando em fenótipos mais claros tanto para pele, como para olhos e cabelo. Por sua vez, a presença de altos níveis de proteína selvagem está associada a fenótipos de pele negra, olhos castanhos e cabelo escuro (Lamason et al, 2005; Tully, 2007; Ginger et al, 2008). Além disso, o silenciamento de SLC24A5 no transcriptoma de melanócitos humanos em estudo funcional reduziu a abundância de tirosinase, apontando que este gene interage com os fatores da via de melanogênese e responde sozinho por 25 – 38% da variação na coloração da pele humana e, aproximadamente, 34% na variação da cor dos olhos e do cabelo (Wilson et al, 2013).

Sabe-se que o polimorfismo (rs1426654) pode causar variações na pigmentação e as frequências dessas variações diferem entre algumas populações.

De acordo com pesquisas que detalham a distribuição geográfica do SNP rs1426654, as populações europeias – que exibem menor índice de melanina – possuem o alelo polimórfico A (111Tre) com frequências que variam de 98% a 100%, denotando um efeito significativo desta variante com a pigmentação branca da pele, bem como com a coloração azul da íris e com cabelo loiro, características predominantes em populações europeias. A frequência de 111Tre é menor conforme as populações se localizam mais próximas ao Equador, sendo que no Norte da África a frequência desta variante é de 80%, na Etiópia é de 40% a 60% e na Somália e África subsaariana é de 35% (Basu Mallick et al, 2013; Canfield et al, 2013; Dimisianos et al, 2009; Mukherjee et al, 2013; Sabeti et al, 2007; Soejima e Koda, 2007), sendo que estas populações têm, em sua maioria, indivíduos com pele negra, olhos castanhos e cabelo escuro.

A presença do alelo ancestral G (111Ala) varia de 20% a 100% em populações do continente africano, do Leste da Ásia e entre indígenas americanos, porém as populações negras da África são as que exibem a variante 111Ala em 100% dos indivíduos (Basu Mallick et al, 2013; Lamason et al, 2005; Soejima e Koda, 2007).

Na população brasileira a verificação das frequências dos alelos G e A em grupos de diferentes regiões do país (Sul, Sudeste e Nordeste), apontou que grande parte dos indivíduos com ancestralidade europeia exibe o alelo A e que esse polimorfismo foi associado à cor de pele branca, olhos azuis e cabelo loiro. Por outro lado, a presença do alelo G foi relacionada com elevado índice de melanina e características de pele negra, olhos castanhos e cabelo preto, estando o alelo ancestral G presente na maioria dos indivíduos que possuem ancestralidade africana (Cerqueira et al, 2014; Durso et al, 2014; Lima; de Toledo Gonçalves; Fridman, 2015).

Estes estudos descrevem que as análises das variantes do SNP rs1426654, presentes no gene *SLC24A5*, permitem diferenciar populações de pele negra e populações de pele não negra. Essa qualidade do polimorfismo faz com que seu uso seja importante na caracterização de EVCs para estudos forenses.

Embora a diferença na frequência dos alelos G e A permita a diferenciação entre grupos de indivíduos de pele negra e grupos de pele não negra, as cores de pele classificadas como intermediárias (pele parda ou amarela) são mais difíceis de

distinguir do fenótipo de pele branca pela análise do SNP rs1426654 (Giardina et al, 2008; Soejima e Koda, 2007). Por isso, além deste SNP, outros dois vêm sendo estudados para verificar se é possível aumentar a capacidade desse gene na diferenciação da cor de pele e também de grupos populacionais. Estes polimorfismos são: 1) rs16960620, que é a troca de uma adenina para uma guanina (A8371G) e dentro do gene *SLC24A5* classificada como variante intrônica e 2) rs2555364, íntron 2 do gene *SLC24A5*, que é localizado no cromossomo 15 (posição 48.419.386), caracterizado pela troca de uma citosina para uma guanina (Tiosano et al,2016). A construção dos haplótipos a partir desses três SNPs em populações africanas, asiáticas e europeias revelou que os asiáticos possuem três haplótipos exclusivos que reforçam a capacidade desse gene na distinção de grupos populacionais com origem ancestral e características fenotípicas diferentes (Giardina et al, 2008).

1.3.2 *ASIP*

Localizado no cromossomo 20 (20q11.2-q12) este gene influencia a variação normal da pigmentação, pois pode inibir a diferenciação de melanoblastos em melanócitos maduros e ainda bloquear a expressão de MITF, e dos genes TYR e *SLC24A5*, que têm funções importantes na melanogênese. O *ASIP* codifica a proteína sinalizadora de agouti, que recebe o mesmo nome do gene (ASIP). Esta é composta por 132 aminoácidos e tem expressão em vários tecidos, tais como a pele, tecido adiposo, hepático, cardíaco, entre outros. A ação da proteína ASIP na síntese de melanina é antagonista à ação de α-MSH, havendo competição pelo sítio de ligação do receptor MC1R. Quando a proteína ASIP consegue ligar-se ao MC1R, ocorre o bloqueio de cAMP e de toda a cascata que levaria à produção de eumelanina, favorecendo, portanto, a síntese de feomelanina (Bonilla et al, 2005; Kanetsky et al, 2002; Kwon et al, 1994; Suzuki et al, 1997; Wilson et al, 1995).

Os achados sobre a expressão do gene *ASIP* descrevem a ocorrência de um polimorfismo na região 3'UTR (rs6058017) resultando na substituição de uma guanina por uma adenina na posição 8818 do gene (G8818A). A hipótese abordada para a ação deste SNP sugere que a presença do alelo G promove instabilidade do RNA mensageiro e degradação prematura do transcrito. Deste modo, não há ação

antagonista da proteína ASIP sobre o α-MSH, possibilitando a ligação do hormônio ao seu receptor e promovendo a síntese de eumelanina. Considerando o efeito oposto, quando o alelo A (variante) está presente, o transcrito é devidamente processado e a proteína exerce ação bloqueadora na produção de eumelanina, favorecendo a síntese de feomelanina (Aberdam et al, 1998; Manne; Argeson; Siracusa, 1995; Voisey; Kelly; Van Daal, 2003).

As frequências alélicas estimadas para o SNP rs6058017 indicam que o alelo variante 8818A alcança frequências elevadas em caucasianos e indígenas originários da Austrália, 93% e 76%, respectivamente (Meziani et al, 2005; Sulem et al, 2008; Zeigler-Johnson et al, 2004).

Em asiáticos, o alelo 8818G (alelo ancestral) se apresenta em 10% a 28% da população, já em africanos a frequência sobe para 80% e é um dos fatores que sugere os fenótipos de pele negra, olhos castanhos e cabelo escuro, observados em grande parte desses indivíduos (Bonilla et al, 2005; Kanetsky et al, 2002; Voisey et al, 2006).

1.3.3 *TYR*

O gene *TYR* (*Tyrosinase*) está localizado no braço longo do cromossomo 11 (11q14-q21), sendo constituído por quatro íntrons e cinco éxons, e é responsável por codificar a enzima tirosinase, que possui grande importância no processo de melanogênese, devido ao seu papel catalítico, em razão de ser a primeira enzima a ser recrutada tanto para a síntese de eumelanina como para síntese de feomelanina. A produção de tirosinase ocorre nos melanócitos e a quantidade de melanina sintetizada nestas células é proporcional à quantidade de tirosinase e à sua atividade, sendo que a regulação negativa desta enzima inibe a síntese de melanina (Chang, 2012; Ibarrola-Villava et al, 2012; Tully, 2007).

O gene *TYR* foi o primeiro a ser identificado e descrito como relacionado ao processo de pigmentação, pois as mutações observadas se mostraram associadas com o albinismo, uma vez que a deleção total ou parcial da tirosinase causa má regulação na síntese de melanina e pode levar ao albinismo oculocutâneo tipo 1 (OCA1) (Oetting et al, 2009). Esta forma de albinismo é caracterizada pela deficiência na síntese e distribuição de melanina, ocasionando hipopigmentação da

pele, da íris e do cabelo. O albinismo oculocutâneo tipo 1 é subdividido em OCA1A e OCA1B. No primeiro caso não há produção de melanina e, no caso de OCA1B ocorre produção parcial de pigmento na pele e íris (Ko et al, 2012; Oetting et al, 2009; Sturm; Duffy, 2012).

Diversas mutações no gene *TYR* já foram mapeadas e respondem por 46% dos casos de albinismo em caucasianos; além disso, estima-se que 1% dos europeus que habitam o Norte da Europa apresenta alguma mutação no gene (Oetting, 2003; Scherer; Kumar, 2010; Sturm; Duffy, 2012).

Um dos polimorfismos mais estudados nesse gene caracteriza-se pela troca de uma guanina por uma adenina (rs1126809), o que resulta na substituição do aminoácido arginina por glutamina na posição 402 da tirosinase (Arg402Gln), levando à síntese de uma enzima termolábil que está sujeita à retenção no retículo endoplasmático e que apresenta apenas 25% da sua atividade catalítica quando comparada ao tipo selvagem da proteína (Halaban et al, 2000; Oetting et al, 2009).

O alelo variante A do polimorfismo rs1126809, responsável pela síntese da proteína alterada, e sua relação com a variação normal da pigmentação têm sido estudados e foram encontradas associações desta variante com pigmentação clara da pele e da íris, presença de sardas, cabelo ruivo e loiro, sensibilidade da pele ao sol e, consequente, capacidade de bronzeamento e, até mesmo, melanoma (Nan et al, 2009b; Oetting et al, 2009; Zhang et al, 2013). A frequência deste alelo varia de 27% a 77% em populações europeias ou com ancestralidade europeia; em africanos ou populações com descendência africana, esta frequência cai para aproximadamente 5%, sendo ainda, o alelo A descrito como ausente em populações da Ásia (Hutton; Spritz, 2008; Sturm; Duffy, 2012; Sulem et al, 2007; Sulem et al, 2008).

Em contraste, o alelo ancestral (G), quando presente em homozigose codifica a enzima do tipo selvagem e apresenta frequências mais elevadas em populações do Norte da África, onde indivíduos possuem, em sua maioria, pele negra, olhos castanhos e cabelo preto (Hudjashov et al, 2013; Oetting et al, 2009).

Os estudos forenses que relacionam genótipos com EVCs foram inicialmente conduzidos em populações que apresentam baixos índices de miscigenação, onde a maioria das pessoas exibe EVCs semelhantes; logo, estudos com amostras de

populações miscigenadas se tornam interessantes, pois podem ampliar o conhecimento sobre o papel dos genes de pigmentação.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a associação de polimorfismos nos genes *SLC24A5*, *ASIP* e *TYR* e com as características de cor da pele, cor do cabelo e cor dos olhos em amostra da população brasileira a fim de verificar a capacidade destes SNPs em predizer estas características externamente visíveis e sugerir o uso desses marcadores biológicos para aplicação forense.

2.2 Específicos

- Caracterizar as frequências dos polimorfismos rs1426654, rs16960620, rs2555364 (*SLC24A5*), rs6058017 (*ASIP*) e rs1126809 (*TYR*) em amostra da população brasileira;
- Avaliar a associação dos SNPS rs1426654, rs16960620 e rs2555364 (relacionados ao gene *SLC24A5*) com as informações de autodeclaração de cor de pele, cor do cabelo e cor dos olhos dos voluntários;
- Avaliar a associação do SNP rs1126809, presente no gene *TYR* com as características de cor da pele, cor do cabelo e cor dos olhos na nossa amostra;
- Analisar a associação do polimorfismo do gene *ASIP* (rs6058017) com cor da pele, cor do cabelo e cor dos olhos dos participantes, de acordo com a autodeclaração.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

Foram incluídas neste estudo amostras de DNA de 611 indivíduos, entre eles funcionários, alunos e colaboradores que exercem atividade no complexo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, não aparentados, de ambos os sexos, maiores de 18 anos que, após receberem informações sobre o projeto, concordaram em participar da pesquisa. Os participantes assinaram e receberam uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A) que, junto com o projeto, foi aprovado pela Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa (CAPPesq), do Hospital das Clínicas da FMUSP (CAAE 00973512.7.0000.0068 – Anexo B).

No início da entrevista, os indivíduos foram informados da pretensão em investigar a relação das características fenotípicas de cor da pele, do cabelo e dos olhos com polimorfismos genéticos, e que os dados fornecidos seriam sigilosos e codificados, não havendo possibilidade de identificação do entrevistado.

Todos os participantes responderam ao questionário (Anexo C) que continha perguntas relacionadas ao estilo de vida (uso de medicamentos, de filtro solar, consumo de bebida alcoólica) e informações sociodemográficas (sexo, idade, renda, grau de escolaridade, local de nascimento e local de nascimento dos pais e avós). Aos voluntários também foi solicitado que fizessem autorreferência de sua cor da pele, cabelo e olhos.

Para obter os dados de autorreferência de cor da pele, solicitou-se aos participantes que escolhessem uma dentre as quatro categorias, que são: branco, pardo, negro e amarelo.

Os voluntários relataram sua cor de cabelo natural aos 15 anos e, para isso foi apresentada uma tabela (Anexo D) com colorações de cabelo variadas para que eles apontassem a mais semelhante ao real, sendo este o dado usado para as análises realizadas no estudo. As diversas cores da tabela foram classificadas entre preto, castanho, loiro e ruivo para diminuir o número de variantes consideradas para comparação estatística e para padronizar este estudo com as nomenclaturas encontradas na literatura.

Para garantir maior precisão quanto ao relato de cor de olhos, uma tabela com 40 cores de olhos distintas (Anexo E) (Walsh et al, 2011) foi mostrada para cada voluntário, para que este apontasse a cor mais semelhante à de seus olhos. Este foi o dado considerado para realizar as comparações genótipo-fenótipo. As 40 cores foram agrupadas em castanho, verde e azul com a intenção de padronizar o presente estudo com as classificações usadas na literatura. Além disso, três fotos dos olhos de cada um dos participantes foram capturadas para comparação dos dados apontados na tabela com os dados das imagens geradas pelas fotografias.

3.2 Extração do DNA

Ao término da entrevista e procedimentos descritos acima, foram coletados 4mL de sangue periférico dos voluntários em tubos contendo EDTA. A extração do DNA foi realizada pelo processo de *Salting-out*, de acordo com protocolo previamente publicado (Miller; Dykes; Polesky, 1988). O DNA extraído foi eluído em tampão contendo Tris (1M, pH 7,5) e EDTA (0,2M, pH 7,4), quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific), aliquotado e armazenado em micro tubos a temperatura de -20°C, para posterior genotipagem e análise de polimorfismos.

As amostras de DNA estão armazenadas no Laboratório de Imuno-Hematologia e Hematologia Forense (LIM 40) do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.3 Amplificação do DNA

Para esse estudo foram analisados SNPs nos genes *SLC24A5*, *ASIP* e *TYR*. Cada uma das regiões de interesse foi amplificada por uma única reação de PCR e, posteriormente, analisadas em todas as amostras para composição dos genótipos e análise de associação.

Para o gene *SLC24A5*, os três polimorfismos avaliados foram:

1) rs1426654, que se caracteriza pela troca de bases de uma guanina por uma adenina. (Essa troca resulta na substituição do aminoácido alanina por uma treonina na posição 111 (Ala111Tre) (Lamason et al, 2005);

2) rs16960620, polimorfismo classificado como variante intrônica, (posição 48124702), que resulta na troca de uma adenina por uma guanina;

3) rs2555364, (posição 48127189) caracterizado pela troca de uma citosina para uma guanina (Giardina et al, 2008).

Para o gene *ASIP*, foi analisado o polimorfismo identificado pelo número de referência rs6058017, mapeado na região 3´UTR do gene e que se caracteriza pela troca de uma guanina por uma adenina (8818 G>A) (Bonilla et al, (2005).

Os *primers* para amplificação do polimorfismo de interesse do gene *TYR* (rs1126809), que é uma transição de uma adenina para uma guanina, resultando na alteração de aminoácidos arginina por glutamina (Arg402Gln) da proteína tirosinase (Oetting et al, 2009), foram desenhados com ajuda do programa Primer3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi).

Os pares de *primers* usados para a realização das PCRs foram obtidos junto à Invitrogen Life Technologies e são descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Sequência dos *primers* usados para amplificação das regiões de interesse do presente estudo.

Gene	Polimorfismo	***Primer Forward* (F)**	***Primer Reverse* (R)**	**Referência**
	rs1426654	5´-TCATAAAGAAGCAAAACATTGGA-3´	5´-AGCACAGATGCCAAGGAGAT-3´	Valenzuela et al, 2010
SLC24A5	rs16960620	5'-TGAACAATGACATGACTGAAAAA-3'	5'-AGCTGAAGATTTGGCAGTGG-3	Giardina et al, 2008
	rs2555364	5'-GACACAGCCGTCATATGCTC-3'	5'-GGCTTTGGTATTCCCCATCT- 3	Giardina et al, 2008
ASIP	rs6058017	5′-GGCTTCGATGAAGAAAGTGG-3′	5′-AGGGGATAGCCTCGTTCCTA-3′	Valenzuela et al, 2010
TYR	rs1126809	5’-CAACATCTTTCCATGTCTCCAG-3’	5’-TCATAGCCCAGATCTTTGGA-3	-

As reações de PCR foram conduzidas em um volume total de 28µl contendo DNA genômico a uma concentração de 50ng/µl, *primers* a 10pMol, dNTP a 1,25mM (Invitrogen Life Technologies) e Taq DNA polimerase Platinum 0,75U (Invitrogen Life Technologies). A ciclagem térmica foi realizada em termociclador Mastercycler (Eppendorf), com desnaturação inicial de 1 minuto a 96°C, seguida de 35 ciclos de desnaturação por 30 segundos a 96°C, anelamento por 30 segundos a 60°C e extensão por 30 segundos a 72°C com extensão final de 4 minutos a 72ºC. Ao final da etapa de amplificação por PCR, eletroforese em gel de agarose foi conduzida a fim de verificar a presença do fragmento de DNA que se desejava analisar para cada polimorfismo. Confirmada a presença de tais fragmentos, a purificação dos produtos de PCR, com o uso das enzimas Exonuclease I para purificação de amostras amplificadas por PCR (4000U) (Thermo Fisher Scientific) e Fosfatase Alcalina Termosenssível (1000U) (Thermo Fisher Scientific), foi realizada de acordo as instruções do fabricante.

3.4 Reação de Sequenciamento

Os produtos de PCR foram sequenciados nas duas direções, *forward* e *reverse*, com o uso dos mesmos pares de *primers* das reações de PCR.

As reações de sequenciamento foram conduzidas em um volume total de 10µL, contendo o produto de PCR amplificado e purificado (5µL), 10pMol do respectivo *primer* (2µL) (Invitrogen Life Technologies), 1µL de BigDye Terminator Cycle Sequencing v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) e 2µL de seu respectivo tampão. A ciclagem térmica foi realizada em termociclador Mastercycler (Eppendorf), com condições de desnaturação inicial por 1 minuto a 96ºC, seguido de 30 ciclos de desnaturação por 15 segundos a 96ºC, anelamento por 15 segundos a 50ºC e extensão por 4 minuto a 60ºC.

Após as reações de sequenciamento, à 1µL de cada reação foi adicionado 10µL de formamida, para etapa de desnaturação a 95ºC por 5 minutos. Em seguida foi realizada eletroforese capilar utilizando sequenciador automático ABI3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA) e os resultados foram analisados em programa de computação específico denominado BioEdit (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html).

As sequências individuais foram comparadas com as respectivas sequências padrão contidas no NCBI, utilizando o programa de alinhamento ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/).

3.5 Análise Estatística

Com a finalidade de verificar se os cinco polimorfismos do estudo encontravam-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), foi usado o teste de Qui Quadrado.

Para as análises de associação, inicialmente foram criados os modelos genéticos. Considerando-se que o alelo polimórfico é o alelo menos frequente, podemos assumir esses três principais modelos de análise:

1) Modelo por contagem de Genótipos (ou Modelo de Genótipos), em que comparamos as frequências dos homozigotos para o alelo selvagem versus heterozigotos versus homozigotos para o alelo polimórfico entre os grupos estudados;

2) Modelo Dominante que faz a comparação da frequência de homozigotos para o alelo selvagem versus frequência de heterozigotos + homozigotos para o alelo polimórfico entre os grupos estudados. Nesse modelo avalia-se se o alelo polimórfico possui efeito dominante e somente uma cópia é necessária para manifestação do fenótipo avaliado;

3) Modelo Recessivo que faz a comparação da frequência de homozigotos para o alelo selvagem + frequência de heterozigotos versus frequência de homozigotos para o alelo polimórfico entre os grupos estudados. Nesse modelo investiga-se se o alelo polimórfico é recessivo e, portanto, são necessárias as duas cópias do alelo para manifestar o fenótipo.

Para verificar se houve associação dos cinco polimorfismos com as variáveis cor da pele, cor dos olhos e cor do cabelo (agrupando-se ou não as categorias), os testes de Qui-quadrado e/ou Exato de Fisher foram usados. O teste Exato de Fisher é uma correção do valor de p do teste do Qui-Quadrado quando o número de observações é pequeno (o valor de p do teste Exato de Fisher é usado quando aparecer N<5 em alguma casela da tabela).

Essas análises foram realizadas para os três modelos genéticos propostos (Modelos de Genótipo, Dominante e Recessivo).

Além disso, para todas as associações significantes foram realizados modelos de regressão logística binários (para as variáveis na forma binária, ou seja, com duas categorias) para calcular os valores de Odds Ratio (OR) e Intervalos de Confiança de 95%. Os estudos de regressão logística foram construídos no Modelo de Genótipos, Modelo Dominante e Modelo Recessivo para confirmar as associações, demonstrar o poder de significância e, portanto, identificar se o polimorfismo era capaz de predizer as variáveis fenotípicas. A variável cor do cabelo foi ajustada para as covariáveis sexo e/ou idade, e a variável cor dos olhos foi ajustada para idade.

Como consideramos como referência a cor da pele “negra”, a cor do cabelo “preto+castanho” e a cor dos olhos “castanhos”, os resultados foram interpretados da seguinte maneira: OR>1 indica que o polimorfismo é capaz de predizer as categorias “não negro”, “ruivo+loiro” e/ou “azul+verde”, respectivamente e OR<1 indica que o polimorfismo é capaz de predizer as categorias “negra”, “preto+castanho” e “castanhos” para as variáveis dependentes cor de pele, cabelo e olhos, respectivamente.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

A amostra total do estudo foi composta por 611 indivíduos não aparentados, com idade média de 35,26 anos ± 12,098, sendo a idade mínima 18 anos e a máxima 71 anos. O número de indivíduos do sexo feminino (n=398) foi maior que o número de indivíduos do sexo masculino (n=213).

Quanto à autodeclaração de cor de pele, 363 indivíduos disseram ter pele branca, enquanto que 170 declararam ter pele parda, 51 afirmaram ser negros e 27 falaram que têm cor de pele amarela, conforme demonstrado no Gráfico 1.

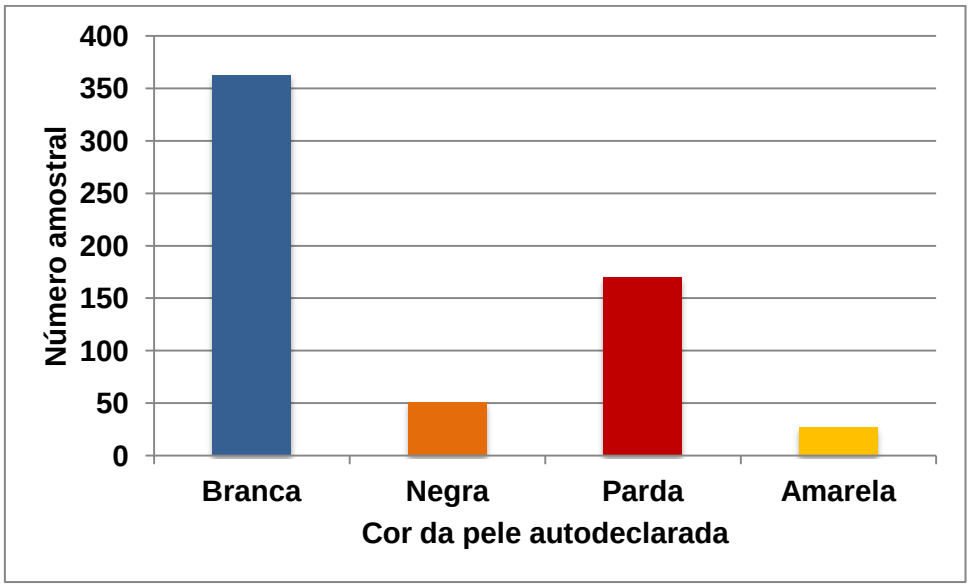


Gráfico 1: Número de indivíduos autodeclarados para cada uma das categorias de cor da pele.

Os dados sobre autorreferência da cor dos cabelos na nossa amostra mostraram os seguintes resultados: 488 indivíduos com cabelo castanho, 63 com cabelo preto, 49 com cabelo loiro e 11 ruivos (Gráfico 2).

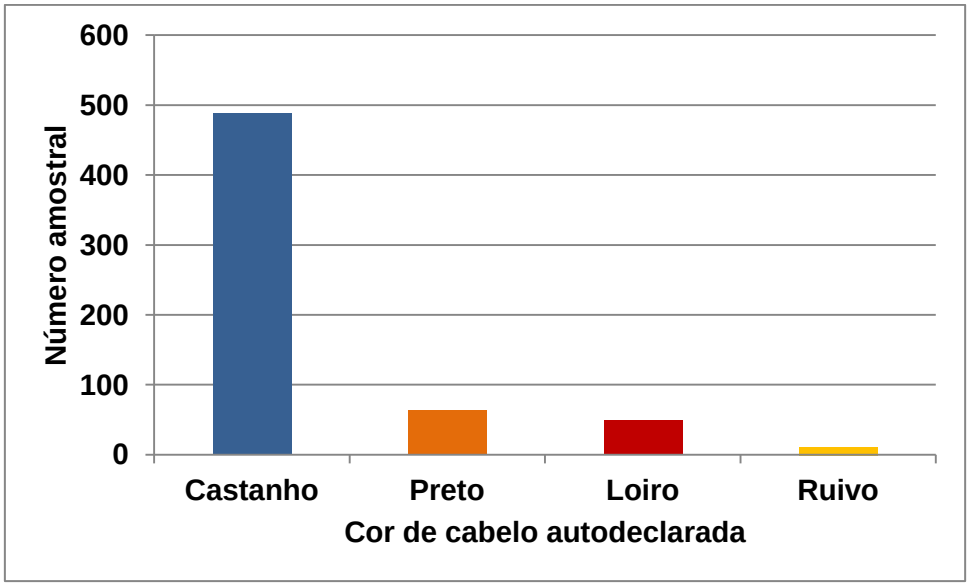


Gráfico 2: Número de indivíduos autodeclarados para cada uma das categorias de cor do cabelo.

A tabela com diferentes cores de olhos, apresentada aos voluntários, tem um total de 40 opções (Anexo E), dentre as quais os participantes do projeto apontaram somente uma, de acordo com a que mais se assemelhou a sua cor de olhos. Para a classificação final, as cores de olhos foram agrupadas em três categorias, sendo elas: castanho (n=478), verde (n=101) e azul (n=32) (Gráfico 3).

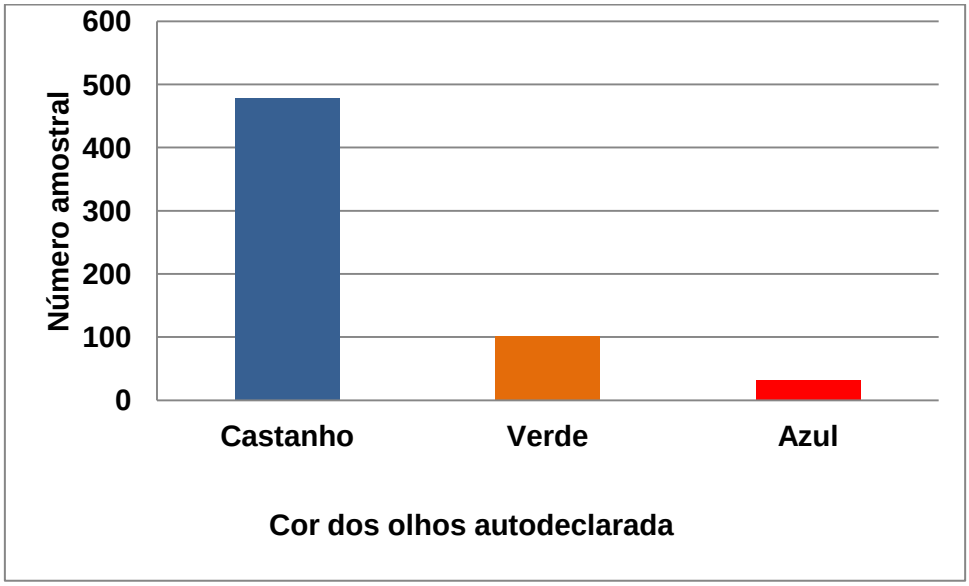


Gráfico 3: Número de indivíduos autodeclarados para cada uma das categorias de cor dos olhos.

Assim como descrito em Material e Métodos, as variáveis de cor da pele, cor do cabelo e cor dos olhos foram classificadas em categorias, que foram posteriormente subagrupadas para salientar as características mais distintas (por exemplo, cor de pele negra e não negra) a fim de verificar a capacidade de cada SNP em predizer tais características. A seguir estão descritas as associações encontradas para cada polimorfismo avaliado no presente estudo.

4.1 *SLC24A5*

Para o estudo dos polimorfismos rs1426654, rs2555364 e 16960620, presentes no gene *SLC24A5*, 601, 589 e 591 indivíduos, respectivamente, tiveram seu genótipo avaliado e comparado com as características de cor da pele, dos olhos e do cabelo. Essa diferença no número de amostras genotipadas se deve ao fato da não possibilidade de amplificação de certas amostras para determinados polimorfismos. Na Tabela 2 é possível verificar as frequências genotípicas dos polimorfismos estudados, a frequência do alelo polimórfico (*minor allele frequency*, MAF) e o resultado do teste de Qui-Quadrado realizado para verificar se os polimorfismos encontravam-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, na amostra total do estudo.

Tabela 2: Descrição das frequências genotípicas e alélicas (minor allele frequency, MAF), e do resultado do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, para a amostra total estudada para os SNPs do gene *SLC24A5*.

Gene (Polimorfismo)	Genótipos	N	(%)	MAF	EHW	
					X^2	p
SLC24A5 (rs16960620)	AA	587	99,3	0,004	93,36	**<0,001***
	AG	3	0,5			
	GG	1	0,2			
	Total	591	100			
SLC24A5 (rs2555364)	CC	24	4,1	0,132	24,04	**<0,001***
	CG	108	18,3			
	GG	457	77,6			
	Total	589	100			
SLC24A5 (rs1426654)	GG	58	9,7	0,215	53,8	**<0,001***
	GA	142	23,6			
	AA	401	66,7			
	Total	601	100			

N: número de indivíduos; MAF: *Minor allele frequency* (frequência do alelo polimórfico); EHW: Equilíbrio de Hardy Weinberg; *p<0,05.

Nas Tabelas (3, 4 e 5), estão apresentados os resultados em relação à comparação dos genótipos do SNP rs16960620, com as características externamente visíveis, e os resultados das associações encontradas.

Tabela 3: Resultado das associações entre o polimorfismo rs16960620 (*SLC24A5*) e as variáveis Cor de pele, olhos e cabelos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo de Genótipos.

Variável	Categoria		*SLC24A5* rs16960620			Total	χ^2	p	pFisher
			AA	AG	GG				
Cor da pele	Negro	N	48	0	0	48	49,927	**<0,001***	**0,001**
		%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%			
	Branco	N	348	1	0	349			
		%	99,7%	0,3%	0,0%	100,0%			
	Pardo	N	168	0	0	168			
		%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%			
	Amarelo	N	23	2	1	26			
		%	88,5%	7,7%	3,8%	100,0%			
	Total	N	587	3	1	591			
		%	99,3%	0,5%	0,2%	100,0%			
Cor da pele agrupado	Negro	N	48	0	0	48	0,356	0,837	1
		%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%			
	Não negro	N	539	3	1	543			
		%	99,3%	0,6%	0,2%	100,0%			
	Total	N	587	3	1	591			
		%	99,3%	0,5%	0,2%	100,0%			
Cor dos cabelos	Preto	N	61	1	0	62	2,113	0,909	0,599
		%	98,4%	1,6%	0,0%	100,0%			
	Castanho	N	468	2	1	471			
		%	99,4%	0,4%	0,2%	100,0%			
	Ruivo	N	10	0	0	10			
		%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%			
	Loiro	N	48	0	0	48			
		%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%			
	Total	N	587	3	1	591			
		%	99,3%	0,5%	0,2%	100,0%			
Cor de cabelo agrupado	Preto+Castanho	N	529	3	1	533	0,438	0,803	1
		%	99,2%	0,6%	0,2%	100,0%			
	Ruivo+Loiro	N	58	0	0	58			
		%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%			
	Total	N	587	3	1	591			
		%	99,3%	0,5%	0,2%	100,0%			

N: Número de indivíduos; *p<0,05.

Tabela 3 continua.

Continuação da Tabela 3: Resultado das associações entre o polimorfismo rs16960620 (*SLC24A5*) e as variáveis Cor de pele, olhos e cabelos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo de Genótipos.

Variável	Categoria		*SLC24A5* rs16960620			Total	χ^2	p	pFisher
			AA	AG	GG				
Cor dos olhos categórico	Castanho escuro	N	282	3	1	286	4,295	0,83	0,88
		%	98,6%	1,0%	0,3%	100,0%			
	Castanho médio	N	107	0	0	107			
		%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%			
	Castanho claro	N	70	0	0	70			
		%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%			
	Verde	N	97	0	0	97			
		%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%			
	Azul	N	31	0	0	31			
		%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%			
	Total	N	587	3	1	591			
		%	99,3%	0,5%	0,2%	100,0%			
Cor dos olhos agrupado	Castanhos	N	459	3	1	463	1,113	0,573	1
		%	99,1%	0,6%	0,2%	100,0%			
	Azul+Verde	N	128	0	0	128			
		%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%			
	Total	N	587	3	1	591			
		%	99,3%	0,5%	0,2%	100,0%			

N: Número de indivíduos; *p<0,05.

Tabela 4: Resultado das associações entre o polimorfismo rs16960620 (*SLC24A5*) e as variáveis Cor de pele, olhos e cabelos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo Dominante.

Variável	Categoria		***SLC24A5* rs16960620 Dominante**		Total	χ^2	p	pFisher
			AA	**AG+GG**				
Cor da pele	Negro	N	48	0	48	47,892	**<0,001***	**<0,001***
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Branco	N	348	1	349			
		%	99,7%	0,3%	100,0%			
	Pardo	N	168	0	168			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Amarelo	N	23	3	26			
		%	88,5%	11,5%	100,0%			
	Total	N	587	4	591			
		%	99,3%	0,7%	100,0%			
Cor da pele agrupado	Negro	N	48	0	48	0,356	0,551	1
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Não negro	N	539	4	543			
		%	99,3%	0,7%	100,0%			
	Total	N	587	4	591			
		%	99,3%	0,7%	100,0%			
Cor dos cabelos	Preto	N	61	1	62	1,215	0,75	0,599
		%	98,4%	1,6%	100,0%			
	Castanho	N	468	3	471			
		%	99,4%	0,6%	100,0%			
	Ruivo	N	10	0	10			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Loiro	N	48	0	48			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Total	N	587	4	591			
		%	99,3%	0,7%	100,0%			
Cor de cabelo agrupado	Preto+Castanho	N	529	4	533	0,438	0,508	1
		%	99,2%	0,8%	100,0%			
	Ruivo+Loiro	N	58	0	58			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Total	N	587	4	591			
		%	99,3%	0,7%	100,0%			

N: Número de indivíduos; *p<0,05.

Tabela 4 continua.

Continuação da Tabela 4: Resultado das associações entre o polimorfismo rs16960620 (*SLC24A5*) e as variáveis Cor de pele, olhos e cabelos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo Dominante.

Variável	Categoria		*SLC24A5* rs16960620 Dominante		Total	χ^2	p	pFisher
			AA	AG+GG				
Cor dos olhos categórico	Castanho escuro	N	282	4	286	4,295	0,368	0,648
		%	98,6%	1,4%	100,0%			
	Castanho médio	N	107	0	107			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Castanho claro	N	70	0	70			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Verde	N	97	0	97			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Azul	N	31	0	31			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Total	N	587	4	591			
		%	99,3%	0,7%	100,0%			
Cor dos olhos agrupado	Castanhos	N	459	4	463	1,113	0,291	0,582
		%	99,1%	0,9%	100,0%			
	Azul+Verde	N	128	0	128			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Total	N	587	4	591			
		%	99,3%	0,7%	100,0%			

N: Número de indivíduos; *p<0,05.

Tabela 5: Resultado das associações entre o polimorfismo rs16960620 (*SLC24A5*) e as variáveis Cor de pele, olhos e cabelos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo Recessivo.

Variável	Categoria		***SLC24A5* rs16960620_Recessivo**		**Total**	χ^2	**p**	**pFisher**
			AA+AG	**GG**				
Cor da pele	Negro	N	48	0	48	21,768	**0,041***	**0,041***
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Branco	N	349	0	349			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Pardo	N	168	0	168			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Amarelo	N	25	1	26			
		%	96,2%	3,8%	100,0%			
	Total	N	590	1	591			
		%	99,8%	0,2%	100,0%			
Cor da pele agrupado	Negro	N	48	0	48	0,089	0,766	1
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Não negro	N	542	1	543			
		%	99,8%	0,2%	100,0%			
	Total	N	590	1	591			
		%	99,8%	0,2%	100,0%			
Cor dos cabelos	Preto	N	62	0	62	0,255	0,968	1
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Castanho	N	470	1	471			
		%	99,8%	0,2%	100,0%			
	Ruivo	N	10	0	10			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Loiro	N	48	0	48			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Total	N	590	1	591			
		%	99,8%	0,2%	100,0%			
Cor de cabelo agrupado	Preto+Castanho	N	532	1	533	0,109	0,741	0,649
		%	99,8%	0,2%	100,0%			
	Ruivo+Loiro	N	58	0	58			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Total	N	590	1	591			
		%	99,8%	0,2%	100,0%			

N: Número de indivíduos; *p<0,05.

Tabela 5 continua.

Continuação da Tabela 5: Resultado das associações entre o polimorfismo rs16960620 (*SLC24A5*) e as variáveis Cor de pele, olhos e cabelos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo Recessivo.

Variável	Categoria		*SLC24A5* rs16960620_Recessivo		Total	χ^2	p	pFisher
			AA+AG	GG				
Cor dos olhos categórico	Castanho escuro	N	285	1	286	1,068	0,899	1
		%	99,7%	0,3%	100,0%			
	Castanho médio	N	107	0	107			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Castanho claro	N	70	0	70			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Verde	N	97	0	97			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Azul	N	31	0	31			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Total	N	590	1	591			
		%	99,8%	0,2%	100,0%			
Cor dos olhos agrupado	Castanhos	N	462	1	463	0,277	0,599	1
		%	99,8%	0,2%	100,0%			
	Azul+Verde	N	128	0	128			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Total	N	590	1	591			
		%	99,8%	0,2%	100,0%			

N: Número de indivíduos; *p<0,05.

Foram encontradas associações significantes entre o polimorfismo rs16960620 (*SLC24A5*) e a variável cor da pele (p<0,05), nos três Modelos usados para as análises. No entanto, estes resultados devem ser analisados com muita cautela, pois apenas 3 indivíduos apresentam genótipo heterozigoto e 1 homozigoto para o alelo polimórfico (GG). Não foram detectadas associações entre o polimorfismo e as variáveis na forma agrupada em 2 categorias e, portanto, não foram realizados modelos de regressão logística binários para predizer as variáveis dependentes.

A Tabela 6 mostra as associações encontradas do SNP rs2555364 com a cor da pele, cor do cabelo e cor dos olhos, usando o Modelo de Genótipos

Tabela 6: Resultado das associações entre o polimorfismo rs2555364 (*SLC24A5*) e as variáveis Cor de pele, olhos e cabelos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo de Genótipos.

Variável	Categoria		*SLC24A5* rs2555364			Total	X^2	p	pFisher
			CC	CG	GG				
Cor da pele	Negro	N	9	20	19	48	122,424	**<0,001***	**<0,001***
		%	18,8%	41,7%	39,6%	100,0%			
	Branco	N	4	26	318	348			
		%	1,1%	7,5%	91,4%	100,0%			
	Pardo	N	7	53	108	168			
		%	4,2%	31,5%	64,3%	100,0%			
	Amarelo	N	4	9	12	25			
		%	16,0%	36,0%	48,0%	100,0%			
	Total	N	24	108	457	589			
		%	4,1%	18,3%	77,6%	100,0%			
Cor da pele agrupado	Negro	N	9	20	19	48	52,863	**<0,001***	**<0,001***
		%	18,8%	41,7%	39,6%	100,0%			
	Não negro	N	15	88	438	541			
		%	2,8%	16,3%	81,0%	100,0%			
	Total	N	24	108	457	589			
		%	4,1%	18,3%	77,6%	100,0%			
Cor dos cabelos	Preto	N	6	22	33	61	34,714	**<0,001***	**<0,001***
		%	9,8%	36,1%	54,1%	100,0%			
	Castanho	N	18	85	367	470			
		%	3,8%	18,1%	78,1%	100,0%			
	Ruivo	N	0	1	9	10			
		%	0,0%	10,0%	90,0%	100,0%			
	Loiro	N	0	0	48	48			
		%	0,0%	0,0%	100,0%	100,0%			
	Total	N	24	108	457	589			
		%	4,1%	18,3%	77,6%	100,0%			
Cor de cabelo agrupado	Preto+Castanho	N	24	107	400	531	15,852	**<0,001***	**0,001**
		%	4,5%	20,2%	75,3%	100,0%			
	Ruivo+Loiro	N	0	1	57	58			
		%	0,0%	1,7%	98,3%	100,0%			
	Total	N	24	108	457	589			
		%	4,1%	18,3%	77,6%	100,0%			

N: Número de indivíduos; *p<0,05.

Tabela 6 continua.

Continuação da Tabela 6: Resultado das associações entre o polimorfismo rs2555364 (*SLC24A5*) e as variáveis Cor de pele, olhos e cabelos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo de Genótipos.

Variável	Categoria		*SLC24A5* rs2555364			Total	χ^2	p	pFisher
			CC	CG	GG				
Cor dos olhos categórico	Castanho escuro	N	19	89	178	286	82,575	**<0,001***	**<0,001***
		%	6,6%	31,1%	62,2%	100,0%			
	Castanho médio	N	2	14	90	106			
		%	1,9%	13,2%	84,9%	100,0%			
	Castanho claro	N	3	1	66	70			
		%	4,3%	1,4%	94,3%	100,0%			
	Verde	N	0	3	92	95			
		%	0,0%	3,2%	96,8%	100,0%			
	Azul	N	0	1	30	31			
		%	0,0%	3,2%	96,8%	100,0%			
	Total	N	24	108	456	588			
		%	4,1%	18,4%	77,6%	100,0%			
Cor dos olhos agrupado	Castanhos	N	24	104	334	462	34,38	**<0,001***	**<0,001***
		%	5,2%	22,5%	72,3%	100,0%			
	Azul+Verde	N	0	4	122	126			
		%	0,0%	3,2%	96,8%	100,0%			
	Total	N	24	108	456	588			
		%	4,1%	18,4%	77,6%	100,0%			

N: Número de indivíduos; *p<0,05.

Foram encontradas associações significantes entre o polimorfismo rs2555364 (*SLC24A5*) e as variáveis: cor da pele, cor dos cabelos e cor dos olhos (p<0,05), no Modelo de Genótipos. Foram construídos modelos de regressão logística binária (Tabela 7) para identificar se o polimorfismo era capaz de predizer essas variáveis fenotípicas.

Tabela 7: Modelo de regressão logística para identificar se o polimorfismo rs2555364 (*SLC24A5*) foi capaz de predizer cor da pele, cor do cabelo e cor dos olhos no Modelo de Genótipos.

Variável		p	OR	95% IC	
				Inferior	Superior
Cor da pele	IDADE	0,07	0,98	0,96	1,00
	*SLC24A5*_rs2555364 (CG/CC)	**0,044***	**2,70**	1,03	7,10
	*SLC24A5*_rs2555364 (GG/CC)	**<0,001***	**14,24**	5,48	36,97
Cor do cabelo	IDADE	**0,015***	1,03	1,01	1,05
	SEXO (fem/masc)	0,061	1,87	0,97	3,58
	*SLC24A5*_rs2555364 (CG/CC)	0,998	-	-	-
	*SLC24A5*_rs2555364 (GG/CC)	0,998	-	-	-
Cor dos olhos	*SLC24A5*_rs2555364 (CG/CC)	0,998	-	-	-
	*SLC24A5*_rs2555364 (GG/CC)	0,998	-	-	-

OR: Odds Ratio; 95% IC: Intervalo de Confiança de 95%; ajustado Idade; *p<0,05.

O polimorfismo rs2555364 foi associado com significância estatística com cor da pele em modelo de regressão logística binária, após ajustado para Idade (p<0,05), de modo que os genótipos heterozigoto e homozigoto GG foram capazes de predizer a cor da pele “não negra”, apresentando chance 2,7 e 14 vezes maior, respectivamente, de predizer a cor “não-negra” em relação aos homozigotos CC.

Para a cor do cabelo e para a cor dos olhos, o modelo de regressão logística binária não pôde ser ajustado, uma vez que uma das categorias não possuía nenhum indivíduo.

Na Tabela 8 são apresentados os resultados encontrados para o SNP rs2555364 (*SLC24A5*) no Modelo Dominante para estudos de associação genética deste polimorfismo com as EVCs avaliadas neste trabalho

Tabela 8: Resultado das associações entre o polimorfismo rs2555364 (SLC24A5) e as variáveis cor de pele, cabelo e olhos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo Dominante.

Variável	Categoria		*SCL24A5* rs2555364 Dominante		Total	χ^2	p	pFisher
			CC	CG+GG				
Cor da pele	Negro	N	9	39	48	43,166	**<0,001***	**<0,001***
		%	18,8%	81,3%	100,0%			
	Branco	N	4	344	348			
		%	1,1%	98,9%	100,0%			
	Pardo	N	7	161	168			
		%	4,2%	95,8%	100,0%			
	Amarelo	N	4	21	25			
		%	16,0%	84,0%	100,0%			
	Total	N	24	565	589			
		%	4,1%	95,9%	100,0%			
Cor da pele agrupado	Negro	N	9	39	48	28,79	**<0,001***	**<0,001***
		%	18,8%	81,3%	100,0%			
	Não negro	N	15	526	541			
		%	2,8%	97,2%	100,0%			
	Total	N	24	565	589			
		%	4,1%	95,9%	100,0%			
Cor dos cabelos	Preto	N	6	55	61	7,716	0,079	0,052
		%	9,8%	90,2%	100,0%			
	Castanho	N	18	452	470			
		%	3,8%	96,2%	100,0%			
	Ruivo	N	0	10	10			
		%	0,0%	100,0%	100,0%			
	Loiro	N	0	48	48			
		%	0,0%	100,0%	100,0%			
	Total	N	24	565	589			
		%	4,1%	95,9%	100,0%			
Cor de cabelo agrupado	Preto+Castanho	N	24	507	531	2,733	0,155	0,098
		%	4,5%	95,5%	100,0%			
	Ruivo+Loiro	N	0	58	58			
		%	0,0%	100,0%	100,0%			
	Total	N	24	565	589			
		%	4,1%	95,9%	100,0%			

N: Número de indivíduos; *p<0,05.

Tabela 8 continua.

Continuação da Tabela 8: Resultado das associações entre o polimorfismo rs2555364 (SLC24A5) e as variáveis cor de pele, cabelo e olhos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo Dominante.

Variável	Categoria		*SCL24A5* rs2555364 Dominante		Total	χ^2	p	pFisher
			CC	CG+GG				
Cor dos olhos categórico	Castanho escuro	N	19	267	286	11,529	**0,021***	**0,015***
		%	6,6%	93,4%	100,0%			
	Castanho médio	N	2	104	106			
		%	1,9%	98,1%	100,0%			
	Castanho claro	N	3	67	70			
		%	4,3%	95,7%	100,0%			
	Verde	N	0	96	96			
		%	0,0%	100,0%	100,0%			
	Azul	N	0	31	31			
		%	0,0%	100,0%	100,0%			
	Total	N	24	565	589			
		%	4,1%	95,9%	100,0%			
Cor dos olhos agrupado	Castanhos	N	24	438	462	6,878	**0,009***	**0,004***
		%	5,2%	94,8%	100,0%			
	Azul+Verde	N	0	127	127			
		%	0,0%	100,0%	100,0%			
	Total	N	24	565	589			
		%	4,1%	95,9%	100,0%			

N: Número de indivíduos; *p<0,05.

No Modelo Dominante, foram encontradas associações significantes entre o polimorfismo rs2555364 (*SLC24A5*) e a variável: cor da pele (p<0,05). Foram então construídos modelos de regressão logística binária (Tabela 9) para identificar se o polimorfismo era capaz de predizer essas variáveis fenotípicas.

Tabela 9: Modelo de regressão logística para identificar se o polimorfismo rs2555364 (*SLC24A5*) foi capaz de predizer cor da pele e cor dos olhos no Modelo Dominante.

Variável		p	OR	95% IC	
				Inferior	Superior
Cor dos olhos	SLC24A5_rs2555364_dominate (CG+GG/CC)	0,998	-	-	-
Cor da pele	IDADE	0,069	0,98	0,96	1
	SLC24A5_rs2555364_dominante (CG+GG/CC)	**<0,001***	**8,31**	3,39	20,38

OR: Odds Ratio; 95% IC: Intervalo de Confiança de 95%; *p<0,05.

O polimorfismo rs2555364 foi significativamente associado à cor da pele em modelo de regressão logística binária, após ajustado para idade ($p<0,05$), de modo que a presença do alelo G foi capaz de predizer a cor da pele “não-negra” (chance 8,31 vezes maior em relação aos homozigotos CC). O modelo de regressão logística binária não pôde ser ajustado para a variável cor dos olhos no Modelo Dominante, uma vez que uma das categorias não possuía nenhum indivíduo.

A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos no Modelo Recessivo para a avaliação do SNP rs2555364 com relação as associações do polimorfismo com a cor da pele, cor dos olhos e cor do cabelo.

Tabela 10: Resultado das associações entre o polimorfismo rs2555364 (SLC24A5) e as variáveis cor da pele, cabelos e olhos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo Recessivo.

Variável	Categoria		SCL24A5 rs2555364 Recessivo		Total	χ^2	p	pFisher
			CC+CG	GG				
Cor da pele	Negro	N	29	19	48	107,619	**<0,001***	**<0,001***
		%	60,4%	39,6%	100,0%			
	Branco	N	30	318	348			
		%	8,6%	91,4%	100,0%			
	Pardo	N	60	108	168			
		%	35,7%	64,3%	100,0%			
	Amarelo	N	13	12	25			
		%	52,0%	48,0%	100,0%			
	Total	N	132	457	589			
		%	22,4%	77,6%	100,0%			
Cor da pele agrupado	Negro	N	29	19	48	43,411	**<0,001***	**<0,001***
		%	60,4%	39,6%	100,0%			
	Não negro	N	103	438	541			
		%	19,0%	81,0%	100,0%			
	Total	N	132	457	589			
		%	22,4%	77,6%	100,0%			
Cor dos cabelos	Preto	N	28	33	61	34,175	**<0,001***	**<0,001***
		%	45,9%	54,1%	100,0%			
	Castanho	N	103	367	470			
		%	21,9%	78,1%	100,0%			
	Ruivo	N	1	9	10			
		%	10,0%	90,0%	100,0%			
	Loiro	N	0	48	48			
		%	0,0%	100,0%	100,0%			
	Total	N	132	457	589			
		%	22,4%	77,6%	100,0%			
Cor de cabelo agrupado	Preto+Castanho	N	131	400	531	15,833	**<0,001***	**<0,001***
		%	24,7%	75,3%	100,0%			
	Ruivo+Loiro	N	1	57	58			
		%	1,7%	98,3%	100,0%			
	Total	N	132	457	589			
		%	22,4%	77,6%	100,0%			

N: Número de indivíduos; *p<0,05.

Tabela 10 continua.

Continuação da Tabela 10: Resultado das associações entre o polimorfismo rs2555364 (SLC24A5) e as variáveis cor da pele, cabelos e olhos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo Recessivo.

Variável	Categoria		SCL24A5 rs2555364 Recessivo		Total	χ^2	p	pFisher
			CC+CG	GG				
Cor dos olhos categórico	Castanho escuro	N	108	178	286	80,344	**<0,001***	**<0,001***
		%	37,8%	62,2%	100,0%			
	Castanho médio	N	16	90	106			
		%	15,1%	84,9%	100,0%			
	Castanho claro	N	4	66	70			
		%	5,7%	94,3%	100,0%			
	Verde	N	3	93	96			
		%	3,1%	96,9%	100,0%			
	Azul	N	1	30	31			
		%	3,2%	96,8%	100,0%			
	Total	N	132	457	589			
		%	22,4%	77,6%	100,0%			
Cor dos olhos agrupado	Castanhos	N	128	334	462	34,545	**<0,001***	**<0,001***
		%	27,7%	72,3%	100,0%			
	Azul+Verde	N	4	123	127			
		%	3,1%	96,9%	100,0%			
	Total	N	132	457	589			
		%	22,4%	77,6%	100,0%			

N: Número de indivíduos; *p<0,05.

Foram encontradas associações significantes entre o polimorfismo rs2555364 (*SLC24A5*) e as variáveis cor da pele, cor de cabelos e cor dos olhos (p<0,05), no Modelo Recessivo. Foram construídos modelos de regressão logística binária (Tabela 11) para identificar se este SNP era capaz de predizer essas variáveis fenotípicas.

Tabela 11: Modelo de regressão logística para identificar se o polimorfismo rs2555364 foi capaz de predizer cor da pele, cabelo e olhos no Modelo Recessivo.

Variável		p	OR	95% IC	
				Inferior	Superior
Cor da pele	IDADE	0,075	0,98	0,96	1,00
	SLC24A5_rs2555364_recessivo (GG/CC+CG)	**<0,001***	6,56	3,53	12,19
Cor do cabelo	IDADE	**0,015***	1,03	1,01	1,05
	Sexo (fem/masc)	0,061	1,87	0,97	3,58
	SLC24A5_rs2555364_recessivo (GG/CC+CG)	**0,004***	19,32	2,64	141,38
Cor dos olhos	SLC24A5_rs2555364_recessivo (GG/CC+CG)	**<0,001***	11,78	4,27	32,56

OR: *Odds Ratio*; 95% IC: Intervalo de Confiança de 95%.

Por meio da análise do Modelo Recessivo, observa-se que o polimorfismo rs2555364 (*SLC24A5*) foi significativamente associado com cor da pele em modelo de regressão logística binária, após ajustado para Idade (p<0,05), de modo que indivíduos com a presença de dois alelos ancestrais G (homizogotos GG) apresentaram 6,56 vezes maior chance de pertencerem à categoria cor da pele “não negra” do que indivíduos portadores do alelo C. Adicionalmente, este SNP foi significativamente associado com cor do cabelo em modelo de regressão logística binária, após ajustado para Sexo e Idade (p<0,05), de modo que indivíduos portadores de duas cópias do alelo G apresentaram 19 vezes mais chance de ter a cor de cabelo na categoria “ruivo+loiro” do que indivíduos portadores do alelo C. O mesmo SNP mostrou-se ainda significativamente associado a cor dos olhos em modelo de regressão logística binária (p<0,05), de modo que indivíduos portadores de duas cópias do alelo G apresentaram 11,78 vezes mais chance de pertencerem à categoria de cor de olhos “azul+verde” do que indivíduos portadores do alelo C.

Os resultados acima apresentados, em relação ao SNP rs2555364 salientam a relação do alelo C (ancestral) com características de pigmentação escura. Em contraste, o alelo G (variante) apresenta associação com características claras de cor de pele, olhos e cabelos.

Os resultados encontrados com o uso do Modelo de Genótipos para o polimorfismo rs1426654 são mostrados na Tabela 12.

Tabela 12: Resultado das associações entre o polimorfismo rs1426654 (SLC24A5) e as variáveis Cor de pele, olhos e cabelos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo de Genótipos.

Variável	Categoria		SLC24A5 rs1426654			Total	χ^2	p	pFisher
			GG	GA	AA				
Cor da pele	Negro	N	14	22	13	49	271,534	**<0,001***	**<0,001***
		%	28,6%	44,9%	26,5%	100,0%			
	Branco	N	7	52	296	355			
		%	2,0%	14,6%	83,4%	100,0%			
	Pardo	N	15	67	88	170			
		%	8,8%	39,4%	51,8%	100,0%			
	Amarelo	N	22	1	4	27			
		%	81,5%	3,7%	14,8%	100,0%			
	Total	N	58	142	401	601			
		%	9,7%	23,6%	66,7%	100,0%			
Cor da pele agrupado	Negro	N	14	22	13	49	42,923	**0,001***	**0,001***
		%	28,6%	44,9%	26,5%	100,0%			
	Não negro	N	44	120	388	552			
		%	8,0%	21,7%	70,3%	100,0%			
	Total	N	58	142	401	601			
		%	9,7%	23,6%	66,7%	100,0%			
Cor dos cabelos	Preto	N	18	23	21	62	60,184	**<0,001***	**<0,001***
		%	29,0%	37,1%	33,9%	100,0%			
	Castanho	N	40	113	327	480			
		%	8,3%	23,5%	68,1%	100,0%			
	Ruivo	N	0	4	7	11			
		%	0,0%	36,4%	63,6%	100,0%			
	Loiro	N	0	2	46	48			
		%	0,0%	4,2%	95,8%	100,0%			
	Total	N	58	142	401	601			
		%	9,7%	23,6%	66,7%	100,0%			
Cor de cabelo agrupado	Preto+Castanho	N	58	136	348	542	16,565	**<0,001***	**<0,001***
		%	10,7%	25,1%	64,2%	100,0%			
	Ruivo+Loiro	N	0	6	53	59			
		%	0,0%	10,2%	89,8%	100,0%			
	Total	N	58	142	401	601			
		%	9,7%	23,6%	66,7%	100,0%			

N: Número de indivíduos; *p<0,05.

Tabela 12 continua.

Continuação da Tabela 12: Resultado das associações entre o polimorfismo rs1426654 (SLC24A5) e as variáveis Cor de pele, olhos e cabelos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo de Genótipos.

Variável	Categoria		SLC24A5 rs1426654			Total	χ^2	p	pFisher
			GG	GA	AA				
Cor dos olhos categórico	Castanho escuro	N	50	106	136	292	118,943	**<0,001***	**<0,001***
		%	17,1%	36,3%	46,6%	100,0%			
	Castanho médio	N	3	25	81	109			
		%	2,8%	22,9%	74,3%	100,0%			
	Castanho claro	N	2	5	64	71			
		%	2,8%	7,0%	90,1%	100,0%			
	Verde	N	3	5	90	98			
		%	3,1%	5,1%	91,8%	100,0%			
	Azul	N	0	1	30	31			
		%	0,0%	3,2%	96,8%	100,0%			
	Total	N	58	142	401	601			
		%	9,7%	23,6%	66,7%	100,0%			
Cor dos olhos agrupado	Castanhos	N	55	136	281	472	51,195	**<0,001***	**<0,001***
		%	11,7%	28,8%	59,5%	100,0%			
	Azul+Verde	N	3	6	120	129			
		%	2,3%	4,7%	93,0%	100,0%			
	Total	N	58	142	401	601			
		%	9,7%	23,6%	66,7%	100,0%			

N: Número de indivíduos; *p<0,05.

Foram encontradas associações significantes entre o polimorfismo rs1426654 (*SLC24A5*) e as variáveis cor da pele, cor dos cabelos e cor dos olhos (p<0,05), no Modelo de Genótipos. Modelos de regressão logística binária (Tabela 13) foram construídos para identificar se o polimorfismo era capaz de predizer essas variáveis fenotípicas.

Tabela 13: Modelo de regressão logística para identificar se o polimorfismo rs1426654 foi capaz de predizer cor da pele, cabelo e olhos no Modelo de Genótipos.

Variável		p	OR	95% IC	
				Inferior	Superior
Cor da pele	IDADE	0,022*	0,97	0,95	1,00
	SLC24A5_rs1426654 (GA/GG)	0,189	1,67	0,78	3,58
	SLC24A5_rs1426654 (AA/GG)	**<0,001***	**9,89**	4,33	22,57
Cor do cabelo	IDADE	0,028	1,03	1,00	1,05
	SEXO (fem/masc)	0,055	1,89	0,99	3,62
	SLC24A5_rs1426654 (GA/GG)	0,997	-	-	-
	SLC24A5_rs1426654 (AA/GG)	0,997	-	-	-
Cor dos olhos	SLC24A5_rs1426654 (GA/GG)	0,770	0,81	0,20	3,35
	SLC24A5_rs1426654 (AA/GG)	**0,001***	**7,83**	2,40	25,52

OR: Odds Ratio; 95% IC: Intervalo de Confiança de 95%; ajustado Idade; *p<0,05.

O polimorfismo rs1426654 (SLC24A5) foi significativamente associado a cor da pele em modelo de regressão logística binária para o Modelo de Genótipos, após ajustado para Idade (p<0,05), de modo que o genótipo homozigoto AA (variante) apresentou-se capaz de predizer a cor da pele “não-negra” (9,89 vezes maior chance em relação aos indivíduos com genótipo GG). Para a predição de cor do cabelo, o modelo de regressão logística binária não pôde ser ajustado para essa variável, uma vez que uma das categorias não possuía nenhum indivíduo. Com relação a cor dos olhos, este SNP mostrou associação significante com o uso do modelo de regressão logística, binária (p<0,05), de modo que o genótipo homozigoto AA (variante) foi capaz de predizer a cor de olhos “azul+verde” (7,83 vezes maior chance em relação aos indivíduos com genótipo GG).

A Tabela 14 mostra os resultados encontrados para o SNP rs1426654 com relação às associações deste polimorfismo com as EVCs aqui avaliadas no Modelo Dominante.

Tabela 14: Resultado das associações entre o polimorfismo rs1426654 (SLC24A5) e as variáveis Cor de pele, olhos e cabelos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo Dominante.

Variável	Categoria		SCL24A5 rs1426654 Dominante		Total	χ^2	p	pFisher
			GG	GA+AA				
Cor da pele	Negro	N	14	35	49	204,033	**<0,001***	**<0,001***
		%	28,6%	71,4%	100,0%			
	Branco	N	7	348	355			
		%	2,0%	98,0%	100,0%			
	Pardo	N	15	155	170			
		%	8,8%	91,2%	100,0%			
	Amarelo	N	22	5	27			
		%	81,5%	18,5%	100,0%			
	Total	N	58	543	601			
		%	9,7%	90,3%	100,0%			
Cor da pele agrupado	Negro	N	14	35	49	21,905	**0,001***	**0,001***
		%	28,6%	71,4%	100,0%			
	Não negro	N	44	508	552			
		%	8,0%	92,0%	100,0%			
	Total	N	58	543	601			
		%	9,7%	90,3%	100,0%			
Cor dos cabelos	Preto	N	18	44	62	33,969	**<0,001***	**<0,001***
		%	29,0%	71,0%	100,0%			
	Castanho	N	40	440	480			
		%	8,3%	91,7%	100,0%			
	Ruivo	N	0	11	11			
		%	0,0%	100,0%	100,0%			
	Loiro	N	0	48	48			
		%	0,0%	100,0%	100,0%			
	Total	N	58	543	601			
		%	9,7%	90,3%	100,0%			
Cor de cabelo agrupado	Preto+Castanho	N	58	484	542	6,988	**0,004***	**0,008***
		%	10,7%	89,3%	100,0%			
	Ruivo+Loiro	N	0	59	59			
		%	0,0%	100,0%	100,0%			
	Total	N	58	543	601			
		%	9,7%	90,3%	100,0%			

N: Número de indivíduos; *p<0,05.

Tabela 14 continua.

Continuação da Tabela 14: Resultado das associações entre o polimorfismo rs1426654 (SLC24A5) e as variáveis Cor de pele, olhos e cabelos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo Dominante.

Variável	Categoria		SCL24A5 rs1426654 Dominante		Total	χ^2	p	pFisher
			GG	GA+AA				
Cor dos olhos categórico	Castanho escuro	N	50	242	292	36,644	**<0,001***	**<0,001***
		%	17,1%	82,9%	100,0%			
	Castanho médio	N	3	106	109			
		%	2,8%	97,2%	100,0%			
	Castanho claro	N	2	69	71			
		%	2,8%	97,2%	100,0%			
	Verde	N	3	95	98			
		%	3,1%	96,9%	100,0%			
	Azul	N	0	31	31			
		%	0,0%	100,0%	100,0%			
	Total	N	58	543	601			
		%	9,7%	90,3%	100,0%			
Cor dos olhos agrupado	Castanhos	N	55	417	472	10,108	**0,001***	**0,001***
		%	11,7%	88,3%	100,0%			
	Azul+Verde	N	3	126	129			
		%	2,3%	97,7%	100,0%			
	Total	N	58	543	601			
		%	9,7%	90,3%	100,0%			

N: Número de indivíduos; *p<0,05.

O Modelo Dominante mostrou associações significantes entre o polimorfismo rs1426654 (SLC24A5) e as variáveis cor da pele, cor dos cabelos e cor dos olhos (p<0,05), portanto foram construídos modelos de regressão logística binária (Tabela 15) para identificar se o polimorfismo era capaz de predizer tais variáveis fenotípicas.

Tabela 15: Modelo de regressão logística para identificar se o polimorfismo rs1426654 foi capaz de predizer cor da pele, no Modelo Dominante.

Variável		p	OR	95% IC	
				Inferior	Superior
Cor da pele	IDADE	0,06	0,98	0,96	1,00
	SLC24A5_rs1426654_dominate (GA+AA/GG)	**<0,001***	**4,68**	2,33	9,39
Cor do cabelo	SEXO (fem/masc)	0,059	1,86	0,98	3,56
	IDADE	**0,018***	1,03	1,01	1,05
	SLC24A5_rs1426654_dominante (GA+AA/GG)	0,997	-	-	-
Cor dos olhos	SLC24A5_rs1426654_dominate (GA+AA/GG)	**0,004***	**5,54**	1,70	18,01

OR: Odds Ratio; 95% IC: Intervalo de Confiança de 95%; *p<0,05.

O polimorfismo rs1426654 foi significativamente associado à cor da pele em modelo de regressão logística binária feito para o Modelo Dominante, após ajustado para Idade (p<0,05), de modo que indivíduos portadores do alelo variante A apresentaram 4,68 vezes maior chance de apresentar a cor da pele “não-negra” em relação aos homozigotos GG (ancestral). Para a característica de cor do cabelo, o modelo de regressão logística binária não pôde ser ajustado, uma vez que uma das categorias não possuía nenhum indivíduo. Este SNP foi ainda significativamente associado a cor dos olhos em modelo de regressão logística binária, feito para o Modelo Dominante, (p<0,05), de modo que indivíduos portadores do alelo variante A apresentaram chance 5,54 vezes maior de apresentar a cor de olhos “azul+verde”, em relação aos homozigotos GG (ancestral).

Os resultados para o Modelo Recessivo do SNP rs1426654 com relação às suas associações com a cor da pele, cor do cabelo e cor dos olhos são exibidos na Tabela 16.

Tabela 16: Resultado das associações entre o polimorfismo rs1426654 (SLC24A5) e as variáveis cor da pele, olhos e cabelos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo Recessivo.

Variável	Categoria		SCL24A5 rs1426654 Recessivo		Total	χ^2	p	pFisher
			GG+GA	AA				
Cor da pele	Negro	N	36	13	49	129,908	**<0,001***	**<0,001***
		%	73,5%	26,5%	100,0%			
	Branco	N	59	296	355			
		%	16,6%	83,4%	100,0%			
	Pardo	N	82	88	170			
		%	48,2%	51,8%	100,0%			
	Amarelo	N	23	4	27			
		%	85,2%	14,8%	100,0%			
	Total	N	200	401	601			
		%	33,3%	66,7%	100,0%			
Cor da pele agrupado	Negro	N	36	13	49	38,813	**0,001***	**0,001***
		%	73,5%	26,5%	100,0%			
	Não negro	N	164	388	552			
		%	29,7%	70,3%	100,0%			
	Total	N	200	401	601			
		%	33,3%	66,7%	100,0%			
Cor dos cabelos	Preto	N	41	21	62	48,928a	**<0,001***	**<0,001***
		%	66,1%	33,9%	100,0%			
	Castanho	N	153	327	480			
		%	31,9%	68,1%	100,0%			
	Ruivo	N	4	7	11			
		%	36,4%	63,6%	100,0%			
	Loiro	N	2	46	48			
		%	4,2%	95,8%	100,0%			
	Total	N	200	401	601			
		%	33,3%	66,7%	100,0%			
Cor de cabelo agrupado	Preto+Castanho	N	194	348	542	15,734	**<0,001***	**<0,001***
		%	35,8%	64,2%	100,0%			
	Ruivo+Loiro	N	6	53	59			
		%	10,2%	89,8%	100,0%			
	Total	N	200	401	601			
		%	33,3%	66,7%	100,0%			

N: Número de indivíduos; *p<0,05.

Tabela 16 continua.

Continuação da Tabela 16: Resultado das associações entre o polimorfismo rs1426654 (SLC24A5) e as variáveis cor da pele, olhos e cabelos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo Recessivo.

Variável	Categoria		SCL24A5 rs1426654 Recessivo		Total	χ^2	p	pFisher
			GG+GA	AA				
Cor dos olhos categórico	Castanho escuro	N	156	136	292	114,192	**<0,001***	**<0,001***
		%	53,4%	46,6%	100,0%			
	Castanho médio	N	28	81	109			
		%	25,7%	74,3%	100,0%			
	Castanho claro	N	7	64	71			
		%	9,9%	90,1%	100,0%			
	Verde	N	8	90	98			
		%	8,2%	91,8%	100,0%			
	Azul	N	1	30	31			
		%	3,2%	96,8%	100,0%			
	Total	N	200	401	601			
		%	33,3%	66,7%	100,0%			
Cor dos olhos agrupado	Castanhos	N	191	281	472	51,174	**<0,001***	**<0,001***
		%	40,5%	59,5%	100,0%			
	Azul+Verde	N	9	120	129			
		%	7,0%	93,0%	100,0%			
	Total	N	200	401	601			
		%	33,3%	66,7%	100,0%			

N: Número de indivíduos; *p<0,05.

No Modelo Recessivo, foram encontradas associações significantes entre o polimorfismo rs1426654 (SLC24A5) e as variáveis cor da pele, cor dos cabelos e cor dos olhos (p<0,05), logo, modelos de regressão logística binária (Tabela 17) foram construídos para identificar se o polimorfismo era capaz de predizer essas variáveis fenotípicas.

Tabela 17: Modelo de regressão logística para identificar se o polimorfismo rs1426654 foi capaz de predizer cor da pele, cabelo e olhos no Modelo Recessivo.

Variável		p	OR	95% IC	
				Inferior	Superior
Cor da pele	IDADE	0,018	0,97	0,95	1,00
	SLC24A5_rs1426654_recessivo (AA/GG+GA)	**<0,001***	**7,03**	3,61	13,71
Cor do cabelo	IDADE	**0,031***	**1,02**	1,00	1,05
	SEXO (fem/masc)	0,052	1,91	1,00	3,65
	SLC24A5_rs1426654_recessivo (AA/GG+GA)	**<0,001***	**4,77**	2,01	11,33
Cor dos olhos	SLC24A5_rs1426654_recessivo (AA/GG+GA)	**<0,001***	**9,06**	4,49	18,29

OR: Odds Ratio; 95% IC: Intervalo de Confiança de 95%; *p<0,05.

O polimorfismo rs1426654, presente no gene *SLC24A5,* foi significativamente associado a cor da pele em modelo de regressão logística binária feito para o Modelo Recessivo, após ajustado para Idade (p<0,05), de modo que indivíduos portadores de dois alelos A (variante) (homozigotos AA) apresentaram chance 7,03 maior de apresentar a cor da pele “não-negra”, em relação aos portadores do alelo G (ancestral). Para a EVC de cor do cabelo, esse SNP mostrou associação significante, com o uso de modelo de regressão logística binária, após ajustado para Sexo e Idade (p<0,05), de modo que indivíduos portadores de dois alelos variantes A (homozigotos AA) apresentaram chance 4,77 maior de apresentar a cor de cabelo “ruivo+loiro”, em relação aos portadores do alelo G (ancestral).

Com relação a característica de cor de olhos, o SNP rs1426654 apresentou associação significativamente estatística em modelo de regressão logística binária (p<0,05), de modo que indivíduos portadores de dois alelos variantes A (homozigotos AA) apresentaram chance 9,06 maior de pertencerem ao grupo de cor de olhos “azul+verde”, em relação aos portadores do alelo G (ancestral)

Esses resultados confirmam a associação do alelo ancestral G com características de pigmentação escura, enquanto, em contrapartida, temos o alelo A associado a características de pigmentação clara.

4.2 *ASIP*

No total, amostras de 596 participantes foram avaliadas para o estudo do SNP rs6058017 e as frequências alélicas e genotípicas, bem como o resultado do cálculo de Qui-Quadrado, feito a fim de averiguar se o SNP apresenta EHW, são descritos na Tabela 18.

Tabela 18: Descrição das frequências genotípicas e alélicas (minor allele frequency, MAF), e do resultado do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, para a amostra estudada para o SNP do gene *ASIP*.

Gene (Polimorfismo)	Genótipos	N	(%)	MAF	EHW	
					X^2	P
ASIP (rs6058017)	GG	22	3,7	0,164	3,28	0,070
	GA	151	25,3			
	AA	423	71,0			
	Total	596	100			

N: número de indivíduos; MAF: *Minor allele frequency* (frequência do alelo polimórfico); EHW: Equilíbrio de Hardy Weinberg; *p<0,05.

A análise do Modelo de Genótipos, mostrou associação do SNP rs6058017, com as características de cor da pele e olhos (Tabela 19).

Tabela 19: Resultado das associações entre o polimorfismo rs6058017 (ASIP) e as variáveis cor da pele, olhos e cabelos (também na forma agrupada em duas categorias), para o Modelo de Genótipos.

Variável	Categoria		ASIP rs6058017			Total	χ^2	p	pFisher
			GG	GA	AA				
Cor da pele	Negro	N	7	20	21	48	35,206	**<0,001***	**<0,001***
		%	14,6%	41,7%	43,8%	100,0%			
	Branco	N	9	73	270	352			
		%	2,6%	20,7%	76,7%	100,0%			
	Pardo	N	6	52	111	169			
		%	3,6%	30,8%	65,7%	100,0%			
	Amarelo	N	0	6	21	27			
		%	0,0%	22,2%	77,8%	100,0%			
	Total	N	22	151	423	596			
		%	3,7%	25,3%	71,0%	100,0%			
Cor da pele agrupado	Negro	N	7	20	21	48	27,725	**0,001***	**0,001***
		%	14,6%	41,7%	43,8%	100,0%			
	Não negro	N	15	131	402	548			
		%	2,7%	23,9%	73,4%	100,0%			
	Total	N	22	151	423	596			
		%	3,7%	25,3%	71,0%	100,0%			
Cor dos cabelos	Preto	N	4	21	37	62	8,63	0,224	0,195
		%	6,5%	33,9%	59,7%	100,0%			
	Castanho	N	18	119	339	476			
		%	3,8%	25,0%	71,2%	100,0%			
	Ruivo	N	0	1	9	10			
		%	0,0%	10,0%	90,0%	100,0%			
	Loiro	N	0	10	38	48			
		%	0,0%	20,8%	79,2%	100,0%			
	Total	N	22	151	423	596			
		%	3,7%	25,3%	71,0%	100,0%			
Cor de cabelo agrupado	Preto+Castanho	N	22	140	376	538	4,317	0,144	0,115
		%	4,1%	26,0%	69,9%	100,0%			
	Ruivo+Loiro	N	0	11	47	58			
		%	0,0%	19,0%	81,0%	100,0%			
	Total	N	22	151	423	596			
		%	3,7%	25,3%	71,0%	100,0%			

N: Número de indivíduos; *p<0,05.

Tabela 19 continua.

Continuação da Tabela 19: Resultado das associações entre o polimorfismo rs6058017 (ASIP) e as variáveis cor da pele, olhos e cabelos (também na forma agrupada em duas categorias), para o Modelo de Genótipos.

Variável	Categoria		ASIP rs6058017			Total	χ^2	p	pFisher
			GG	GA	AA				
Cor dos olhos categórico	Castanho escuro	N	13	82	195	290	10,769	0,177	0,215
		%	4,5%	28,3%	67,2%	100,0%			
	Castanho médio	N	5	26	76	107			
		%	4,7%	24,3%	71,0%	100,0%			
	Castanho claro	N	4	16	50	70			
		%	5,7%	22,9%	71,4%	100,0%			
	Verde	N	0	22	76	98			
		%	0,0%	22,4%	77,6%	100,0%			
	Azul	N	0	5	26	31			
		%	0,0%	16,1%	83,9%	100,0%			
	Total	N	22	151	423	596			
		%	3,7%	25,3%	71,0%	100,0%			
Cor dos olhos agrupado	Castanhos	N	22	124	321	467	8,859	**0,004***	**0,012***
		%	4,7%	26,6%	68,7%	100,0%			
	Azul+Verde	N	0	27	102	129			
		%	0,0%	20,9%	79,1%	100,0%			
	Total	N	22	151	423	596			
		%	3,7%	25,3%	71,0%	100,0%			

N: Número de indivíduos; *p<0,05.

Foram construídos modelos de regressão logística binária para identificar se o polimorfismo era capaz de predizer essas variáveis fenotípicas (Tabela 20).

Tabela 20: Modelo de regressão logística para identificar se o polimorfismo rs6058017 foi capaz de predizer cor da pele e olhos no Modelo de Genótipos.

Variável		p	OR	95% IC	
				Inferior	Superior
Cor da pele	IDADE	0,091	0,98	0,96	1,00
	ASIP_rs6058017 (GA/GG)	**0,031***	**3,07**	1,11	8,52
	ASIP_rs6058017 (AA/GG)	**<0,001***	**8,93**	3,27	24,39
Cor dos olhos	ASIP_rs6058017_ (GA/GG)	0,998	-	-	-
	ASIP_rs6058017 (AA/GG)	0,998	-	-	-

OR: *Odds Ratio*; 95% IC: Intervalo de Confiança de 95%; *p<0,05.

O polimorfismo rs6058017 (ASIP) foi significativamente associado com cor da pele em modelo de regressão logística binária feito para o Modelo de Genótipos,

após ajustado para Idade ($p<0,05$), de modo que indivíduos heterozigotos e homozigotos AA (variante) apresentaram 3,07 e 8,93 vezes maior chance de apresentar a cor da pele “não-negra” em relação aos homozigotos GG (ancestral), respectivamente. O modelo de regressão logística não pode ser ajustado para a cor de olhos devido à presença de uma categoria que não apresentou nenhum indivíduo.

As análises feitas com o Modelo Dominante para o SNP rs6058017 têm seus resultados apresentados na Tabela 21.

Tabela 21: Resultado das associações entre o polimorfismo rs6058017 (ASIP) e as variáveis cor da pele, cabelo e olhos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo Dominante.

Variável	Categoria		ASIP rs6058017 Dominante		Total	χ^2	p	pFisher
			GG	GA+AA				
Cor da pele	Negro	N	7	41	48	18,337	**0,005***	**<0,001***
		%	14,6%	85,4%	100,0%			
	Branco	N	9	343	352			
		%	2,6%	97,4%	100,0%			
	Pardo	N	6	163	169			
		%	3,6%	96,4%	100,0%			
	Amarelo	N	0	27	27			
		%	0,0%	100,0%	100,0%			
	Total	N	22	574	596			
		%	3,7%	96,3%	100,0%			
Cor da pele agrupado	Negro	N	7	41	48	17,421	**0,001***	**0,001***
		%	14,6%	85,4%	100,0%			
	Não negro	N	15	533	548			
		%	2,7%	97,3%	100,0%			
	Total	N	22	574	596			
		%	3,7%	96,3%	100,0%			
Cor dos cabelos	Preto	N	4	58	62	3,563	0,358	0,313
		%	6,5%	93,5%	100,0%			
	Castanho	N	18	458	476			
		%	3,8%	96,2%	100,0%			
	Ruivo	N	0	10	10			
		%	0,0%	100,0%	100,0%			
	Loiro	N	0	48	48			
		%	0,0%	100,0%	100,0%			
	Total	N	22	574	596			
		%	3,7%	96,3%	100,0%			
Cor de cabelo agrupado	Preto+Castanho	N	22	516	538	2,463	0,154	0,117
		%	4,1%	95,9%	100,0%			
	Ruivo+Loiro	N	0	58	58			
		%	0,0%	100,0%	100,0%			
	Total	N	22	574	596			
		%	3,7%	96,3%	100,0%			

N: Número de indivíduos; *p<0,05.

Tabela 21 continua.

Continuação da Tabela 21: Resultado das associações entre o polimorfismo rs6058017 (ASIP) e as variáveis cor da pele, cabelo e olhos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo Dominante.

Variável	Categoria		ASIP rs6058017 Dominante		Total	χ^2	p	pFisher
			GG	GA+AA				
Cor dos olhos categórico	Castanho escuro	N	13	277	290	6,551	0,107	0,162
		%	4,5%	95,5%	100,0%			
	Castanho médio	N	5	102	107			
		%	4,7%	95,3%	100,0%			
	Castanho claro	N	4	66	70			
		%	5,7%	94,3%	100,0%			
	Verde	N	0	98	98			
		%	0,0%	100,0%	100,0%			
	Azul	N	0	31	31			
		%	0,0%	100,0%	100,0%			
	Total	N	22	574	596			
		%	3,7%	96,3%	100,0%			
Cor dos olhos agrupado	Castanhos	N	22	445	467	6,31	**0,007***	**0,012***
		%	4,7%	95,3%	100,0%			
	Azul+Verde	N	0	129	129			
		%	0,0%	100,0%	100,0%			
	Total	N	22	574	596			
		%	3,7%	96,3%	100,0%			

N: Número de indivíduos; *p<0,05.

No Modelo Dominante foram encontradas associações significantes entre o polimorfismo rs6058017 (ASIP) e as variáveis de cor da pele e cor dos olhos (p<0,05). Modelos de regressão logística binária para identificar se este polimorfismo era capaz de predizer essas variáveis fenotípicas foram construídos (Tabela 22).

Tabela 22: Modelo de regressão logística para identificar se o polimorfismo rs6058017 foi capaz de predizer cor da pele e olhos, no Modelo Dominante.

Variável		p	OR	95% IC	
				Inferior	Superior
Cor da pele	IDADE	0,081	0,98	0,96	1,00
	ASIP_rs6058017_dominate (GA+AA)	**<0,001***	**6,07**	2,33	15,83
Cor dos olhos	ASIP_rs6058017_dominante (GA+AA)	0,998	-	-	-

OR: Odds Ratio; 95% IC: Intervalo de Confiança de 95%; *p<0,05.

O polimorfismo rs6058017 (ASIP) foi significativamente associado com cor da pele em modelo de regressão logística binária, após ajustado para Idade (p<0,05), de modo que indivíduos portadores do alelo A (variante) apresentaram 6,07 maior chance de serem da categoria de cor da pele “não-negra”. O modelo de regressão logística não pode ser ajustado para a cor dos olhos devido à presença de uma categoria que não apresentou nenhum indivíduo.

A Tabela 23 contém os resultados obtidos com as análises do Modelo Recessivo para o SNP rs6058017 e as respectivas associações com as EVCs avaliadas neste estudo.

Tabela 23: Resultado das associações entre o polimorfismo rs6058017 (ASIP) e as variáveis cor da pele, cabelo e olhos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo Recessivo.

Variável	Categoria		ASIP rs6058017 Recessivo		Total	χ^2	p	pFisher
			GG+GA	AA				
Cor da pele	Negro	N	27	21	48	25,785	**<0,001***	**<0,001***
		%	56,3%	43,8%	100,0%			
	Branco	N	82	270	352			
		%	23,3%	76,7%	100,0%			
	Pardo	N	58	111	169			
		%	34,3%	65,7%	100,0%			
	Amarelo	N	6	21	27			
		%	22,2%	77,8%	100,0%			
	Total	N	173	423	596			
		%	29,0%	71,0%	100,0%			
Cor da pele agrupado	Negro	N	27	21	48	18,78	**0,001***	**0,001***
		%	56,3%	43,8%	100,0%			
	Não negro	N	146	402	548			
		%	26,6%	73,4%	100,0%			
	Total	N	173	423	596			
		%	29,0%	71,0%	100,0%			
Cor dos cabelos	Preto	N	25	37	62	7,175	0,073	0,067
		%	40,3%	59,7%	100,0%			
	Castanho	N	137	339	476			
		%	28,8%	71,2%	100,0%			
	Ruivo	N	1	9	10			
		%	10,0%	90,0%	100,0%			
	Loiro	N	10	38	48			
		%	20,8%	79,2%	100,0%			
	Total	N	173	423	596			
		%	29,0%	71,0%	100,0%			
Cor de cabelo agrupado	Preto+Castanho	N	162	376	538	3,157	0,093	0,076
		%	30,1%	69,9%	100,0%			
	Ruivo+Loiro	N	11	47	58			
		%	19,0%	81,0%	100,0%			
	Total	N	173	423	596			
		%	29,0%	71,0%	100,0%			

N: Número de indivíduos; *p<0,05.

Tabela 23 continua.

Continuação da Tabela 23: Resultado das associações entre o polimorfismo rs6058017 (ASIP) e as variáveis cor da pele, cabelo e olhos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo Recessivo.

Variável	Categoria		ASIP rs6058017 Recessivo		Total	χ^2	p	pFisher
			GG+GA	AA				
Cor dos olhos categórico	Castanho escuro	N	95	195	290	6,529	0,167	0,163
		%	32,8%	67,2%	100,0%			
	Castanho médio	N	31	76	107			
		%	29,0%	71,0%	100,0%			
	Castanho claro	N	20	50	70			
		%	28,6%	71,4%	100,0%			
	Verde	N	22	76	98			
		%	22,4%	77,6%	100,0%			
	Azul	N	5	26	31			
		%	16,1%	83,9%	100,0%			
	Total	N	173	423	596			
		%	29,0%	71,0%	100,0%			
Cor dos olhos agrupado	Castanhos	N	146	321	467	5,239	**0,022***	**0,022***
		%	31,3%	68,7%	100,0%			
	Azul+Verde	N	27	102	129			
		%	20,9%	79,1%	100,0%			
	Total	N	173	423	596			
		%	29,0%	71,0%	100,0%			

N: Número de indivíduos; *p<0,05.

Foram encontradas associações significantes entre o polimorfismo rs6058017 (ASIP) e as variáveis de cor da pele e cor dos olhos (p<0,05), no Modelo Recessivo. Portanto, foram construídos modelos de regressão logística binária para identificar se este SNP era capaz de predizer essas variáveis fenotípicas (Tabela 24).

Tabela 24: Modelo de regressão logística para identificar se o polimorfismo rs6058017 foi capaz de predizer cor da pele e olhos, no Modelo Recessivo.

Variável		p	OR	95% IC	
				Inferior	Superior
Cor da pele	IDADE	0,09	0,98	0,96	1,00
	ASIP_rs6058017_recessivo (AA/GG+GA)	**<0,001***	**3,52**	1,93	6,44
Cor dos olhos	ASIP_rs6058017_recessivo (AA/GG+GA)	**0,023***	**1,72**	1,08	2,74

OR: Odds Ratio; 95% IC: Intervalo de Confiança de 95%; *p<0,05.

O polimorfismo rs6058017 (ASIP) foi significativamente associado com cor da pele em modelo de regressão logística binária, após ajustado para Idade ($p<0,05$), de modo que indivíduos portadores de duas cópias do alelo variante A (homozigotos AA) apresentaram 3,52 vezes mais chance de pertencerem ao grupo de cor da pele "não-negra", em relação a portadores do alelo G.

Para a característica de cor de olhos, apenas no Modelo Recessivo foi possível realizar os cálculos de regressão logística e, observou-se que o SNP rs6058017 (ASIP) foi significativamente associado com essa EVC ($p<0,05$), de modo que indivíduos portadores de duas cópias do alelo variante A (homozigotos AA) apresentaram 1,72 vezes mais chance de pertencerem ao grupo de cor de olhos "azul+verde", em relação a indivíduos portadores do alelo G.

4.3 *TYR*

O número total de amostras genotipadas para o polimorfismo rs1126809 é de 602 e na Tabela 25, é possível verificar as frequências alélicas e genotípicas encontradas neste trabalho para este SNP.

Tabela 25: Descrição das frequências genotípicas, alélicas (minor allele frequency, MAF), e do resultado do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, para a amostra estudada para o SNP do gene TYR.

Gene (Polimorfismo)	Genótipos	N	(%)	MAF	EHW	
					X^2	P
TYR (rs1126809)	GG	433	71,9	0,149	1,13	0,287
	GA	159	26,4			
	AA	10	1,7			
	Total	602	100			

N: número de indivíduos; MAF: *Minor allele frequency* (frequência do alelo polimórfico); EHW: Equilíbrio de Hardy Weinberg; *p<0,05.

A Tabela que segue (Tabela 26) apresenta os resultados observados para as associações do polimorfismo presente no gene *TYR* com a EVCs estudadas neste trabalho com o uso do Modelo de Genótipos.

Tabela 26: Resultado das associações entre o polimorfismo rs1126809 (TYR) e as variáveis cor da pele, olhos e cabelos (também na forma agrupada em duas categorias), para o Modelo de Genótipo.

Variável	Categoria		TYR rs1126809			Total	X^2	p	pFisher
			GG	GA	AA				
Cor da pele	Negro	N	41	8	0	49	21,662	**0,001***	**0,001***
		%	83,7%	16,3%	0,0%	100,0%			
	Branco	N	235	111	10	356			
		%	66,0%	31,2%	2,8%	100,0%			
	Pardo	N	132	38	0	170			
		%	77,6%	22,4%	0,0%	100,0%			
	Amarelo	N	25	2	0	27			
		%	92,6%	7,4%	0,0%	100,0%			
	Total	N	433	159	10	602			
		%	71,9%	26,4%	1,7%	100,0%			
Cor da pele agrupado	Negro	N	41	8	0	49	3,964	0,138	0,158
		%	83,7%	16,3%	0,0%	100,0%			
	Não negro	N	392	151	10	553			
		%	70,9%	27,3%	1,8%	100,0%			
	Total	N	433	159	10	602			
		%	71,9%	26,4%	1,7%	100,0%			
Cor dos cabelos	Preto	N	52	9	1	62	7,708	0,26	0,226
		%	83,9%	14,5%	1,6%	100,0%			
	Castanho	N	335	137	9	481			
		%	69,6%	28,5%	1,9%	100,0%			
	Ruivo	N	8	3	0	11			
		%	72,7%	27,3%	0,0%	100,0%			
	Loiro	N	38	10	0	48			
		%	79,2%	20,8%	0,0%	100,0%			
	Total	N	433	159	10	602			
		%	71,9%	26,4%	1,7%	100,0%			
Cor de cabelo agrupado	Preto+Castanho	N	387	146	10	543	1,893	0,388	0,545
		%	71,3%	26,9%	1,8%	100,0%			
	Ruivo+Loiro	N	46	13	0	59			
		%	78,0%	22,0%	0,0%	100,0%			
	Total	N	433	159	10	602			
		%	71,9%	26,4%	1,7%	100,0%			

N: Número de indivíduos; *p<0,05

Tabela 26 continua.

Continuação da Tabela 26: Resultado das associações entre o polimorfismo rs1126809 (TYR) e as variáveis cor da pele, olhos e cabelos (também na forma agrupada em duas categorias), para o Modelo de Genótipo.

Variável	Categoria		TYR rs1126809			Total	X^2	p	pFisher
			GG	GA	AA				
Cor dos olhos categórico	Castanho escuro	N	211	78	3	292	3,647	0,887	0,856
		%	72,3%	26,7%	1,0%	100,0%			
	Castanho médio	N	78	28	3	109			
		%	71,6%	25,7%	2,8%	100,0%			
	Castanho claro	N	53	16	2	71			
		%	74,6%	22,5%	2,8%	100,0%			
	Verde	N	68	29	2	99			
		%	68,7%	29,3%	2,0%	100,0%			
	Azul	N	23	8	0	31			
		%	74,2%	25,8%	0,0%	100,0%			
	Total	N	433	159	10	602			
		%	71,9%	26,4%	1,7%	100,0%			
Cor dos olhos agrupado	Castanhos	N	342	122	8	472	0,364	0,833	0,866
		%	72,5%	25,8%	1,7%	100,0%			
	Azul+Verde	N	91	37	2	130			
		%	70,0%	28,5%	1,5%	100,0%			
	Total	N	433	159	10	602			
		%	71,9%	26,4%	1,7%	100,0%			

N: Número de indivíduos; *p<0,05.

Foi encontrada associação significante entre o polimorfismo rs1126809 (TYR) e a variável cor da pele (p<0,05), no Modelo de Genótipos. Entretanto, estes resultados devem ser analisados com muita cautela, pois este polimorfismo só possui 10 indivíduos para o grupo de homozigotos para o alelo polimórfico. Não foram detectadas associações entre o polimorfismo e as variáveis na forma agrupada em duas categorias, portanto, não foram realizados modelos de regressão logística binários para predizer as variáveis dependentes.

Tabela 27: Resultado das associações entre o polimorfismo rs1126809 (TYR) e as variáveis cor de pele, cabelo e olhos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo Dominante.

Variável	Categoria		TYR rs1126809 Dominante		Total	χ^2	p	pFisher
			GG	GA+AA				
Cor da pele	Negro	N	41	8	49	17,984	**<0,001***	**<0,001***
		%	83,7%	16,3%	100,0%			
	Branco	N	235	121	356			
		%	66,0%	34,0%	100,0%			
	Pardo	N	132	38	170			
		%	77,6%	22,4%	100,0%			
	Amarelo	N	25	2	27			
		%	92,6%	7,4%	100,0%			
	Total	N	433	169	602			
		%	71,9%	28,1%	100,0%			
Cor da pele agrupado	Negro	N	41	8	49	3,645	0,056	0,067
		%	83,7%	16,3%	100,0%			
	Não negro	N	392	161	553			
		%	70,9%	29,1%	100,0%			
	Total	N	433	169	602			
		%	71,9%	28,1%	100,0%			
Cor dos cabelos	Preto	N	52	10	62	6,869	0,076	0,073
		%	83,9%	16,1%	100,0%			
	Castanho	N	335	146	481			
		%	69,6%	30,4%	100,0%			
	Ruivo	N	8	3	11			
		%	72,7%	27,3%	100,0%			
	Loiro	N	38	10	48			
		%	79,2%	20,8%	100,0%			
	Total	N	433	169	602			
		%	71,9%	28,1%	100,0%			
Cor de cabelo agrupado	Preto+Castanho	N	387	156	543	1,181	0,277	0,36
		%	71,3%	28,7%	100,0%			
	Ruivo+Loiro	N	46	13	59			
		%	78,0%	22,0%	100,0%			
	Total	N	433	169	602			
		%	71,9%	28,1%	100,0%			

N: Número de indivíduos; *p<0,05.

Tabela 27 continua.

Continuação da Tabela 27: Resultado das associações entre o polimorfismo rs1126809 (TYR) e as variáveis cor de pele, cabelo e olhos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo Dominante.

Variável	Categoria		TYR rs1126809 Dominante		Total	χ^2	p	pFisher
			GG	GA+AA				
Cor dos olhos categórico	Castanho escuro	N	211	81	292	0,877	0,928	0,934
		%	72,3%	27,7%	100,0%			
	Castanho médio	N	78	31	109			
		%	71,6%	28,4%	100,0%			
	Castanho claro	N	53	18	71			
		%	74,6%	25,4%	100,0%			
	Verde	N	68	31	99			
		%	68,7%	31,3%	100,0%			
	Azul	N	23	8	31			
		%	74,2%	25,8%	100,0%			
	Total	N	433	169	602			
		%	71,9%	28,1%	100,0%			
Cor dos olhos agrupado	Castanhos	N	342	130	472	0,305	0,581	0,583
		%	72,5%	27,5%	100,0%			
	Azul+Verde	N	91	39	130			
		%	70,0%	30,0%	100,0%			
	Total	N	433	169	602			
		%	71,9%	28,1%	100,0%			

N: Número de indivíduos; *p<0,05.

Na Tabela 27 é possível verificar que foi encontrada associação significante entre o polimorfismo rs1126809, presente no gene TYR e a variável cor da pele (p<0,05), no Modelo Dominante. No entanto, não foram detectadas associações entre o polimorfismo e as quatro variáveis de cor da pele na forma agrupada em duas categorias, logo, não foram realizados modelos de regressão logística binários para predizer as variáveis dependentes.

A Tabela 28 mostra os resultados para o Modelo Recessivo das associações de rs1126809 com as EVCs que foram avaliadas neste trabalho.

Tabela 28: Resultado das associações entre o polimorfismo rs1126809 (TYR) e as variáveis Cor de pele, olhos e cabelos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo Recessivo.

Variável	Categoria		TYR rs1126809 Recessivo		Total	χ^2	p	pFisher
			GG+GA	AA				
Cor da pele	Negro	N	49	0	49	7,027	0,081	0,09
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Branco	N	346	10	356			
		%	97,2%	2,8%	100,0%			
	Pardo	N	170	0	170			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Amarelo	N	27	0	27			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Total	N	592	10	602			
		%	98,3%	1,7%	100,0%			
Cor da pele agrupado	Negro	N	49	0	49	0,901	0,343	1
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Não negro	N	543	10	553			
		%	98,2%	1,8%	100,0%			
	Total	N	592	10	602			
		%	98,3%	1,7%	100,0%			
Cor dos cabelos	Preto	N	61	1	62	1,127	0,77	1
		%	98,4%	1,6%	100,0%			
	Castanho	N	472	9	481			
		%	98,1%	1,9%	100,0%			
	Ruivo	N	11	0	11			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Loiro	N	48	0	48			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Total	N	592	10	602			
		%	98,3%	1,7%	100,0%			
Cor de cabelo agrupado	Preto+Castanho	N	533	10	543	1,105	0,293	0,609
		%	98,2%	1,8%	100,0%			
	Ruivo+Loiro	N	59	0	59			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Total	N	592	10	602			
		%	98,3%	1,7%	100,0%			

N: Número de indivíduos; *p<0,05.

Tabela 28 continua.

Continuação da Tabela 28: Resultado das associações entre o polimorfismo rs1126809 (TYR) e as variáveis Cor de pele, olhos e cabelos (também na forma agrupada em 2 categorias), para o Modelo Recessivo.

Variável	Categoria		TYR rs1126809 Recessivo		Total	χ^2	p	pFisher
			GG+GA	AA				
Cor dos olhos categórico	Castanho escuro	N	289	3	292	2,695	0,61	0,532
		%	99,0%	1,0%	100,0%			
	Castanho médio	N	106	3	109			
		%	97,2%	2,8%	100,0%			
	Castanho claro	N	69	2	71			
		%	97,2%	2,8%	100,0%			
	Verde	N	97	2	99			
		%	98,0%	2,0%	100,0%			
	Azul	N	31	0	31			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Total	N	592	10	602			
		%	98,3%	1,7%	100,0%			
Cor dos olhos agrupado	Castanhos	N	464	8	472	0,015	0,902	1
		%	98,3%	1,7%	100,0%			
	Azul+Verde	N	128	2	130			
		%	98,5%	1,5%	100,0%			
	Total	N	592	10	602			
		%	98,3%	1,7%	100,0%			

N: Número de indivíduos; *p<0,05.

No Modelo Recessivo não foram detectadas associações significantes entre o polimorfismo rs1126809 (TYR)e as variáveis estudadas (p<0,05),.

Finalmente, todas as associações de SNPs com EVCs encontradas neste estudo resumem-se a seguir:

✓ SLC24A5 (rs16960620): associação com cor da pele nos três Modelos usados para as análises (Genótipo, Dominante e Recessivo), contudo sem realização de teste de regressão logística, devido a casuística e poder de teste baixos.

✓ SLC24A5 (rs2555364): associação com cor da pele, cor dos olhos e cor dos cabelos.

- No Modelo de Genótipos, a regressão logística mostrou que os genótipos heterozigoto e homozigoto GG (variante) foram capazes de

predizer a cor da pele “não negra”, apresentando chance 2,7 e 14,23 vezes maior, respectivamente, de predizer a cor “não-negra” em relação aos homozigotos CC.

- No Modelo Recessivo observou-se ainda que portadores de duas cópias do alelo G (variante) apresentaram 19,32 vezes mais chance de ter a cor de cabelo na categoria “ruivo+loiro” e também apresentaram 11,78 vezes mais chance de pertencerem à categoria de cor de olhos “azul+verde” do que indivíduos portadores do alelo C.

✓ SLC24A5 (rs1426654): associação com cor da pele, cabelo e olhos.

- No Modelo de Genótipos a regressão logística mostrou que o genótipo homozigoto AA (variante) apresentou 9,89 vezes mais chance de predizer a cor da pele “não-negra” e 7,83 vezes mais chance a cor dos olhos “azul+verde” em relação aos indivíduos com genótipo GG).
- No Modelo Recessivo a regressão logística binária mostrou ainda que homozigotos AA (variante) apresentaram chance 4,77 maior de ter a cor de cabelo “ruivo+loiro”, em comparação aos portadores do alelo G (ancestral).

✓ ASIP (rs6058017): associação com cor da pele e olhos.

- No Modelo de Genótipos de modo que indivíduos heterozigotos e homozigotos AA (variante) apresentaram 3,07 e 8,93 vezes maior chance de apresentar a cor da pele “não-negra” em relação aos homozigotos GG (ancestral).
- No Modelo Recessivo notou-se ainda que homozigotos AA (variante) têm 1,72 vezes mais chances de estarem no grupo de indivíduos com olhos “azul+verde”.

✓ TYR (rs1126809): associação com cor da pele nos Modelos de Genótipo e Dominante, contudo sem realização de teste de regressão logística, devido a casuística e poder de teste baixos.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Este estudo considerou as variações de cinco SNPs: rs16960620; rs2555364; rs1426654 (*SLC24A5*); rs6058017 (*ASIP*) e rs1126809 (*TYR*), para analisar as possíveis associações dos genótipos encontrados com as características autorreferidas de cor da pele, cabelo e olhos em amostra da população brasileira, que apresenta grande diversidade genômica, sendo considerada uma das mais miscigenadas do mundo, devido aos séculos de cruzamentos inter étnicos entre colonizadores europeus, escravos africanos e ameríndios nativos (Alves-Silva et al, 2000). Com isto, os brasileiros incorporaram as características genotípicas e fenotípicas dos diversos ancestrais (Salzano; Bortolini, 2002), criando inúmeras combinações para os fenótipos de pele, cabelo e olhos.

De acordo com os resultados obtidos a partir das análises das amostras deste trabalho, o SNP rs16960620 (*SLC24A5*) esteve associado com cor da pele, contudo sem poder preditivo para esta ou qualquer outra EVC aqui avaliada. Este SNP ainda é pouco descrito na literatura, tendo sido associado apenas com ancestralidade genômica quando em conjunto com rs2555364; rs1426654 (também SLC24A5) na construção de haplótipos para verificar a possibilidade de melhorar a eficácia deste gene em discriminar populações asiáticas de outras populações com cor de pele “não-negra” (Giardina et al. 2008). No trabalho aqui descrito, a amostra foi constituída por 99,3% de indivíduos com o genótipo homozigoto AA, inviabilizando as análises com o uso de modelos de regressão logística.

As associações descritas no presente estudo para o SNP rs2555364 (*SLC24A5*) revelaram que o alelo variante G, quando em homozigose, pode apresentar 14,24 vezes mais chances de associação com cor da pele “não-negra” (Tabela 7), e ainda, os portadores deste alelo têm 19,32 mais chance de exibirem cor de cabelo loiro ou ruivo e 11,78 mais vezes a chance de apresentarem cor de olhos azul ou verde em comparação com indivíduos homozigotos para o alelo ancestral C (Tabela 11).

No ano de 2008, Giardina e colaboradores genotiparam para o SNP rs2555364 471 amostras de indivíduos originários da Europa, Ásia e África e mostraram que o alelo G esteve presente em 99% de italianos, 66% de asiáticos e 32% de africanos, colocando este alelo como um forte associado com pigmentação

clara (Giardina et al, 2008). Na população brasileira este SNP foi estudado em 243 indivíduos do Rio de Janeiro e em 212 indivíduos de São Paulo em conjunto com outros 14 SNPs e as associações mostraram que o rs2555364 foi um dos SNPs que esteve associado com cor da pele nessas populações (Durso et al, 2014).

Como esperado, as associações encontradas para o gene SLC24A5, que se referem ao rs1426654, são semelhantes as que estão descritas em estudos com diferentes populações, como a europeia, africana e asiática (Basu Mallick et al, 2013; Giardina et al, 2008; Lamason et al, 2005; Nan et al, 2009ª; Soejima e Koda 2007).

Nossos resultados mostram que o rs1426654 pode ser informativo na distinção de cor de pele negra e "não-negra", uma vez que tanto no Modelo de Genótipos, como homozigose (AA) apresentou 9,89 vezes mais chance de predizer cor de pele "não-negra" quando comparado com o alelo ancestral homozigoto (GG) (Tabela 13). Dados que puderam ser confirmados com o uso da regressão logística para os Modelos Dominante e Recessivo (Tabelas 15 e 17). Adicionalmente, o alelo variante em homozigose (AA), exibe chances 7,83 maiores de predizer cor de olhos "azul+verde" (Tabelas 13) do que o alelo ancestral em homozigose (GG). Na análise de regressão logística feita para o Modelo Recessivo, nota-se ainda que homozigotos para a variante A do SNP rs1426654 têm 4,77 mais chances de apresentar cabelo ruivo ou loiro (Tabela 17). Dados que colocam o alelo variante (A) como fortemente associado com características claras de pigmentação.

O gene SLC24A5 codifica uma proteína (NCKX5) que exerce função importante na melanogênese, sendo responsável pela manutenção de íons e do pH dentro dos melanossomos. Dentre os três SNPs avaliados neste trabalho, o mais estudado é justamente o rs1426654, isto por que este SNP é descrito não só como um marcador de EVCs, como também por ser usado em painéis de marcadores informativos de ancestralidade (AIMs), apresentando frequências bem distintas entre várias populações (Lamason et al, 2005; Walsh et al, 2011).

Estudos relatam que a frequência do alelo ancestral (G), que favorece a ocorrência de pigmento escuro por promover maior produção de eumelanina, está entre 93% e 100% em populações africanas e do leste asiático. (Lamason et al, 2005; Sturm; Larsson, 2009; Wilson et al, 2013). Por outro lado, Lamason e colaboradores (2005) apontam que em europeus ou em grupos que descendem

dessa população, o alelo variante (A), que favorece a ocorrência de pele, cabelo e olhos e mais claros, alcança frequências entre 98% e 100% (Lamason et al, 2005).

Outros estudos comparando as frequências deste SNP em africanos, asiáticos e europeus foram consistentes com os achados de Lamason e colaboradores (2005) demonstrando que o alelo variante (A) do SNP rs1426654 está bem fixado em populações europeias e o alelo ancestral (G) é bem estabelecido em grupos de pessoas predominantemente negras que derivam da África (Basu Mallick et al, 2013; Bouakaze et al, 2009; Norton et al, 2007; Soejima e Koda, 2007).

Canfield e colaboradores (2013) descreveram ainda que a frequência do alelo variante (A) de rs1426654*A é menor em indivíduos que habitam regiões mais próximas ao Equador, chegando a menos de 35% na África subsaariana, característica que, de acordo com os autores, explica a ação da seleção natural que favoreceu a redução da melanização em toda a Europa (Canfield et al, 2013).

Em Beleza e colaboradores (2013) o rs1426654 foi genotipado e a frequência do alelo variante (A) foi acima de 90% em europeus, sendo rara ou ausente em populações africanas e do Leste asiático. Achados similares também foram observados em um estudo realizado em 2016 que verificou a frequência de rs1426654 em conjunto com SNPs adicionais presentes em outros três genes (VDR, MC1R e SLC45A2) e descreveu o haplótipo com alelo variante (A) presente em 88% de populações com ancestralidade europeia, que têm predominantemente a pele clara. Essa frequência diminuiu e chegou a 2% em populações da África Subsaariana (Tiosano et al, 2016) onde as populações são tipicamente negras com cabelo e olhos escuros. Mais uma vez corroborando os achados do presente trabalho.

Os resultados do presente trabalho exibem concordância com estudos mencionados acima, pois o alelo variante (A) de rs1426654 demonstra associação com cor da pele “não-negra”, cabelo e olhos claros. E, por sua vez, o alelo ancestral (G) é associado com os fenótipos opostos, ou seja, cor da pele, cabelo e olhos escuros.

A verificação das frequências alélicas do SNP rs6058017 (ASIP) revelou que portadores de duas cópias do alelo variante (A) têm aproximadamente 9,0 vezes mais chances de apresentar cor da pele “não-negra” em comparação com portadores do alelo ancestral homozigoto (G) (Tabela 20). No Modelo Recessivo, os

cálculos de regressão logística apontam ainda que homozigotos para o alelo variante (A) têm quase 2,0 vezes mais chances de ter olhos azuis ou verdes (Tabela 24).

Do mesmo modo ao que ocorre com o SNP rs1426654 (SLC24A5), o alelo variante (A) do polimorfismo de *ASIP* é descrito como fator que favorece a síntese de feomelanina e aparece em 93% de caucasianos com pele branca e em 90% de asiáticos (Aberdam et al, 1998; Manne; Argeson; Siracusa, 1995; Voisey; Kelly; Van Daal, 2003). Já o alelo ancestral (G) favorece a produção de eumelanina (Aberdam et al, 1998; Manne; Argeson; Siracusa, 1995; Voisey; Kelly; Van Daal, 2003), e tem frequências elevadas descritas em africanos de pele negra, que exibem 80% do genótipo homozigoto ancestral (G), enquanto que americanos negros com descendência africana têm 66% da população com o genótipo homozigoto (GG), frequência que chega a 28% e 12% em asiáticos e americanos brancos com ancestralidade europeia, respectivamente (Bonilla et al, 2005; Meziani et al, 2005; Voisey et al, 2006; Sulem et al, 2008; Zeigler-Johnson et al, 2004). Confirmando esse dado, em 2014 Maroñas e colaboradores estudaram populações africanas, europeias e europeias com descendência africana e expuseram que o gene ASIP é um dos mais importantes marcadores de pigmento negro, uma vez que o alelo ancestral (G) é encontrado em quase 100% dos indivíduos com pigmentação escura. Uma vez que o alelo ancestral (G) é descrito por sua associação com fenótipos escuros de cor da pele, cabelo e olhos, o alelo variante (A) tem função oposta, ou seja, é responsável pela pigmentação clara destas características, dado este que pôde ser verificado nos resultados descritos para o SNP rs6058017 (ASIP) no presente estudo.

Kanetsky e colaboradores (2002) genotiparam 746 indivíduos americanos para o SNP rs6058017 (ASIP) e relataram que a presença do alelo ancestral (G) foi associada com cabelo escuro e olhos castanhos. Voisey e colaboradores (2006) postularam que o alelo variante aparece em 93% de caucasianos (EVCs claras), 90% de asiáticos (fenótipo de cor da pele definido pelos autores como intermediário) e 76% de aborígenes australianos (EVCs escuras), enquanto que o alelo ancestral (G) foi observado em 7% de caucasianos, 12,5% de asiáticos e 24% de aborígenes australianos. De acordo com os autores, as frequências que foram descritas

confirmam a hipótese de que o alelo ancestral (G) está relacionado com fenótipo escuro para cor da pele, cabelo e olhos (Kanetsky et al, 2002; Voisey et al, 2006).

Análises adicionais do polimorfismo rs6058017 (*ASIP*) em outros estudos, revelaram que africanos do oeste do continente, que exibem EVCs escuras, têm o alelo ancestral (G) em alta frequência (80%), enquanto que populações do leste asiático apresentaram este alelo com frequência de 28% e indígenas mexicanos mostraram frequência muito baixa deste alelo (1,5%) (Bonilla et al, 2005; Zeigler-Johnson et al, 2004;). Em um estudo realizado com a população francesa, o alelo ancestral (G) foi notavelmente relacionado fenótipos de pele negra e cabelo preto ou castanho (Meziani et al, 2005) e em norte americanos, a frequência do alelo ancestral (G) foi de 12% em indivíduos com cor da pele negra e cabelo escuro (Wilson et al, 1995). Uma análise realizada em africanos e europeus revelou que o gene *ASIP* é um dos mais importantes como marcador na classificação de pessoas negras, mostrando que o genótipo ancestral em homozigose (GG) foi observado somente em amostras de indivíduos negros (Maroñas et al, 2014).

No presente trabalho o SNP rs6058017 (*ASIP*) mostrou associações com cor da pele e olhos, sugerindo que o uso deste polimorfismo como marcador de características de pigmentação pode ser de grande auxílio nas investigações forenses quando usado em conjunto com outros marcadores.

As análises moleculares do SNP do gene TYR em nossa amostra forneceram informações estatisticamente significantes para cor da pele nos Modelos de Genótipos e Dominante (Tabelas 26 e 27) construídos para as análises. Contudo, os testes de regressão logística não foram realizados, pois não foram detectadas associações entre o polimorfismo e as variáveis na forma agrupada em duas categorias. Diferentemente, o estudo deste SNP em outras pesquisas, mostra que a forma heterozigota esteve associada com sensibilidade da pele ao sol e consequente capacidade de bronzeamento (Nan et al, 2009b; Zhang et al, 2013). Além disso, este SNP é descrito como fortemente associado com albinismo oculocutâneo tipo 1 (OCA1) (Oetting et al, 2009), existindo 189 variações relacionadas com OCA1 presentes no gene TYR, 148 delas são do tipo *missense* ou *nonsense*, 23 pequenas deleções, 8 inserções, 7 alterações em sítios de splicing, 2 INDELs e 1 rearranjo complexo (Ko et al, 2012; Ray; Chaki; Sengupta, 2007). E para

as análises realizadas no presente estudo, nenhum indivíduo apresentou fenótipo de albinismo.

Mesmo não sendo possível usar o SNP rs1126809 para predizer as EVCs aqui avaliadas, não se pode descartar o uso deste SNP como marcador em painéis para predição fenotípica, pois o gene *TYR* exerce papel importante na melanogênese e as possíveis variações dentro deste gene devem ser consideradas. Logo, estudos mais aprofundados com o uso de um número maior de polimorfismos do gene *TYR* podem vir a demonstrar a importância do SNP rs1126809 nas variações da pigmentação humana.

Além dos trabalhos mencionados acima com amostras da população brasileira, outros dois trabalhos avaliaram os genes *SLC45A2*, *OCA2* e *HERC2* em populações de São Paulo. No primeiro estudo, 12 SNPs presentes no gene *SLC45A2* foram usados para a construção haplotípica e os resultados mostraram a presença de um haplótipo associado com a presença de pele clara, cabelo loiro ou ruivo, olhos azuis e, ainda, sardas (Andrade et al, 2017). Por sua vez, o trabalho que avaliou os genes *OCA2* e *HERC2* apontou que todos SNPs que foram avaliados exibiram um alelo associado a fenótipos de características de pigmentação, enquanto que o alelo alternativo foi associado com os fenótipos opostos da mesma característica (Andrade et al, 2016). Os dados obtidos pelos diferentes grupos que estudam as associações gênicas com EVCs indicam a importância de avaliar uma vasta gama de SNPs com a intenção de obter uma predição fenotípica mais precisa e com maior valor informativo para as investigações forenses.

O uso de apenas um SNP para inferência de qualquer fenótipo não deve ser considerado relevante, contudo a construção de um painel que possua marcadores associados com as mesmas características amplia as possibilidades de sugerir, como proposto pelo presente trabalho, características externamente visíveis de cor da pele, cabelo e olhos. Neste estudo optou-se por amplificar cinco polimorfismos em um grupo amostral significativamente alto, ao invés da amplificação de mais SNPs em um número amostral reduzido. Contudo, as associações aqui descritas mostram a relevância dos SNPs avaliados pela técnica de FDP e sugerem a aplicação desta tecnologia de modo auxiliar à técnica de STRs. Nesse aspecto, agrupar as variáveis de cor da pele, cabelo e olhos, como feito neste estudo, ajudam a investigar as EVCs de modo a obter os dados que definem as características mais

extremas (por exemplo, pele negra versus pele “não-negra”) e, com isso, ajudar a reduzir o número de suspeitos em um crime, pois, ao encontrar indivíduos com as características apresentadas pela análise molecular, o perfil de STRs pode ser então traçado e a confirmação da individualização do sujeito é realizada. Além disso, a técnica de FDP pode ser usada para auxiliar a identificação de vítimas em casos de grandes desastres, por exemplo. A possibilidade de informar as associações gênicas de um SNP com determinado fenótipo de EVC é fundamental para a busca de modelos moleculares capazes de tal predição, contudo saber quão significantes as associações podem ser, como foi descrito nos resultados deste trabalho, aumenta a precisão das análises realizadas que podem ser mais informativas e de maior ajuda na Fenotipagem Forense pelo DNA.

Considera-se que a Fenotipagem Forense pelo DNA (FDP) estima a aparência de um indivíduo de modo probabilístico e não determinístico (MacLean; Lamparello, 2014). E, embora a técnica de FDP ofereça imensas vantagens, as preocupações éticas e morais que concernem seu uso não podem ser esquecidas. No entanto, esses assuntos podem ser tratados de forma a mostrar o real potencial da técnica de modo que os direitos civis fundamentais também sejam preservados.

O uso de FDP para a previsão de EVCs pode ser defendido com argumentos que têm em vista que ao descrever um retrato falado, a testemunha ocular declara características como cor da pele, cabelo e olhos e essas informações são usadas para reduzir o número de indivíduos que serão considerados nas buscas civis ou criminais. Neste caso, a diferença entre a testemunha ocular e testemunha molecular é que a segunda oferece comprovação estatística da associação, enquanto que o uso do retrato falado convencional tem sido bastante questionável. Além do mais, como a própria definição diz, as caraterísticas externamente visíveis são visíveis para todos, portanto, a informação não deveria ser considerada privada (Kayser, 2015; Kayser, de Knijff, 2011; Kayser; Schneider, 2009).

Kayser e Schneider (2009) defendem que a informação obtida através do uso de marcadores genéticos de inferência fenotípica permite apenas prever a probabilidade da manifestação de determinado fenótipo, sem a certeza de que essa característica se manifesta de fato no indivíduo, pois cada pessoa é produto da interação de fatores intrínsecos e extrínsecos. Assim, a análise estatística dos dados obtidos permite apenas reduzir o número de potenciais suspeitos e não identificar o

doador do material biológico em concreto, cabendo esse papel aos marcadores de identificação do tipo STRs.

Vale mencionar que o uso da FDP deveria ser usado apenas para fornecer informações sobre EVCs e não sobre características que não se pode ver, como presença de genes que predispõem determinada doença, como no caso hipotético de se descobrir que um suspeito de crime possui anemia falciforme e decidir usar essa informação para buscar em hospitais pessoas que têm essa doença e se tratam com frequência. Em casos como este, os direitos de privacidade do suspeito e também os sigilos médicos seriam quebrados e poderiam invalidar evidencias biológicas (MacLean; Lamparello, 2014).

Em diversos países como EUA, Austrália, Inglaterra, Holanda, Canadá, Alemanha e França, bancos de dados de DNA para uso criminal já são comuns. Nesses países, todos os suspeitos de violência sexual, crimes contra a vida e crimes de combate internacional (por exemplo, terrorismo) têm seu DNA coletado e o perfil genético é traçado e arquivado (Butler, 2011; Jobling; Gill, 2004). No Brasil, após a vigência da Lei 12.654, de 28 de maio de 2012, “os condenados por crime praticado, dolosamente, com violência de natureza grave contra pessoa (...), serão submetidos, obrigatoriamente, à identificação do perfil genético, mediante extração de DNA...”.

Contudo, o uso dessas amostras biológicas não poderá revelar fenótipos ou características comportamentais das pessoas, exceto determinação genética de gênero, consoante às normas constitucionais e internacionais sobre direitos humanos, genoma humano e dados genéticos. Entretanto, um grande número de pessoas, sequer sabe sobre a existência dessa Lei.

Se as informações transmitidas para a população quanto ao uso do DNA identificar um indivíduo ou mesmo caracterizar as suas EVCs não forem completas, pode ser que ocorram interpretações errôneas que gerem ideias de preconceito e medo da perda da privacidade. Além desses fatores, os poderes jurídicos que lidam com casos criminais e civis devem saber sobre a importância da obtenção dos dados inerentes às EVCs para que estes sejam considerados e bem interpretados quando usados como provas em contextos processuais.

Para que se estabeleçam Leis que definam o uso de amostras biológicas para a predição de EVCs, profissionais da genética forense devem ser ouvidos, por

serem os que vivenciam a rotina dentro dos laboratórios e conhecem as vantagens da obtenção dessas informações.

Até o presente momento, a Holanda é o único país onde o uso de marcadores para FDP é devidamente regulamentado por Lei desde 2003. Apesar disso, já existem casos descritos em outros países, Espanha e EUA, que utilizaram esta técnica para elucidar investigações (MacLean; Lamparello, 2014; Zieger; Utz, 2015).

Em 2004, uma série de bombardeios em trens de Madrid, Espanha, matou 191 pessoas e deixou inúmeros feridos. Dias após os ataques, policiais invadiram o apartamento de suspeitos que explodiram o local causando a morte dos ali presentes. Em 2007 as investigações desse mesmo crime utilizaram técnicas de FDP para direcionar as buscas e a análise do DNA obtido de amostra em escova de dentes (encontrada no apartamento dos suspeitos) foi consistente com a de um indivíduo norte africano. Investigações posteriores levaram ao encontro de um argelino suspeito de planejar ataques em larga escala que ainda é procurado pela polícia internacional (Calloway, 2009; MacLean; Lamparello, 2014).

Em janeiro de 2015 a polícia de Columbia, Estados Unidos, revelou o esboço de um suspeito de duplo assassinato cometido no ano de 2011 sem testemunhas oculares ou registro em câmeras de segurança. A criação deste esboço foi possível, pois o DNA deixado na cena do crime foi analisado para marcadores de FDP para a inferência de sexo, cor de pele, olhos e cabelo, presença ou ausência de sardas e também provável origem ancestral do suspeito. As informações obtidas resultaram na criação de um perfil de indivíduo do sexo masculino, com pele negra, olhos e cabelo castanhos, sem sardas e com maior contribuição ancestral do oeste da África. Mesmo que a prisão ainda não tenha sido efetuada, a técnica de FDP possibilitou o estreitamento das buscas por pessoas que tenham as características encontradas pela análise molecular (Pollack, 2015).

Na Suíça, as Leis que preveem o uso do DNA estão prestes a ser revisadas e, existe inclusive a possibilidade de um plebiscito que levará em conta a opinião pública sobre o assunto, tornando importante o processo de informação das pessoas, com o objetivo de esclarecer como e quando o DNA será utilizado para resolver problemas criminais (Zieger; Utz, 2015).

Os resultados do presente estudo enfatizaram a importância de compreender que as informações genéticas, pelo uso dos marcadores fornecem estimativas mais

precisas de características externamente visíveis, uma vez que a autorreferência de cor de pele, olhos e cabelo fornece indiretamente informações sobre as populações. Assim, é interessante o uso destes SNPs, na rotina forense para obtenção de dados mais informativos e complementares em estudos de associação entre amostra desconhecida e possível dono de tal amostra. Essa identificação poderia ser útil para construção de um “retrato falado molecular” por meio de programas de computação, para legitimar um suspeito com autor de um crime ou auxiliar buscas de pessoas desaparecidas.

O presente trabalho, que apresentou resultados otimistas para a inferência de pigmentação de cor de pele, olhos e cabelo em uma amostra miscigenada da população brasileira, tem a intenção de destacar a importância dessas informações nas ciências forenses de modo geral.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

As análises dos SNPs presentes nos três genes, *SLC24A5*, *TYR* e *ASIP*, foram usadas para avaliar as possíveis associações dos genótipos encontrados com as características de cor da pele, cor do cabelo e cor dos olhos em uma amostra brasileira, com a intenção de sugerir o uso destes marcadores em investigações forenses para determinação de características externamente visíveis.

Os resultados encontrados permitem concluir que:

- De três polimorfismos avaliados para o gene *SLC24A5*, dois estão associados com maior significância com as características externamente visíveis aqui estudadas, pois, o SNP rs16960620 exibiu associação com cor da pele nos três Modelos usados para as análises (Genótipo, Dominante e Recessivo), contudo sem realização de teste de regressão logística, devido a casuística e poder de teste baixos.
- O SNP rs2555364 mostrou que os genótipos heterozigoto e homozigoto GG (variante) foram capazes de predizer a cor da pele "não negra", apresentando chance 2,7 e 14,23 vezes maior, respectivamente, de predizer a cor "não-negra" em relação aos homozigotos CC e que portadores de duas cópias do alelo G (variante*)* apresentaram 19,32 vezes mais chance de ter a cor de cabelo na categoria "ruivo+loiro" e também apresentaram 11,78 vezes mais chance de pertencerem à categoria de cor de olhos "azul+verde" do que indivíduos portadores do alelo C.
- O SNP rs1426654 revelou que o genótipo homozigoto AA (variante) apresentou 9,89 vezes mais chance de predizer a cor da pele "não-negra" e 7,83 vezes mais chance a cor dos olhos "azul+verde" em relação aos indivíduos com genótipo GG e que homozigotos AA (variante) apresentaram chance 4,77 maior de ter a cor de cabelo "ruivo+loiro", em comparação aos portadores do alelo G (ancestral).
- O polimorfismo presente no gene *ASIP* (rs6058017) foi associado com duas das EVCs avaliadas neste estudo, uma vez que: indivíduos heterozigotos e homozigotos AA (variante) apresentaram 3,07 e 8,93

vezes maior chance de apresentar a cor da pele “não-negra” em relação aos homozigotos GG (ancestral) e homozigotos AA (variante) têm 1,72 vezes mais chances de estarem no grupo de indivíduos com olhos “azul+verde”.

- Para o polimorfismo presente no gene TYR (rs1126809), notamos apenas associação com cor da pele nos Modelos de Genótipo e Dominante, contudo sem realização de teste de regressão logística, devido a casuística e poder de teste baixos, logo mais ensaios devem ser realizados avaliando este e outros SNPs presentes no gene para compreender sua associação com a predição fenotípica.

Tais resultados permitem sugerir o uso dos polimorfismos associados com EVCs como marcadores em painéis de predição fenotípica que podem ser aplicados na população brasileira e usados na prática forense com a intenção de diminuir o número de indivíduos a se considerar em buscas criminais ou civis.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS[1]

Aberdam, E. et al. Involvement of microphthalmia in the inhibition of melanocyte lineage differentiation and of melanogenesis by agouti signal protein. **J Biol Chem**. v. 273, n. 31, p. 19560-19565, 1998.

Agar, N.; Young, A.R. Melanogenesis: a photoprotective response to DNA damage? **Mutat Res.** v. 571, n. 1-2, p. 121-132, 2005.

Altimimi, H.F.; Schnetkamp, P.P. Na+/Ca2+-K+ exchangers (NCKX): functional properties and physiological roles. **Channels (Austin).** v.1(2), p62-69, 2007.

Alves-Silva, J. et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **Am J Hum Genet,** v. 67, n. 2, p. 444-461, 2000.

Andrade, E.S. et al. Associations of OCA2-HERC2 SNPs and haplotypes with human pigmentation characteristics in the Brazilian population. **Leg Med (Tokyo).** v. 24, p. 78-83, 2017.

Barreiro, L.B. et al. Natural selection has driven population differentiation in modern humans. **Nature Genetics**. v. 40, p. 340-345, 2008.

Basu Mallick, C. et al. The light skin allele of SLC24A5 in South Asians and Europeans sHares identity by descent. **PLoS Genet.** v. 9, n. 11, p. e1003912, 2013.

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

[1] De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

Bonilla, C. et al. The 8818G allele of the agouti signaling protein (ASIP) gene is ancestral and is associated with darker skin color in African Americans. **Hum Genet.** v. 116, n. 5, p. 402-406, 2005.

Bouakaze, C. et al. Pigment phenotype and biogeographical ancestry from ancient skeletal remains: inferences from multiplexed autosomal SNP analysis. **Int J Legal Med.** v. 123, n. 4, p. 315-325, 2009.

Butler, J. Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. 1 ed. EUA: **Academic Press**; 2011.

Calloway, E. DNA mugshots' narrow search for Madrid bombers [on-Line]. Disponível em https://www.newscientist.com/article/dn17630-dna-mugshots-narrow-search-for-madrid-bombers/ Acesso em 20 de nov. 2015.

Canfield, V.A. et al. Molecular phylogeography of a human autosomal skin color locus under natural selection. **G3 (Bethesda).** v. 3, n. 11, p. 2059-2067, 2013.

Cerqueira, C.C. et al. Predicting Homo pigmentation phenotype through genomic data: from Neanderthal to James Watson. **Am J Hum Biol.** v. 24, n. 5, p. 705-709, 2012.

Cerqueira, C.C. et al. Implications of the admixture process in skin color molecular assessment. **PLoS One.** v. 9, n. 5, p. e96886, 2014.

Chaitanya, L. et al. Bringing colour back after 70 years: Predicting eye and hair colour from skeletal remains of World War II victims using the HIrisPlex system. **Forensic Sci Int Genet.** v. 26, p. 48-57, 2017.

Chang, T. Natural Melanogenesis Inhibitors Acting Through the Down-Regulation of Tyrosinase Activity. **Materials.** v. 5, n. 9, p. 1661-1685, 2012.

Chaplin, G.; Jablonski, N.G. Vitamin D and the evolution of human depigmentation. **Am J Phys Anthropol.** v. 139, n. 4, p. 451-461, 2009.

Chaplin, G. Geographic distribution of environmental factors influencing human skin coloration. **Am J Phys Anthropol.** v. 125, v. 3, p. 292-302, 2004.

Costin, G.E.; Hearing, V.J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. **FASEB J**. v. 21, n. 4, p. 976-994, 2007.

Diegoli, TM. Forensic typing of short tandem repeat markers on the X and Y chromosomes. **Forensic Sci Int Genet.** v. 18, p. 140-151, 2015.

Dimisianos, G. et al. A study of a single variant allele (rs1426654) of the pigmentation-related gene SLC24A5 in Greek subjects. **Exp Dermatol.** v. 18, n. 2, p. 175-177, 2009.

Durso, D.F. et al. Association of genetic variants with self-assessed color categories in Brazilians. **PLoS One.** v. 9, n. 1, p. e83926, 2014.

Ebanks, J.P.; Wickett, R.R.; Boissy, R.E. Mechanisms regulating skin pigmentation: the rise and fall of complexion coloration. **Int J Mol Sci.** v. 10, n. 9, p. 4066-4087, 2009.

FBI (Federal Bureau Of Investigation). CODIS Brochure. Disponível em https://www.fbi.gov/about-us/lab/biometric-analysis/codis/codis_brochure Acesso em 25 de jan. 2016.

Frudakis, T.; Terravainen, T.; Thomas, M. Multilocus OCA2 genotypes specify human iris colors. **Hum Genet.** v. 122, n. 3-4, p. 311-326, 2007.

Frudakis, T.N. Molecular Photofitting: Predicting Ancestry and Phenotype Using DNA. 1ed. EUA: **Academic Press;** 2008.

Giardina, E. et al. Haplotypes in SLC24A5 Gene as Ancestry Informative Markers in Different Populations. **Curr Genomics.** v. 9, n. 2, p. 110-114, 2008.

Ginger, R.S. et al. SLC24A5 encodes a trans-Golgi network protein with potassium-dependent sodium-calcium exchange activity that regulates human epidermal melanogenesis. **J Biol Chem.** v. 283, n. 9, p. 5486-5495, 2008.

Glazier, A.M.; Nadeau, J.H.; Aitman, T.J. Finding genes that underlie complex traits. **Science**. v. 298, n. 5602, p. 2345-2349, 2002.

Halaban, R. et al. Endoplasmic reticulum retention is a common defect associated with tyrosinase-negative albinism. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 97, n. 11, p. 5889-5894, 2000.

Hares, D.R. Selection and implementation of expanded CODIS core loci in the United States. **Forensic Sci Int Genet.** v. 17, p.33-34, 2015.

Hellenthal, G. et al. A genetic atlas of human admixture history. **Science**. v. 343, n. 6172, p. 747-751, 2014.

Holick, M.F. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. **Am J Clin Nutr**. v. 79, n. 3, p. 362-371, 2004.

Hudjashov, G. et al. Global patterns of diversity and selection in human tyrosinase gene. **PLoS One**. v. 8, n. 9. p. e:74307. 2013.

Hutton, S.M.; Spritz, R.A. A comprehensive genetic study of autosomal recessive ocular albinism in Caucasian patients. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v. 49, n. 3, p. 868-872, 2008.

Ibarrola-Villava, M. et al. MC1R, SLC45A2 and TYR genetic variants involved in melanoma susceptibility in southern European populations: results from a meta-analysis. **Eur J Cancer.** v. 48, n. 14, p. 2183-2191, 2012.

Jablonski, N.G. The Evolution of Human Skin And Skin Color. **Annu. Rev. Anthropol.** v. 33, p. 585–623, 2004.

Jablonski, N.G. Human skin pigmentation as an example of adaptive evolution. **Proc Am Philos Soc**. v. 156, n. 1, p. 45-57, 2012.

Jablonski, N.G. The evolution of human skin colouration and its relevance to health in the modern world. **J R Coll Physicians Edinb**. v. 42, n. 1, p. 58-63, 2012.

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

Jablonski, N.G.; Chaplin, G. Human skin pigmentation as an adaptation to UV radiation. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 107, n. Suppl 2, p. 8962–8968, 2010.

Jablonski, N.G.; Chaplin, G. The evolution of skin pigmentation and hair texture in people of African ancestry. **Dermatol Clin**. v. 32, n. 2, p. 113-121, 2014.

Jackson, I.J. Identifying the genes causing human diversity. **Eur J Hum Genet.** v. 14, n. 9, p. 979-980, 2006.

Jobling, M.A.; Gill, P. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. **Nat Rev Genet.** v. 5, n. 10, p.739-751, 2004.

Juzeniene, A. et al. Development of different human skin colors: a review highlighting photobiological and photobiophysical aspects. **J Photochem Photobiol B.** v. 96, p. 93–100, 2009.

Kanetsky, P.A. et al. A polymorphism in the agouti signaling protein gene is associated with human pigmentation. **Am J Hum Genet.** v. 70, n. 3, p. 770-775, 2002.

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. 154-161, 2009.

Kayser, M.; de Knijff, P. Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. **Nat Rev Genet**. v. 12, n. 3, p. 179-192, 2011.

Kayser, M. Forensic DNA Phenotyping: Predicting human appearance from crime scene material for investigative purposes. **Forensic Sci Int Genet.** v. 18, p. 33-48, 2015.

Ko, J.M. et al. Mutation spectrum of the TYR and SLC45A2 genes in patients with oculocutaneous albinism. **Mol Med Rep.** v. 5, n. 4, p. 943-948, 2012.

Kollias, N. et al. Photoprotection by melanin. **J Photochem Photobiol B.** v. 9, n. 2, p. 35-160, 1991.

Koops, B.; Schellekens, M. Forensic DNA Phenotyping: Regulatory Issues. **9 Colum. Sci. & Tech. L. Rev. 158**. 2008.

Kwon, H.Y. et al. Molecular structure and chromosomal mapping of the human homolog of the agouti gene. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 91, n. 21, p. 9760-9764, 1994.

Lamason, R.L. et al. SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. **Science.** v. 310, n. 5755, p. 1782-1786, 2005.

Lima, F.A.; de Toledo Gonçalves, F.; Fridman, C. SLC24A5 and ASIP as phenotypic predictors in Brazilian population for forensic purposes. **Leg Med (Tokyo)**. v. 17, n. 4, p. 261-266, 2015.

Lin, J.Y.; Fisher, D.E. Melanocyte biology and skin pigmentation. **Nature**. v. 445, p. 843-850, 2007.

Liu, F. et al. Eye color and the prediction of complex phenotypes from genotypes. **Curr Biol.** v. 19, n. 5, p. 192-193, 2009.

Liu, F.; Wen, B.; Kayser, M. Colorful DNA polymorphisms in humans. **Semin Cell Dev Biol.** v. 24, n. 6-7, p. 562-575, 2013.

Lucock, M. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. **Mol Genet Metab.** v. 71, n. 1-2, p. 121-138, 2000.

MacLean, C.E.; Lamparello, A. Forensic DNA phenotyping in criminal investigations and criminal courts: assessing and mitigating the dilemmas inherent in the science. **Recent Adv DNA Gene Seq.** v. 8, n. 2, p. 104-112, 2014.

Manne, J.; Argeson, A.C.; Siracusa, L.D. Mechanisms for the pleiotropic effects of the agouti gene**. Proc Natl Acad Sci USA**. v. 92, n. 11, p. 4721-4724, 1995.

Maroñas, O. et al. Development of a forensic skin colour predictive test**. Forensic Sci Int Genet.** v. 13, p. 34-44, 2014.

Maroñas, O. et al. The genetics of skin, hair, and eye color variation and its relevance to forensic pigmentation predictive tests. **Forensic Sci Rev.** v. 27, n. 1, p. 13-40, 2015.

Melton, T.; Holland, C.; Holland, M. Forensic Mitochondrial DNA Analysis: Current Practice and Future Potential. **Forensic Sci Rev.** v. 24, n. 2, p. 101-122, 2012.

Meziani, R. et al. Association study of the g.8818A>G polymorphism of the human agouti gene with melanoma risk and pigmentary characteristics in a French population. **J Dermatol Sci.** v. 40, n. 2, p. 133-136, 2005.

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

Mukherjee, M. et al. Polymorphisms of four pigmentation genes (SLC45A2, SLC24A5, MC1R and TYRP1) among eleven endogamous populations of India. **J Genet.** v. 92, n. 1, p. 35-139, 2013.

Nan, H. et al. Genetic variants in pigmentation genes, pigmentary phenotypes, and risk of skin cancer in Caucasians. **Int J Cancer.** v. 125, n. 4, p. 909-917, 2009a.

Nan, H. et al. Genome-wide association study of tanning phenotype in a population of European ancestry. **J Invest Dermatol.** v. 129, n. 9, p. 2250-2257, 2009b.

Norton, H.L. et al. Genetic evidence for the convergent evolution of light skin in Europeans and East Asians. **Mol Biol Evol.** v. 24, n. 3, p. 710-722, 2007.

Oetting, W.S. et al. The R402Q tyrosinase variant does not cause autosomal recessive ocular albinism. **Am J Med Genet A.** v. 149A, n. 3, p. 466-469, 2009.

Oetting, W.S. et al. Oculocutaneous albinism type 1: the last 100 years. **Pigment Cell Res.** v. 16, n. 3, p. 307-311, 2003.

Park, H.Y. et al. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. **Cell Mol Life Sci**. v. 66, n. 9, p. 1493-1506, 2009.

Parra, E.J. Human pigmentation variation: evolution, genetic basis, and implications for public health. **Am J Phys Anthropol.** v. Suppl 45, p. 85-105, 2007.

Patience, S. Vitamin D deficiency: prevention and identification of risk. **Community Pract.** v. 88, n. 6, p. 26-28, 2015.

Pena, S.D.; Prado, V.F.; Epplen, J.T. DNA diagnosis of human genetic individuality. **J Mol Med (Berl).** v. 73, n. 11, p. 555-564, 1995.

Pneuman, A. et al. Verification of eye and skin color predictors in various populations. **Leg Med (Tokyo).** v. 14, n. 2, p. 78-83, 2012.

Pollack, A. Building a Face, and a Case, on DNA [on-line]. Disponível em: http://www.nytimes.com/2015/02/24/science/building-face-and-a-case-on-dna.html?_r=0 Acesso em 25 de nov. 2015.

Pośpiech, E. et al. Evaluation of the predictive capacity of DNA variants associated with straight hair in Europeans. **Forensic Sci Int Genet.** v. 19, p. 280-288, 2015.

Pulker, H. et al. Finding genes that underlie physical traits of forensic interest using genetic tools. **Forensic Sci Int Genet.** v. 1, n. 2, p. 100-104, 2007.

Ray, K.; Chaki, M.; Sengupta, M. Tyrosinase and ocular diseases: some novel thoughts on the molecular basis of oculocutaneous albinism type 1**. Prog Retin Eye Res**. v. 26, n. 4, p. 323-358, 2007.

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

Rees, J.L.; Harding, R.M. Understanding the evolution of human pigmentation: recent contributions from population genetics. **J Invest Dermatol.** v. 132, n. 3, p. 846-853, 2012.

Robins, A.H. Biological Perspectives on Human Pigmentation. 1 ed. EUA: **Cambridge-Print On;** 2005.

Rouzaud, F. et al. MC1R and the response of melanocytes to ultraviolet radiation. **Mutat Res**. v. 571, n. 1-2, p. 133-152, 2005.

Rowling, J.K. Harry Potter and the Goblet of Fire. 1 ed. EUA: **Scholastic Books**; 2002.

Sabeti, P.C. et al. Genome-wide detection and characterization of positive selection in human populations. **Nature**. v. 449, n. 7164, p. 913-918, 2007.

Salzano, F.M.; Botolini, M.C. Evolution and genetics of Latin American populations. 1 ed. EUA: **Cambridge-USA;** 2002.

Schallreuter, K.U. et al. Regulation of melanogenesis--controversies and new concepts. **Exp Dermatol.** v. 17, n. 5, p. 395-404, 2008.

Scherer, D.; Kumar, R. Genetics of pigmentation in skin cancer-a review. **Mutat Res**. v. 705, n. 2, p. 141-153, 2010.

Schiaffino, M.V. Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology. **Int J Biochem Cell Biol.** v. 42, n. 7, p. 1094-1104, 2010.

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. 36-39, 2007.

Sturm, R.A. A golden age of human pigmentation genetics. **Trends Genet.** v. 22, n. 9, p. 464-468, 2006.

Sturm, R.A. Molecular genetics of human pigmentation diversity. **Hum Mol Genet**. v. 18, n. R1, p. R2-17, 2009.

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

Sturm, R.A.; Larsson, M. Genetics of human iris colour and patterns. **Pigment Cell Melanoma Res.** v. 22, n. 5, p. 544-562, 2009.

Sulem, P. et al. Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. **Nat Genet.** v. 39, n. 12, p. 1443-1452, 2007.

Sulem, P. et al. Two newly identified genetic determinants of pigmentation in Europeans. **Nat Genet.** v. 40, n. 7, p. 835-837, 2008.

Suzuki, I. et al, Agouti signaling protein inhibits melanogenesis and the response of human melanocytes to alpha-melanotropin. **J Invest Dermatol.** v. 108, n. 6, p. 838-842, 1997.

Tiosano, D. et al. Latitudinal Clines of the Human Vitamin D Receptor and Skin Color Genes. **G3 (Bethesda).** v. 3, n. 6(5), p. 1251-1266, 2016.

Tsatmali, M.; Ancans, J.; Thody, A.J. Melanocyte function and its control by melanocortin peptides**. J Histochem Cytochem.** v. 50, n. 2, p. 125-133, 2002.

Tully, G. Genotype versus phenotype: human pigmentation. **Forensic Sci Int Genet.** v. 1, n. 2, p. 105-110, 2007.

Valenzuela, R.K. et al. Predicting phenotype from genotype: normal pigmentation. **J Forensic Sci.** v. 55, n. 2, p. 315-322, 2010.

Videira, I.F.; Moura, D.F.; Magina, S. Mechanisms regulating melanogenesis. **An Bras Dermatol.** v. 88, n. 1, p. 76-83, 2013.

Voisey, J.; Kelly, G.; Van Daal, A. Agouti signal protein regulation in human melanoma cells. **Pigment Cell Res**. v. 16, n. 1, p. 65-71, 2003.

Voisey, J. et al. A polymorphism in the agouti signalling protein (ASIP) is associated with decreased levels of mRNA. **Pigment Cell Res**. v. 19, n. 3, p. 226-231, 2006.

Walsh, S. et. al. IrisPlex: a sensitive DNA tool for accurate prediction of blue and brown eye colour in the absence of ancestry information. **Forensic Sci Int Genet.** v. 5, n. 3, p. 170-180, 2011.

Walsh, S. et. al. DNA-based eye colour prediction across Europe with the IrisPlex system. **Forensic Sci Int Genet.** v. 6, n. 3, p, 330-340, 2012.

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

Walsh, S. et. al. Developmental validation of the HIrisPlex system: DNA-based eye and hair colour prediction for forensic and anthropological usage. **Forensic Sci Int Genet.** v. 9, p. 150-161, 2014.

Wilson, B.D. et al. Structure and function of ASP, the human homolog of the mouse agouti gene. **Hum Mol Genet.** v. 4, n. 2, p. 223-230, 1995.

Wilson, S. et al. NCKX5, a natural regulator of human skin colour variation, regulates the expression of key pigment genes MC1R and alpha-MSH and alters cholesterol homeostasis in normal human melanocytes. **Adv Exp Med Biol.** v. 961, p. 95-107, 2013.

Yamaguchi, Y.; Hearing, V.J. Physiological factors that regulate skin pigmentation. **Biofactors.** v. 35, n. 2, p. 193-199, 2009.

Zbieć-Piekarska, R.; Spólnicka, M.; Kupiec, T. Examination of DNA methylation status of the ELOVL2 marker may be useful for human age prediction in forensic science. **Forensic Sci Int Genet.** v. 14, p. 161-167, 2015.

Zeigler-Johnson, C. et al. Population differences in the frequency of the agouti signaling protein g.8818a>G polymorphism. **Pigment Cell Res.** v. 17, n. 2, p. 185-187, 2004.

Zhang, M. et al. Genome-wide association studies identify several new loci associated with pigmentation traits and skin cancer risk in European Americans. **Hum Mol Genet**. v. 22, n. 14, p. 2948-2959, 2013.

Zieger, M.; Utz, S. About DNA databasing and investigative genetic analysis of externally visible characteristics: A public survey. **Forensic Sci Int Genet**. v. 17, p. 163-172, 2015.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A - Termo de consentimento livre e esclarecido;

ANEXO B - Aprovação do Projeto pela Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa (CAPPesq), do Hospital das Clínicas da FMUSP (PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_469899);

ANEXO C - Questionário utilizado para anamnese;

ANEXO D - Quadro com cores de cabelo;

ANEXO E - Quadro com cores dos olhos.

ANEXO A

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .:..... .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE .....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE: .....
CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Predição de fenótipos complexos, como cor de pele, de olhos e de cabelo, a partir de análises genotípicas para fins forenses

PESQUISADOR : Cintia Fridman Rave

CARGO/FUNÇÃO: Docente..... INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº .CRB: 20694/01-D.

UNIDADE DO HCFMUSP: .Depto. de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO X☐ RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses.....

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

1 – Desenho do estudo e objetivo(s): Você está sendo convidado a participar desse estudo como voluntário sadio, isto é, como uma pessoa que não tem nenhuma doença. Esta pesquisa pretende estudar a possibilidade de avaliar traços físicos na população brasileira como, por exemplo, cor de pele, cor de cabelo e cor de olhos, por meio da análise genética de algumas variações que ocorrem naturalmente no nosso DNA (nosso material genético), para que isso possa ser usado futuramente em casos de identificação humana.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados: Para participar desse estudo você precisará responder a um questionário com informações sobre a sua cor de pele, cor de cabelo, local de nascimento, e dados sobre a origem de seus pais e avós, e hábitos de exposição ao sol. A sua cor de pele será avaliada por meio de uma medição com aparelho específico. Será coletado 4ml de sangue da veia do braço e desse material será extraído o seu DNA que será o material usado para que possamos fazer os estudos das variações das nossas aparências físicas. Caso você concorde, será tirada uma fotografia da região dos olhos.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados: Para responder ao questionário você precisará gastar de 15-20 min. Será realizada uma coleta de 4 ml de sangue da veia do antebraço. A medida da cor de pele será realizada colocando-se um aparelho em contato com a pele da região interna do seu braço. A fotografia será tirada apenas da região dos olhos e não terá nenhuma identificação pessoal.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3: Para algumas pessoas a coleta de sangue pode ser dolorida e ás vezes pode ocorrer o aparecimento de uma mancha roxa. O resto do estudo não traz riscos ou desconfortos ao participante.

5 – Benefícios para o participante: Não há benefício direto para você. Trata-se apenas de estudo testando a possibilidade de inferência de traços físicos a partir do estudo do material genético na população brasileira.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: Não se aplica.

7 – Garantia de acesso: Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dra. Cintia Fridman Rave que pode ser encontrada no endereço: Rua Teodoro Sampaio, 115. Instituto Oscar Freire – Depto. Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho da FMUSP. Telefone: 3061.8408. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) –Av. Dr. Arnaldo, 455 – Instituto Oscar Freire – 1º andar– tel: 2661.6442, FAX: 3061-8004– E-mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada deste consentimento a qualquer momento e você pode deixar de participar do estudo sem qualquer prejuízo a seu tratamento na Instituição;

9 – Direito de confidencialidade: As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros indivíduos, não sendo divulgada a identificação de nenhum participante;

10 – Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será paga por nós.

12 – Estamos pedindo a sua permissão para que os materiais e dados coletados para essa pesquisa possam ser armazenados em nosso laboratório e usados de forma anônima em futuras pesquisas da mesma área, que não forem relacionadas com nenhuma doença .

☐ Concordo ☐ Não Concordo

- Você concorda em que seja tirada uma fotografia da região dos seus olhos?

☐ Concordo ☐ Não Concordo

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: **"Predição de fenótipos complexos, como cor de pele, de olhos e de cabelo, a partir de análises genotípicas para fins forenses"**. Eu discuti com o Dra. Cintia Fridman Rave sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço .

Assinatura do paciente/representante legal Data ___/___/___

Assinatura da testemunha Data ___/___/___

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ___/___/___

ANEXO B

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP - HCFMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Predição de fenótipos complexos, como cor de pele, de olhos e de cabelo, a partir de análises genotípicas para fins forenses

Pesquisador: Cintia Fridman

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 00973512.7.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Outros

Detalhe: submissão sub-projeto

Justificativa: Submissão de sub-projeto da aluna Felícia de Araújo Lima.

Data do Envio: 21/11/2013

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 469.899

Data da Relatoria: 27/11/2013

Apresentação da Notificação:

Trata-se de sub-projeto, sendo que inicial já foi aprovado neste Comitê, após a devida a avaliação

Objetivo da Notificação:

Submissão do sub-projeto intitulado - Avaliação da associação de polimorfismos dos genes SLC24A5, TYR e ASIP com características de cor de pele, olhos e cabelo na população brasileira para fins forenses, que será dissertação de mestrado da aluna FELICIA DE ARAÚJO LIMA

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Já avaliados, não trazendo impedimentos

Endereço: Rua Ovidio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

Entendo pertinentes as considerações realizadas pelo relator que nos precedeu, avaliando o projeto inicial

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Idem

Recomendações:

Manter os mesmos cuidados sugeridos pelo relator do projeto original

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem outros comentários

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 ¿ cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c)apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

SAO PAULO, 27 de Novembro de 2013

Assinador por:
Luiz Eugênio Garcez Leme
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovidio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Municipio:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

ANEXO C

Predição de fenótipos complexos, como cor de pele, de olhos e de cabelo, a partir de análises genotípicas

ID_____

Data da Entrevista: _____

IDENTIFICAÇÃO

Nome:_____

_____Endereço:_____

_____

_____Telefone:_____

DADOS DEMOGRÁFICOS

1. Sexo: (1) Feminino (2) Masculino
2. Idade (em anos completos): _____
3. Data de Nascimento: _____
4. Local de Nascimento (Cidade/Estado): _____
5. Local de Nascimento dos seus Pais:

   Mãe (Cidade/Estado/País): _____

   Pai (Cidade/Estado/País): _____
6. Local de Nascimento dos seus Avós Maternos:

   Avó (Cidade/Estado/País): _____

   Avô (Cidade/Estado/País): _____
7. Local de Nascimento dos seus Avós Paternos:

   Avó (Cidade/Estado/País): _____

   Avô (Cidade/Estado/País): _____

   Estado Civil_____

8. Escolaridade:

(1) Nenhuma		
(2) Ensino Fundamental 1 (Primário)	( ) Completo	( ) Incompleto
(3) Ensino Fundamental 2 (Ginásio)	( ) Completo	( ) Incompleto
(4) Ensino Médio (Colegial)	( ) Completo	( ) Incompleto
(5) Ensino Superior	( ) Completo	( ) Incompleto
(6) Pós-Graduação		

9. Profissão: _____

10. Renda: ( ) até R$ 610,00 ( ) de R$ 610,00 a R$ 1.830,00
( ) de R$ 1.830,00 a R$ 3.050,00 ( ) acima R$ 3.050,00

HÁBITOS DE VIDA

11. O Sr.(a) fuma? ( ) Sim ( ) Não

Quanto (cigarros/dia)? _____

Há quanto tempo (anos)? _____

12. O Sr.(a) ingere bebida alcoólica? ( ) Sim ( ) Não

Quanto? _____

Com que frequência? _____

13. O Sr.(a) tem algum tipo de doença crônica? ( ) Sim ( ) Não

Qual? _____

14. Toma algum medicamento de uso contínuo ( ) Sim ( ) Não

Qual? _____

CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS

15. Como o Sr.(a) definiria sua cor de pele? ( ) Branco ( ) Pardo ( ) Negro ( ) Amarelo

16. Em relação à sensibilidade da sua pele quando exposta ao sol, sem proteção, durante 1 dia, o Sr.(a) poderia me dizer que:

(1) Sempre queima, nunca bronzeia

(2) Sempre queima e depois bronzeia levemente e com dificuldade

(3) Queima moderadamente e bronzeia gradual e uniformemente

(4) Queima pouco, bronzeia bastante

(5) Raramente queima, bronzeia intensamente

(6) Nunca queima, bronzeia intensamente

17. O Sr.(a) está utilizando diariamente algum tipo de:

-Protetor solar? ( ) Sim ( ) Não

Qual? _____

Fator de Proteção: _____

- Bronzeador? ( ) Sim ( ) Não

Qual? _____

18. Quando o Sr.(a) era criança (dos 5 aos 15 anos) apresentava sardas no seu rosto? ( ) Sim ( ) Não

Se SIM, o Sr.(a) poderia dizer que tinha sardas:

(1)Grande quantidade, que era notada pela maioria das pessoas que conhecia

(2)Em quantidade moderada, não muito diferente das outras pessoas

(3)Em pouquíssima quantidade

19. Como o Sr.(a) definiria sua cor de olho de acordo com a grade anexa? _____

20. Como o Sr.(a) definiria a cor natural do seu cabelo aos 15 anos?

(1) Loiro claro

(2) Loiro escuro

(3) Ruivo

(4) Castanho avermelhado

(5) Castanho claro

(6) Castanho médio

(7) Castanho escuro

(8) Preto

21. Como o Sr.(a) definiria a cor natural do seu cabelo aos 15 anos de acordo com a grade anexa?

_____

Peso:_____

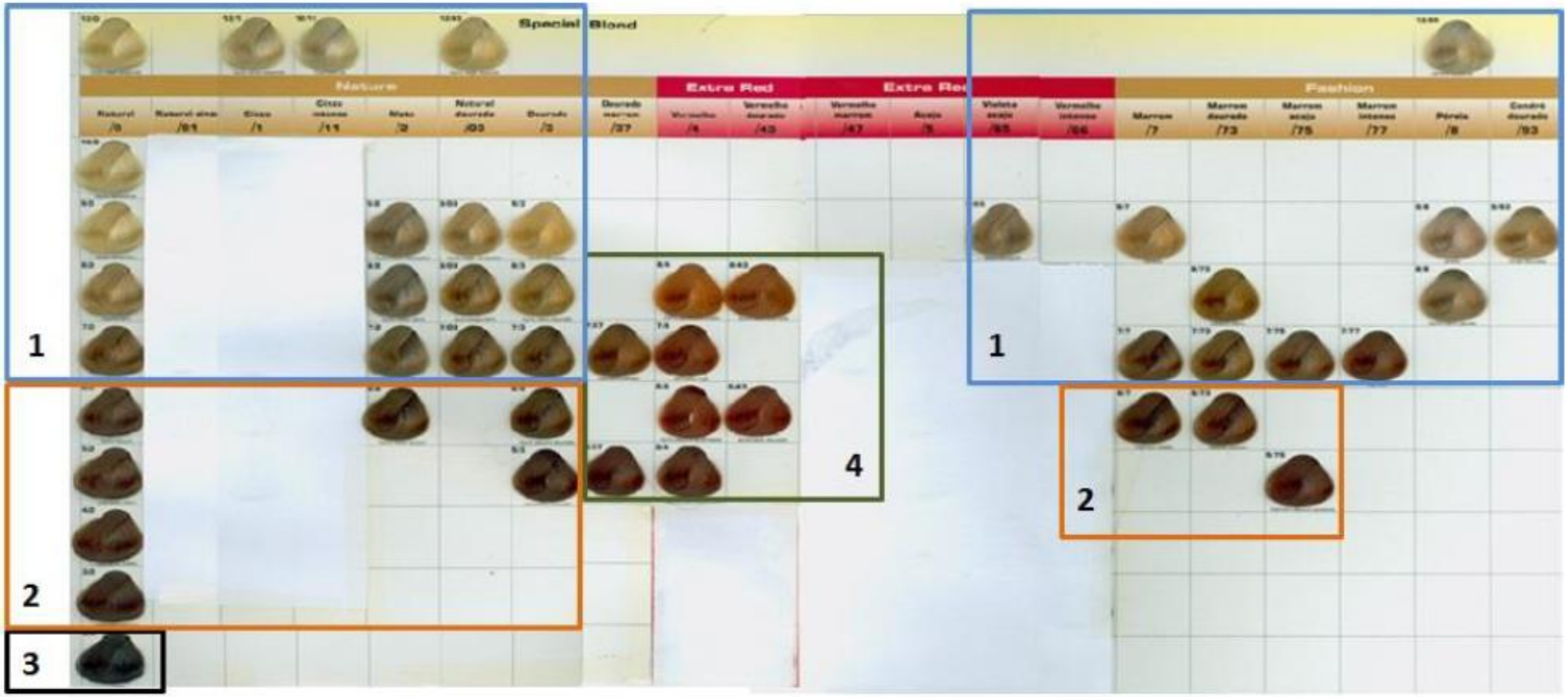
Altura:_____

Numeração das fotos dos olhos:_____

22. Medição da cor de pele pelo espectrofotômetro :

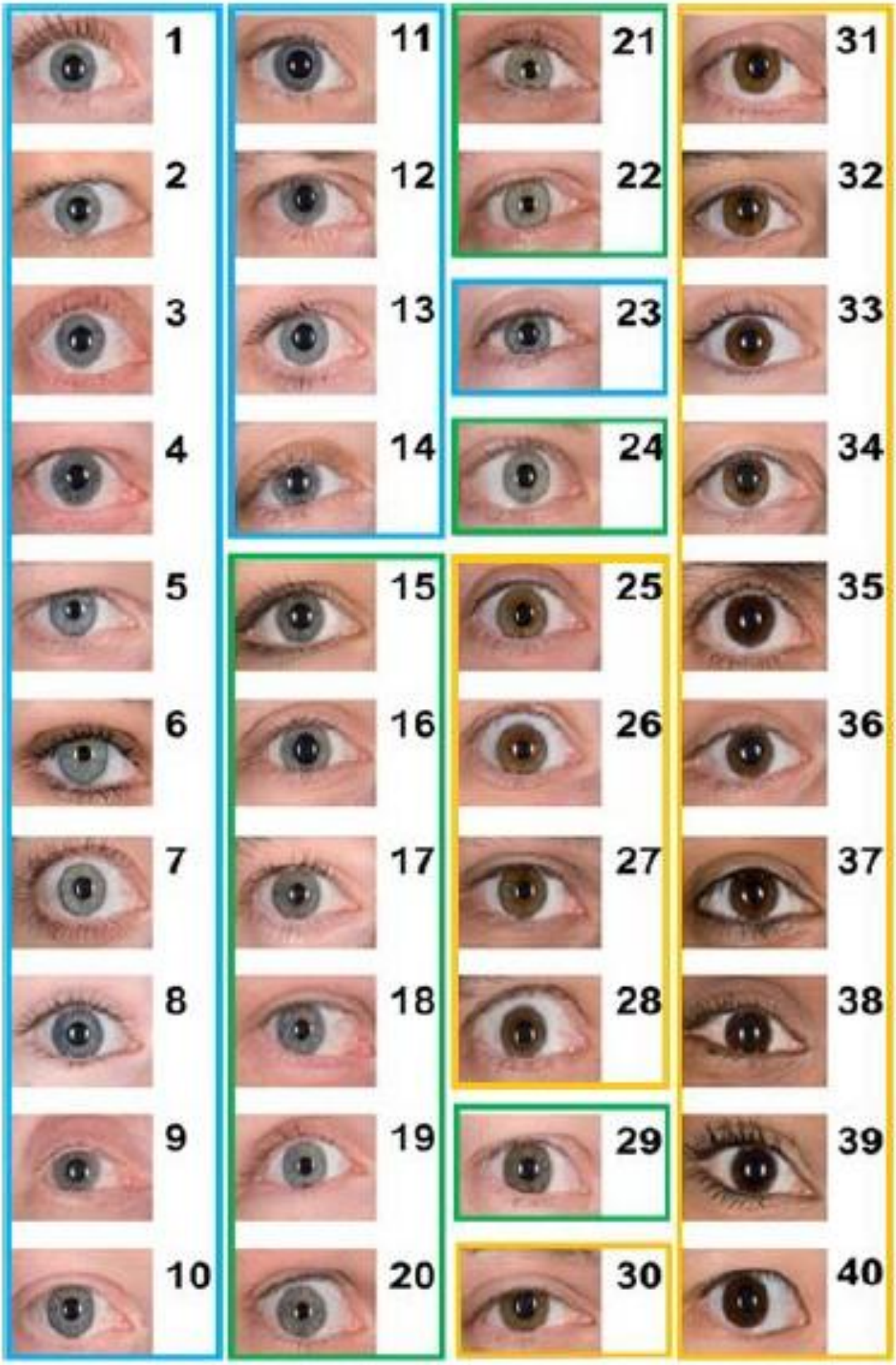
Standard	400nm	420nm
Batch		
Batch		
Batch		

ANEXO D



1: tons de loiro; 2:tons de castanho; 3: preto; 4: tons de ruivo

ANEXO E



Contorno azul: olhos azuis; Contorno verde: olhos verdes; Contorno amarelo: olhos castanhos. Adaptado de Walsh et al, 2011.

APÊNDICE

Artigos publicados:

APÊNDICE A - de Araújo Lima F, de Toledo Gonçalves F, Fridman C. SLC24A5 and ASIP as phenotypic predictors in Brazilian population for forensic purposes. Leg Med (Tokyo). 2015 Jul;17(4):261-6.

APÊNDICE B - Fridman C, Cardena MMSG, de Araújo Lima F, Gonçalves FT, Is it possible to use Forensic DNA phenotyping in Brazilian population? Forensic Science International: Genetics Supplement Series. 2015 Dec; 5:e378–e380.

APÊNDICE A

Legal Medicine 17 (2015) 261–266

Contents lists available at ScienceDirect

Legal Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/legalmed

SLC24A5 and *ASIP* as phenotypic predictors in Brazilian population for forensic purposes

Felícia de Araújo Lima, Fernanda de Toledo Gonçalves, Cintia Fridman *

Department of Legal Medicine, Ethics and Occupational Health, Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 19 December 2014
Received in revised form 26 February 2015
Accepted 4 March 2015
Available online 11 March 2015

Keywords:
SLC24A5
ASIP
Pigmentation genes
Polymorphisms
Brazilian population
Forensic genetics
DNA phenotyping

ABSTRACT

Pigmentation is a variable and complex trait in humans and it is determined by the interaction of environmental factors, age, disease, hormones, exposure to ultraviolet radiation and genetic factors, including pigmentation genes. Many polymorphisms of these genes have been associated with phenotypic diversity of skin, eyes and hair color in homogeneous populations. Phenotype prediction from biological samples using genetic information has benefited forensic area in some countries, leading some criminal investigations. Herein, we evaluated the association between polymorphisms in the genes *SLC24A5* (rs1426654) and *ASIP* (rs6058017) with skin, eyes and hair colors, in 483 healthy individuals from Brazilian population for attainable use in forensic practice. The volunteers answered a questionnaire where they self-reported their skin, eye and hair colors. The polymorphic homozygous genotype of rs1426654•A and rs6058017•A in *SLC24A5* and *ASIP* respectively, showed strongest association with fairer skin (OR 47.8; CI 14.1–161.6 and OR 8.6; CI 2.5–29.8); *SLC24A5* alone showed associations with blue eyes (OR 20.7; CI 1.2–346.3) and blond hair (OR 26.6; CI 1.5–460.9). Our data showed that polymorphic genotypes (AA), in both genes, are correlated with characteristics of light pigmentation, while the ancestral genotype (GG) is related to darker traits, corroborating with previous studies in European and African populations. These associations show that specific molecular information of an individual may be useful to access some phenotypic features in an attempt to help forensic investigations, not only on crime scene samples but also in cases of face reconstructions in unknown bodies.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Human pigmentation is one of the most variable and complex characteristics, determined by the interaction of genetic and hormonal factors, and it is also influenced by age, environment, drugs, and the exposure to ultra-violet radiation (UVR) [1,2].

The main protein responsible for pigmentation of skin, eyes and hair is melanin. This polymer is produced in a process that occurs in cutaneous melanocytes and can lead to the synthesis of two types of melanin: eumelanin, which is associated with brown and black pigment, and pheomelanin, related to red and yellow pigmentation [3,4].

Several genes have been associated with the pigmentation process and the normal variation of skin, eyes and hair color, although the interaction between the products of these genes is still poorly understood. Two important genes were recently described by their key role in melanogenesis: *SLC24A5* and *ASIP* [5,6]. The *SLC24A5* gene is located on chromosome 15 (15q21.1) and encodes a protein denoted NCKX5 (sodium/calcium/potassium exchanger 5) that works as ions carrier and it is involved in the control of pH within the melanosomes, which may influence the maturation of this organelle and the type of melanin produced [6,7]. *ASIP* is located on chromosome 20 (20q11.2-q12) and encodes the Agouti signaling protein which is expressed in several tissues, such as skin, fat, heart and kidney and has a role in regulation of pigmentation due to its antagonism toward Melanocortin 1 Receptor (*MC1R*) gene, inhibiting eumelanin synthesis in melanocytes, resulting in the production of pheomelanin, featuring in lighter phenotypes [8,5,9].

The contribution of the variants in *SLC24A5* and *ASIP* has gained importance in pigmentation, since non-synonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) in these genes have been associated with skin, eyes and hair color variation in homogeneous populations [10–13]. Two main polymorphisms in these genes have been frequently described [14,5,6,15].

The SNP in *SLC24A5* (rs1426654) is characterized by a substitution of a guanine to an adenine in exon three of the gene

* Corresponding author at: Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho – FMUSP, Rua Teodoro Sampaio 115, CEP, 05405-000, São Paulo, SP, Brazil. Tel./fax: +55 11 3061 8408.
E-mail address: cfridman@usp.br (C. Fridman).

http://dx.doi.org/10.1016/j.legalmed.2015.03.001
1344-6223/© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

(G > A), resulting in the substitution of alanine (Ala) by threonine (Thr) at position 111 of the protein (Ala111Thr), yielding a protein with reduced efficiency in the transport of ions and, consequently, pheomelanin production [2,5,16].

In *ASIP*, the polymorphism (rs6058017) occurs in 3′UTR and it is described as a substitution of a guanine to an adenine (G > A) [17]. It was previously described that lower expression of this gene happens when the allele G of the polymorphism is present in homozygous, causing less antagonism toward MC1R, which will bind to the alpha-Melanocyte-stimulating hormone (α-MSH), leading to the production of eumelanin, characterizing dark phenotypes [8,5]. When the polymorphic allele A is present, occurs the blocking of the activation of the melanogenesis process, resulting in the production of pheomelanin, leading in fairer phenotype [5,11].

The polymorphisms in *SLC24A5* and *ASIP* varies in frequencies between populations. Lamason et al. [6] postulated that several European populations carries the polymorphic allele A of *SLC24A5* (111Thr) in high frequency (98–100%), while the ancestral allele G (111Ala) is markedly present in African, Indigenous American, and East Asian population (93–100%).

ASIP also presents quite distinct frequencies among populations, being the polymorphic allele A present in high frequencies (>75%) in Europeans descendants and the ancestral allele G is present in over 60% of East Asian populations and 40% of African-American [17].

Due to these particular characteristics, several studies assessed these SNPs as predictors of phenotype in homogenous populations such as European, Afro-descendent and Asian, exhibiting great accuracy [18–20]. Based in this knowledge, in Netherlands a group developed a method called IrisPlex system for predicting eyes color based on the analysis of 06 SNPs in pigmentation genes, including the *ASIP* (rs6058017) and the *SLC24A5* (rs1426654) [20,21]. The authors reported that either with low concentrations of DNA or with already degraded material, which is normally found at crime scenes, it is possible to achieve one's information on External Visible Characteristics (EVCs) [19]. Later, the same group improved the method, creating the HirisPlex system, in which the analysis of 24 predictive variants in the DNA allowed the evaluation of both hair color and eye color [21]. Besides, the HirisPlex gave entire profiles when using different biological samples, for example, saliva stains, semen and hair with roots, denoting that the HirisPlex system can be used in forensics prediction [21].

The use of phenotypic inference using molecular information has been tested and used in some countries as an auxiliary tool in the identification of criminal suspects and missing people or victims of disasters [22,19]. This tool is known as forensic DNA phenotyping and includes the inference of bio geographical ancestry information and outwardly visible characteristics such as skin color, hair and eyes by direct DNA analysis [23].

Therefore, the aim of this study was to evaluate the association between the polymorphisms in the genes *SLC24A5* (rs1426654) and *ASIP* (rs6058017) with skin, eyes and hair colors in a sample of healthy individuals from Brazilian population for attainable use in forensic practice.

2. Materials and methods

2.1. Casuistic

We analyzed 483 volunteers, healthy and unrelated residing in São Paulo city (Southeast, Brazil). The sample was collected in one Institutional Complex which embraces a public Medical School and the biggest Public Hospital of the country, where we can find students and employees (professors, doctors, administrative and utility workers) with all ethnic origins from different regions of Brazil. It was representative of the admixture we can find along the country.

The volunteers answered a questionnaire where they self-reported their skin, eye and hair colors (the hair color refers to when the individuals were 15 years old, based in different samples of hair color, prepared by us as parameters). In order to avoid the bias in the self-reported information the same interviewer was responsible for the collection of all data. Besides, when noted some great discrepancy about the skin color reported and observed, the data was adjusted by using the reflectance measured from a portable spectrophotometer (data not shown). For eye color information two other researchers classified the eyes photos took in blind test.

All participants signed an informed consent form, and the Ethics Committee of the Clinical Hospital from Medical School, University of São Paulo, approved the research protocol.

2.2. Polymorphisms analysis in DNA

It was collected 4 ml of peripheral blood sample of each volunteer in tubes treated with EDTA. DNA extraction was performed following standard salting out techniques [24]. To analyze both SNPs (SLC24A5–rs1426654 and *ASIP*–rs6058017), DNA samples were amplified by simple PCR reaction using the primers *SLC24A5* Forward 5′- TCA TAA AGA AGC AAA ACA TTG GA-3′ and *SLC24A5* Reverse 5′-AGC ACA GAT GCC AAG GAG AT-3′ and *ASIP* Forward 5′-GGCTTCGATGAAGAAAGTGG-3′ and *ASIP* Reverse 5′-AGGGGATAGCCTCGTTCCTA-3′, according to Valenzuela et al. (2010) [25] protocols [25].

The sequencing of DNA was carried out with BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to manufacturer's protocol. All of the samples were sequenced in forward direction using the same PCR primers. Individual sequences were analyzed using the software BioEdit (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html) and then the ClustalW alignment program (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) for the definition of the genotypes.

2.3. Statistical methods

To estimate the associations between the phenotypic characteristics and genotypic frequencies, odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (95% CIs) were calculated. To test the statistical significance of gene–phenotypic characteristic, we used a stratification analysis comprising a dominant genetic model for genotypes and dichotomized characteristic. Hardy–Weinberg equilibrium was used to estimate the difference between the observed and expected genotype frequencies by using Monte Carlo's Goodness-of-Fit test. All tests were two-sided and were performed using the STATA 9.1 Software (StataCorp, College Station, Texas, USA).

3. Results

We genotyped 483 individuals for two SNPs (rs1426654 and rs6058017) related to pigmentation and mapped at *SLC24A5* and *ASIP* genes, respectively. The data for self-reference color eyes, hair and skin are shown in Table 1.

3.1. SLC24A5

Observing allelic and genotypic frequencies, our sample exhibits the variant allele (A) and polymorphic homozygous genotype (AA) in higher frequencies (79% and 67.5%, respectively) than ancestral allele (G) and homozygous genotype (GG), 21% and 9.1%, respectively (Table 2). Results of the χ^2 test for "Goodness

Table 1
Data for self-reference of eyes, hair and skin color.

Eye		Hair		Skin	
Color	n (%)	Color	n (%)	Color	n (%)
Dark brown	249 (51.80)	Brown	359 (74.3)	White	282 (58.3)
Light brown	79 (16.3)	Black	80 (16.5)	Brown	140 (28.9)
Medium brown	65 (13.4)	Blond	35 (7.2)	Black	39 (8.0)
Green	52 (10.7)	Red	9 (2.0)	Yellow	22 (4.8)
Blue	38 (7.8)	–	–	–	–

of Fit" were χ^2 8.13, $p = 0.004351$, revealing that deviation existed in the Hardy Weinberg equilibrium.

It was observed that the occurrence of homozygous genotype AA (rs1426654*A) was strongly associated with fairer skin phenotypes, being this association higher in white skin color ($p < 0.0001$; OR 47.8; CI 14.1–161.6), when compared to the group of black skinned self-declared individuals (Table 3). The heterozygous genotype (rs1426654*GA) also exhibited significant associations with skin color (Table 3), being associated with all non-black individuals groups.

Genotypic frequencies of the variant rs1426654*A in homozygous were also related to non-dark eyes, and the strongest association was observed in individuals with light brown ($p < 0.0001$; OR 36.6; CI 2.2–607.04) and blue eyes ($p = 0.0005$; OR 20.7; CI 1.2–346.3) (Table 4).

Furthermore, this variant showed statistical significance in non-black hair color, being the association stronger as bleaching occurs in hair pigmentation: brown-hair: $p = 0.0009$; OR 3.4; CI 1.7–6.9 and blond hair ($p = 0.0004$; OR 26.6; CI 1.5–460.9), but no relationship was observed between the rs142664*A variant and red-haired people (Table 5).

3.2. ASIP

Our SNP analysis revealed that, in the population evaluated in this study, the variant allele (A) and polymorphic homozygous genotype (AA) were shown in higher frequencies, 84% and 70.8%, respectively, than the ancestral allele (G) or homozygous genotype (GG), 16% and 3.5%, respectively (Table 2). No deviation from the Hardy–Weinberg equilibrium was observed for this polymorphism.

No significant association was observed between *ASIP* (rs6058017) and pigmentation traits, but fair skin color with the variant allele in homozygous (genotype AA) correlated to characteristics of white ($p = 0.0024$; OR 8.6; CI 2.5–29.8) and brown skin color ($p = 0.0228$; OR 5.1; CI 1.3–19.3) (Table 3).

4. Discussion

Our data corroborate with studies showing that *SLC24A5* plays important role in pigmentation providing interesting information on External Visible Characteristics useful in forensics, and that it can be used mainly to distinguish non-black from black characteristics. In our sample, this gene was significantly associated with light traits, such as white skin ($p < 0.0001$; OR 47.8; CI 14.1–161.6), blue eyes ($p = 0.0005$; OR 20.7; CI 1.2–346.3) and blond hair ($p = 0.0004$; OR 26.6; CI 1.5–460.9). For *ASIP* our results showed association only with skin traits of white ($p = 0.0024$; OR 8.6; CI 2.5–29.8) and brown colors ($p = 0.0228$; OR 5.1; CI 1.3–19.3).

Over the years, historical factors, such as, slavery, migrations and crossings between inter-ethnic individuals resulted in admixed populations and, consequently, transfer of genetic material occurred, creating a wide variety of phenotypes observed nowadays [26]. Brazilians configures one of the most mixed populations in the world in result of five centuries of inter-ethnic crossing between individuals from different continents: Brazilian Native Amerindians, the colonizers from Europe and the African slaves [27,28], therefore, this population is genetically mixed, holding fragments of DNA from all contributing groups [27,28]. The influence of these three genotypic roots in the formation of Brazilian population changed during the time. Brazil now is represented mostly by European ancestry in a response to more than 100 years of immigration of these people. Although studies connecting allele frequencies with phenotypic traits (color) and ancestry are becoming recurrent in the last years, only few surveys on Brazilian mixed population have been published [29,27,28,30,31].

Table 2
Distribution of genotype and allele frequencies of SNPs of *SLC24A5* and *ASIP* genes.

Genotypic frequencies						Allelic frequencies	
Polymorphism	Genotype	Observed n (%)	Expected n (%)	χ^2	p	Allele	Observed (%)
SLC24A5	GG	44 (9.1)	21.0 (4.4)			G^1	201 (21.0)
rs1426654	GA	113 (23.4)	159.0 (32.9)	8.13	0.004351	A^2	765 (79.0)
	AA	326 (67.5)	303.0 (62.7)				
ASIP	GG	17 (3.5)	12.9 (2.8)			G^1	158 (16.0)
rs6058017	GA	124 (25.7)	132.1 (27.3)	0.28	0.596465	A^2	808 (84.0)
	AA	342 (70.8)	337.9 (69.9)				

Table 3
Analysis of SNPs in relation to skin color.

Gene polymorphism	Genotype	Black n = 39 (%) ref*	White n = 282 (%)	OR (CI)	p	Brown n = 140 (%)	OR (CI)	p	Yellow n = 22 (%)	OR (CI)	p
SLC24A5	GG	11 (28.2)	5 (1.8)	1.0	–	11 (7.9)	1.00	–	17 (77.2)	1.00	–
rs1426654	GA	17 (43.6)	38 (13.5)	5.0 (1.5–16.4)	0.0092	57 (40.7)	3.4 (1.2–9.1)	0.0302	1 (4.5)	0.04 (0.04–0.32)	0.0002
	AA	11 (28.2)	239 (84.7)	47.8 (14.1–161.6)	<0.0001	72 (51.4)	6.5 (2.2–18.7)	0.0005	4 (18.3)	0.2 (0.05–0.92)	0.0546
ASIP	GG	5 (12.8)	7 (2.5)	1.0	–	5 (3.6)	1.0	–	0 (0)	1.0	–
rs6058017	GA	16 (41.0)	59 (20.9)	2.6 (0.7–9.4)	0.1517	44 (31.4)	2.8 (0.7–10.8)	0.1536	5 (22.8)	3.7 (0.2–77.6)	0.5451
	AA	18 (46.2)	216 (76.6)	8.6 (2.5–29.8)	0.0024	91 (65)	5.1 (1.3–19.3)	0.0228	17 (77.2)	10.5 (0.5–202.5)	0.0605

* Reference group.

Table 4
Analysis of SNPs in relation to the color of eyes.

Gene/ Polymorphism	Genotype	Dark brown n = 249 (%) ref*	Medium brown n = 65 (%)	OR (CI)	p	Light brown n = 79 (%)	OR (CI)	p	Green n = 52 (%)	OR (CI)	p	Blue n = 38 (%)	OR (CI)	p
SLC24A5	GG	36 (14.5)	5 (7.7)	1.0	–	0 (0)	1.0	–	3 (5.8)	1.0	–	0 (0)	1.0	–
rs1426654	GA	85 (34.1)	7 (10.8)	0.6 (0.2–2.0)	0.5128	15 (19.0)	13.2 (0.8–227.3)	0.0112	4 (7.7)	0.6 (0.1–2.7)	0.4849	2 (5.3)	2.1 (0.1–45.6)	1.0000
	AA	128 (51.4)	53 (81.5)	3.0 (1.1–8.0)	0.0294	64 (81.0)	36.6 (2.2–607.04)	<0.0001	45 (86.5)	4.2 (1.3–14.4)	0.0113	36 (94.7)	20.7 (1.2–346.3)	0.0005
ASIP	GG	8 (3.2)	3 (4.6)	1.0	–	5 (6.3)	1.0	–	0 (0)	1.0	–	1 (2.6)	1.0	–
rs6058017	AG	68 (27.3)	20 (30.8)	0.8 (0.2–3.2)	0.7141	18 (22.8)	0.4 (0.1–1.5)	0.1732	10 (19.2)	2.6 (0.1–48.6)	0.5880	8 (21.1)	0.9 (0.1–8.5)	1.0000
	AA	173 (69.5)	42 (64.6)	0.6 (1.2–2.60)	0.4612	56 (70.9)	0.5 (0.2–1.6)	0.3224	42 (80.8)	4.2 (0.2–73.6)	0.3575	29 (76.3)	1.3 (0.2–11.1)	1.0000

* Reference group.

Table 5
Analysis of SNPs in relation to hair color.

Gene/Polymorphism	Genotype	Black n = 80(%) ref*	Brown n = 359 (%)	OR (CI)	p	Blond n = 35 (%)	OR (CI)	p	Red n = 9 (%)	OR (CI)	p
SLC24A5	GG	16 (20.0)	28 (7.8)	1.0	–	0 (0)	1.0	–	0 (0)	1.0	–
rs1426654	GA	23 (28.8)	85 (23.6)	2.1 (1.0–4.6)	0.0651	2 (5.7)	3.5 (0.2–78.1)	0.5122	3 (33.3)	4.9 (0.2–101.7)	0.2753
	AA	41 (51.2)	246 (68.6)	3.4 (1.7–6.9)	0.0009	33 (94.3)	26.6 (1.5–460.9)	0.0004	6 (66.7)	5.2 (0.3–97.1)	0.3238
ASIP	GG	4 (5)	13 (3.6)	1.0	–	0 (0)	1.0	–	0 (0)	1.0	–
rs6058017	GA	22 (27.5)	92 (25.6)	1.3 (0.4–4.3)	0.7452	9 (25.7)	3.8 (0.2–77.8)	0.5531	1 (11.2)	0.6 (0.02–17.2)	1.0000
	AA	54 (67.5)	254 (69.8)	1.5 (0.5–4.6)	0.5180	26 (74.2)	4.4 (0.2–84.3)	0.3058	8 (88.8)	1.4 (0.07–28.5)	1.0000

* Reference group.

In our study, allele frequency of the *SLC24A5* showed a departure from Hardy–Weinberg equilibrium, which must be due to heterozygosity lower than expected, probably caused by the population stratification, an inherent event in admixture population. Despite this allele (or genotype) frequency deviation, the associations found between the polymorphism in heterozygous or homozygous in our sample are the same observed in homogenous populations.

We cannot rule out the possibility that the ancestry background of the Brazilian population being the responsible factor for the association observed, resulting in the differences in allele frequencies found between the lighter and darker characteristics, beside the association of the polymorphic allele with these characteristics. It is known that the polymorphism evaluated in this study together with two other SNPs in the same gene have been used to predict ancestral background of samples, especially for individuals with mixed ancestral background [15]. After all, the use of only one SNP is not viable to obtain ancestry information; thus, future studies of haplotype of *SLC24A5* in our population could be useful to confirm our findings.

Phenotypic prediction is a complex process that can also be affected by both genetic and environmental factors, as sun exposure or artificial effects, such as hair dying and contact lenses [32,33].

Having this knowledge and based on molecular analysis of the DNA, the association between the SNPs in *SLC24A5* (rs1426654) and *ASIP* (rs6058017) with pigmentation in Brazilian population becomes interesting since we can start thinking to use the obtained data in an attempt to predict phenotypes from genotypes and make it useful in forensics area.

It is known that the polymorphism in *SLC24A5* gene (rs1426654) may cause variations in pigmentation and the frequencies of these variations differs among some populations [6,10,2]. This variant have been previously described as responsible for the change in amino acid (Thr111Ala), producing a less efficient protein, resulting in light phenotypes [6,34,32,2].

According to Lamason et al. [6], who first described *SLC24A5* as having important role in pigmentation, African and East Asian populations show the conserved ancestral genotype rs1426654•G in high frequencies (93–100%), giving this populations dark traits of External Visible Characteristics, while in Europeans the frequencies for the variant rs1426654•A ranged from 98–100%, characterizing fairer phenotypes. Other studies comparing this SNP in European, African and Asian populations were consistent with the previous findings, showing the homozygous ancestral genotype fixed in Africans (black phenotypes) and East-Asians (intermediate phenotypes) [10,35,15,36].

In 2009, a research on Greek population demonstrated that the rs1426654•G is absent in this population, which showed 99% of the rs1426654•A and only 1% of the heterozygous rs1426654•GA, and even with these results, the author observed differences in phenotypes, also seen in our population, suggesting that other genes participate of the pigmentation process as well [37]. Besides, Canfield et al. [38] gave some detail on the geographical distribution of the rs1426654•A, confirming that this SNP is nearly set in all Europeans and showing a latitudinal decline so as to near the Equator, with 80% frequencies in Northern Africa, 40–60% in Ethiopia and Somalia, and 35% in sub-Saharan-Africa which, as specified by the author, explains the action of natural selection, that caused the reduction in skin melanization in all Europe [38]. Freshly, a study in admixed African-Europeans, Europeans and Africans classified the SNP in *SLC24A5* (rs1426654) as the first marker used in the differentiation from black to non-black traits, showing the importance of this gene in forensics practices [33].

There are few data on the frequency of *SLC24A5* and *ASIP* polymorphisms in Brazilian population, however, our data showed that the majority of our population (67.5% for *SLC24A5* and 70.8% for *ASIP*) had AA genotype for both polymorphic genes, which corroborates the hypothesis that natural selection acts on these genes according to the proximity or distance of the tropics [39], being São Paulo farther from the equatorial regions, where we observed phenotypes of individuals with lighter skin.

Furthermore, studies performed by Leite et al. [29] and Cerqueira et al. [30] in Brazilian population, compared melanin index (MI) with some genes known as Ancestry Informative Markers (AIMs) and found out that *SLC24A5* was strongly correlated with pigmentation, showing that the homozygous ancestral genotype (rs1426654•G) and the heterozygous genotype (rs1426654•GA) were related to an increase of MI in comparison to the polymorphic variant rs1426654•A, being in agreement with our findings. Yet, according to the authors, the effect of both alleles, A and G together (heterozygous), seems not to be well understood, being necessary further studies that attempt to explain this relationship [30,31].

On the other hand, studies conducted in Brazilian population, described that *ASIP* did not show any associations with pigmentation, which is justified, by the authors due to the possibility that this gene be specific of some populations [30,31]. The contrast between our findings and these ones could be explained by the differences in sample size, but additional studies are necessary.

Kanetsky et al., in 2002 genotyped 746 individuals from USA and reported that the carriage of the rs6058017•G in *ASIP* was related to brown eyes and dark hair [14]. Voisey et al. [9], postulated that the variant rs6058017•A appears in 93% of Caucasian (light EVCs), 90% of Asians (intermediate EVCs) and 76% of Australian Aborigines (dark EVCs), while the ancestral rs6058017•G was observed in 7% of Caucasians, 12.5% of Asians and 24% of Australian Aborigines [9]. According to the authors, these characteristics confirm the hypothesis that the ancestral rs6058017•G is related to darker traits [14,9].

Additional analysis of *ASIP* in other studies revealed that West Africans with dark EVCs exhibit the ancestral rs6058017•G in high frequencies (80%) while East Asians exhibited 28% and Mexican indigenous populations showed very low frequencies (1.5%) for the homozygous ancestral genotype [17,5]. In a study performed in French population, the ancestral rs6058017•G was notably related with dark or brown hair and with darker skin phenotypes [40] and in North Americans, the frequency of it was 12% in dark skin and hair [41]. Similar results were observed in Caucasians from Pennsylvania, where 12% of the population displayed the rs6058017•G in association with brown eyes and dark hair [14]. Recently, a training carried out in Africans, Europeans and African-Europeans, revealed that *ASIP* is one of the most important genes, being a marker in classification of black people, showing that the genotype rs6058017•G in homozygous was observed only in black individuals [33]. In our study, *ASIP* showed association only with non-black skin phenotypes, suggesting that more studies need to be done in order to verify the relation of this gene with other pigmentation traits in mixed population, such Brazilian.

5. Conclusion

Many groups in different countries are working hard to find genetic markers that can be used in DNA phenotyping, especially in pigmentation traits, but few studies are performed in such a mixed population as Brazilians. Our study reveals the validation of *SLC24A5* as molecular predictor of phenotypes in admixed populations, even with a possible influence of the ancestry background in this kind of sample. It demonstrates and pointed that this gene can be used in forensic area, not only on crime scene samples but also in cases of face reconstructions in unknown bodies, with great

fidelity not only in homogeneous populations but also in admixtured ones. *ASIP*, on the other hand, is a gene that must be better analyzed in admixtured populations to check if the associations described are also suitable to these populations or if this gene could be considered a phenotypic marker only in homogeneous populations. A better understanding of the process of pigmentation requires more studies and concomitant analysis of several genes related to the melanogenesis. Additional analyses are ongoing as part of a project that evaluates 12 SNPs in 5 pigmentation genes to check possible associations of phenotypic pigmentation in the Brazilian population, together with the information of melanin index.

Acknowledgements

This study was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and HC-LIM/FMUSP.

References

[1] Pneuman A, Budimlija ZM, Caragine T, Prinz M, Wurmbach E. Verification of eye and skin color predictors in various populations. Leg Med (Tokyo) 2012;14(2):78–83.
[2] Wilson S, Ginger RS, Dadd T, Gunn D, Lim F, Sawicka M, et al. NCOA5, a natural regulator of human skin colour variation, regulates the expression of key pigment genes MC1R and alpha-MSH and alters cholesterol homeostasis in normal human melanocytes. Adv Exp Med Biol 2013;961:95–107.
[3] Branicki W, Brudnik U, Kupiec T, Wolańska-Nowak P, Wojas-Pelc A. Determination of phenotype associated SNPs in the MC1R gene. J Forensic Sci 2007;52(2):349–54.
[4] Suzuki H. Evolutionary and phylogeographic views on Mc1r and Asip variation in mammals. Genes Genet Syst 2013;88(3):155–64.
[5] Bonilla C, Boxill LA, Donald SA, Williams T, Sylvester N, Parra EJ, et al. The 8818G allele of the agouti signaling protein (ASIP) gene is ancestral and is associated with darker skin color in African Americans. Hum Genet 2005;116(5):402–6.
[6] Lamason RL, Mohideen MA, Mest JR, et al. SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. Science 2005;310(5755):1782–6.
[7] Nadeau NJ, Minvielle F, Ito S, Inoue-Murayama M, Gourichon D, Follett SA, et al. Characterization of Japanese quail yellow as a genomic deletion upstream of the avian homolog of the mammalian ASIP (agouti) gene. Genetics 2008;178(2):777–86.
[8] Voisey J, Kelly G, Van Daal A. Agouti signal protein regulation in human melanoma cells. Pigment Cell Res 2003;16(1):65–71.
[9] Voisey J, Gomez-Cabrera Mdel C, Smit DJ, Leonard JH, Sturm RA, van Daal A. A polymorphism in the agouti signalling protein (ASIP) is associated with decreased levels of mRNA. Pigment Cell Res 2006;19(3):226–31.
[10] Soejima M, Koda Y. Population differences of two coding SNPs in pigmentation-related genes SLC24A5 and SLC45A2. Int J Leg Med 2007;121(1):36–9.
[11] Scherer D, Kumar R. Genetics of pigmentation in skin cancer – a review. Mutat Res 2010;705(2):141–53.
[12] White D, Rabago-Smith M. Genotype–phenotype associations and human eye color. J Hum Genet 2011;56(1):5–7.
[13] Mallick CB, Iliescu FM, Möls M, et al. The light skin allele of SLC24A5 in South Asians and Europeans shares identity by descent. PLoS Genet 2013;9(11):e1003912.
[14] Kanetsky PA, Swoyer J, Panossian S, Holmes R, Guerry D, Rebbeck TR. A Polymorphism in the agouti signaling protein gene is associated with human pigmentation. Am J Hum Genet 2002;70:770–5.
[15] Giardina E, Pietrangeli I, Martinez-Labarga C, Martone C, de Angelis F, Spinella A, et al. Haplotypes in SLC24A5 gene as ancestry informative markers in different populations. Curr Genomics 2008;9(2):110–4.
[16] Cook AL, Chen W, Thurber AE, et al. Analysis of cultured human melanocytes based on polymorphisms within the SLC45A2/MATP, SLC24A5/NCKX5, and OCA2/P loci. J Invest Dermatol 2009;129(2):392–405.
[17] Zeigler-Johnson C, Panossian S, Gueye SM, Jalloh M, Ofori-Adjei D, Kanetsky PA. Population differences in the frequency of the agouti signaling protein g.8818a>G polymorphism. Pigment Cell Res 2004;17(2):185–7.
[18] Liu F, van Duijn K, Vingerling JR, Hofman A, Uitterlinden AG, Janssens AC, et al. Eye color and the prediction of complex phenotypes from genotypes. Curr Biol 2009;19(5):R192–3.
[19] Walsh S, Liu F, Ballantyne KN, van Oven M, Lao O, Kayser M. IrisPlex: a sensitive DNA tool for accurate prediction of blue and brown eye colour in the absence of ancestry information. Forensic Sci Int Genet 2011;3:170–80.
[20] Walsh S, Wollstein A, Liu F, et al. DNA-based eye colour prediction across Europe with the IrisPlex system. Forensic Sci Int Genet 2012;3:330–40.
[21] Walsh S, Liu F, Wollstein A, Kovatsi L, Ralf A, Kosiniak-Kamysz A, et al. The HIrisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA. Forensic Sci Int Genet 2013;1:98–115.
[22] Whittall H. The forensic use of DNA: scientific success story, ethical minefield. Biotechnol J 2008;3:303–5.
[23] Kayser M, de Knijff P. Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. Nat Rev Genet 2011;3:179–92.
[24] Muller SA, Dyles DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1998;16(3):1215.
[25] Valenzuela RK, Henderson MS, Walsh MH, et al. Predicting phenotype from genotype: normal pigmentation. J Forensic Sci 2010;55(2):315–22.
[26] Hellenthal G, Busby GBJ, Band G, Wilson JF, Capelli C, Falush D, et al. A genetic atlas of human admixture history. Science 2014;343(6172):747–51.
[27] Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. PLoS One 2011;6(2):e17063.
[28] Cardena MM, Ribeiro-Dos-Santos A, Santos S, Mansur AJ, Pereira AC, Fridman C. Amerindian genetic ancestry is associated with higher survival rates compared to African and European ancestry in Brazilian patients with heart failure. Int J Cardiol 2013;176(2):527–8.
[29] Leite TK, Fonseca RM, de França NM, Parra EJ, Pereira RW. Genomic ancestry, self-reported "color" and quantitative measures of skin pigmentation in Brazilian admixed siblings. PLoS One 2011;6(11):e27162.
[30] Cerqueira CCS, Hünemeier T, Gomez-Valdés J, et al. Implications of the admixture process in skin color molecular assessment. PLoS One 2014;9(5):e96886.
[31] Duttso DF, Bydlowski SP, Hutz MH, Suarez-Kurtz G, Magalhães TR, Pena SD. Association of genetic variants with self-assessed color categories in Brazilians. PLoS One 2014;9(1):e83926.
[32] Liu F, Wen B, Kayser M. Colorful DNA polymorphisms in humans. Semin Cell Dev Biol 2013;24(6–7):562–75.
[33] Maroñas O, Phillips C, Söchtig J, et al. Development of a forensic skin colour predictive test. Forensic Sci Int Genet 2014;13:34–44.
[34] Sturm RA. Molecular genetics of human pigmentation diversity. Hum Mol Genet 2009;18(1):9–17.
[35] Norton HL, Kittles RA, Parra E, et al. Genetic evidence for the convergent evolution of light skin in Europeans and East Asians. Mol Biol Evol 2007;24(3):710–22.
[36] Bouakaze C, Keyser C, Crubézy E, Montagnon D, Ludes B. Pigment phenotype and biogeographical ancestry from ancient skeletal remains: inferences from multiplexed autosomal SNP analysis. Int J Legal Med 2009;123(4):315–25.
[37] Dimisianos G, Stefanaki I, Nicolaou V, et al. A study of a single variant allele (rs1426654) of the pigmentation-related gene SLC24A5 in Greek subjects. Exp Dermatol 2009;18(2):175–7.
[38] Canfield VA, Berg A, Peckins S, Wentzel SM, Ang KC, Oppenheimer S, et al. Molecular phylogeography of a human autosomal skin color locus under natural selection. G3 (Bethesda) 2013;3(11):2059–67.
[39] Jablonski NG, Chaplin G. Human skin pigmentation as an adaptation to UV radiation. Proc Natl Acad Sci U S A 2010;107(2):8962–8.
[40] Meziani R, Descamps V, Gérard B, et al. Association study of the g.8818A>G polymorphism of the human agouti gene with melanoma risk and pigmentary characteristics in a French population. J Dermatol Sci 2005;40(2):133–6.
[41] Wilson BD, Ollmann MM, Kang L, Stoffel M, Gell GI, Barsh GS. Structure and function of ASP, the human homology of the mouse agouti gene. Hum Mol Genet 1995;4:223–30.

APÊNDICE B

Forensic Science International: Genetics Supplement Series 5 (2015) e378–e380

Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics Supplement Series

journal homepage: www.elsevier.com/locate/FSIGSS

Is it possible to use Forensic DNA phenotyping in Brazilian population?

Cintia Fridman*, Mari Maki Síria Godoy Cardena, Felícia de Araújo Lima, Fernanda de Toledo Gonçalves

Department of Legal Medicine, Ethics and Occupational Health, Medical School, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 10 August 2015
Accepted 16 September 2015
Available online 25 September 2015

Keywords:
SLC45A2
Pigmentation
Polymorphisms
Forensic DNA phenotyping
Brazilian Population

ABSTRACT

The prediction of human traits in order to help forensic investigations has been one of the most interesting researches in the last decade. Some pigmentation genes such as *SLC45A2* variants have been associated with phenotypic diversity of skin, eyes and hair color in homogeneous populations. The aim of this study was evaluate the possibility of association between three *SLC45A2* polymorphisms (rs26722, rs16891982 and 2,278,007) with skin, eye and hair color in a sample of 598 individuals of admixed population from Brazil, intending to use it in forensic genetic situations. DNA sequencing was performed with BigDye Terminator v3.1 and capillary electrophoresis was performed in ABI3130. Presence of rs16891982 variant (C>G) was associated with non-black skin (OR 16.35; CI 6.014–44.5), as well as with non-black hair (OR 18.12. CI 5.25–62.6) and light eyes (OR 5.04; CI 2.6–9.6). Polymorphism rs2278007 in heterozygous (AG) was associated with a lower probability of individual presenting lighter pigmentation of skin and hair. Our data corroborates the findings of other studies in homogeneous populations, suggesting that the analysis of *SLC45A2* polymorphisms can be used as a tool to access some phenotypic traits and use to help forensic identifications as molecular predictor of phenotypes also in admixed populations. These results supplement the previous ones we showed in the same population with the genes *SLC24A5* and *ASIP*, and they are part of major project, which aims to study the correlation of several pigmentation genes and skin, hair and eye color in Brazilian population.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Pigmentation is a variable and complex trait in humans determined by different kinds of factors, including pigmentation genes. Many polymorphisms in these genes have been associated with phenotypic diversity of skin, eye and hair color in homogeneous populations [1,2]. *SLC45A2* is a gene known for its rule in human pigmentation traits [1], located on the short arm of chromosome 5 that encodes MATP (membrane-associated transporter protein), which is a transporter that mediates melanin synthesis, since it is responsible to conduct the flow of melanosomal proteins and ions to the melanosomes [3,4].

Mutations on this gene lead to normal variation in pigmentation of humans' traits and to oculocutaneous albinism IV, defined by the failure to synthesize melanin [5]. Two single nucleotide polymorphisms (SNPs) in this gene have being associated to skin, hair, and eye color in South Asians, Europeans and admixed populations, they are: 1) rs26722—GAG (glutamate)/AAG (lysine) in codon 272 (E272K) and 2) rs16891982—TTC (phenylalanine)/TTG (leucine) in codon 374 (F374L) [6]. The latter, was postulated as useful to predict skin and hair color with accuracy between 72 and 96%. This SNP (rs16891982) was also included in the IrisPlex system [7], where they analyzed 37 SNPs in eight genes associated with eye color in Dutch and proved that *SLC45A2* was specific in differentiating blue and brown eyes. Besides, *SLC45A2* (rs16891982) provided greater accuracy in predictions for light and dark hair color and was added to the HIrisPlex system [8].

Analysis of SNPs in order to predict skin, eyes and hair phenotypes is well established in European countries where populations are more homogeneous. Although Brazilian population is considered one of the most ethnically mixed and heterogeneous in the world resulting from cross between populations of different ethnic origins over the centuries [9], checking associations and possible applicability of the analysis of polymorphisms involved in the pigmentation process becomes interesting. Herein, we analyzed the possible association of SLC45A2 polymorphisms with skin, eye and hair color in Brazilian individuals in order to use it for forensic purpose.

* Corresponding author at: Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho—FMUSP, Rua Teodoro Sampaio 115, CEP 05405-000, São Paulo, SP, Brazil. Fax: +55 11 3061 8408.
E-mail address: cfridman@usp.br (C. Fridman).

http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigss.2015.09.150
1875-1768/ © 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

2. Methods

We included in this study 598 healthy and unrelated volunteers from the Medical School of University of São Paulo (USP) that agreed to participate in the survey after the presentation of the project approved by the Ethics Committee of the School.

The volunteers answered a questionnaire where they self-reported their skin, eye and hair colors (the hair color refers to when the individuals were 15 years old).

DNA samples were extracted from 4 ml of peripheral blood and amplified by simple PCR reaction using specific primers according to Mengel-From et al. protocols [10]. The sequencing of DNA was carried out with BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to manufacturer's protocol and capillary electrophoresis was performed in ABI3130 sequencer (Applied Biosystems).

3. Results

The SNP rs26722 did not show any association with the evaluated traits.

On the other hand, the polymorphic allele of rs16891982 variant (heterozygous) was associated with white skin, (OR 3.08; CI 1.90–8.15; $p = 0.0003$) and brown hair (OR 2.56; CI 1.41–4.66; $p = 0.002$). The same SNP, in homozygous (G), was also associated with white skin color (OR 16.35; CI 6.01–44.5 $p < 0.0001$), blond hair (OR 18.12; CI 5.25–62.60; $p < 0.0001$) and non-black eyes, being the most significant association with green eyes (OR 5.04; CI 2.6–9.6; $p < 0.0001$).

A third SNP was evaluated, rs2278007, that showed to be associated in heterozygous with a lower probability of individual presenting lighter pigmentation, such as, white skin (OR 0.32; CI 0.14–0.70; $p = 0007$); blond hair (OR 0.15; CI 0.03–0.69; $p = 0.006$) and green eyes (OR 0.5; CI 0.26–0.95; $p = 0.04$).

All the analysis was conducted using black individuals as reference to the comparisons.

4. Discussion

In recent years, the use of phenotypic inference by means of SNPs has been tested in some countries as an auxiliary tool for the identification of persons and criminal suspects. This tool is known as DNA phenotyping and its use allows the prediction of external visible characteristics (EVC), such as skin, eye and hair color by direct DNA analysis [3]. Even though such phenotypes can be masked by the use of contact lenses, hair dyeing or even tanning of the skin, obtaining the phenotype of an individual from biological material may be of great importance for forensic practice, both in the criminal and civil context, such as mass disasters and missing persons.

Our data showed that two SNPs (rs16891982 and rs2278007) were related to skin, eyes, and hair pigmentation in Brazilian individuals. Although the association between rs2278007 with pigmentation traits is not yet well documented in other populations, we found it in our sample, specially related to darker phenotypes; thus, we can suggest that this SNP is also a great phenotyping maker in admixed population, since there are no published data that suggest this polymorphism as a marker of homogeneous populations.

Soejima et al. [11] performed a study in different population analyzing *SLC45A2* and identified the TTC (rs16891982) variant present in almost the entire Europeans with white skin, while the TTG (rs16891982) was present in all African populations with dark skin [11]. This result come upon the one we found in our population and this must be due the migration processes in Brazil that resulted in cross between populations of different continents and thus different exchange of genetic information [9].

In our population, we found that the G allele of rs16891982 is correlated to green eyes and non-dark skin color. Hart et al., [12] performed a study with Americans and found that when the allele C is observed in homozygous it is possible to predict brown and green eye color, but when the G allele in *SLC45A2* (rs16891982) is present, one can predict non-dark skin color [12].

SLC45A2 proved to be an important predictor of EVC, but it is important to highlight that we cannot use a SNP alone to infer complex traits, therefore, this study is complementary to a study carried out also in the Brazilian population, which evaluated SNPs in *SLC24A5* and *ASIP* genes to understand the evolution of pigmentation processes in admixture populations [13].

5. Conclusions

These associations between pigmentation genes and skin, eye and hair color shows that it is possible to use molecular information of an individual to access its phenotypic traits and use the obtained in attempt to help forensic investigations. Thus, this study reveals that the validation of the SNPs on *SLC45A2* as molecular predictors of phenotypes in admixed populations demonstrates that this gene can be used in forensic area, not only in homogeneous populations, but also in admixtured ones. A better understanding of the pigmentation process requires more studies and concomitant analysis of several genes related to the complex process of melanogenesis.

Conflict of interest

There is no conflict of interest.

Role of the funding source

The study sponsors had no involvement in any step of this manuscript.

Acknowledgments

This study was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo/2012/02043-6), LIM 40/HCFMUSP.

References

[1] M. Kayser, P. de Knijff, Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology, Nat. Rev. Genet. 12 (2011) 179–192.
[2] A. Pneuman, Z.M. Budimlija, T. Caragine, et al., Verification of eye and skin color predictors in various populations, Legal Med. (Tokyo) 14 (2012) 78–83.
[3] R.A. Sturm, R.D. Teasdale, N.F. Box, Human pigmentation genes: identification, structure and consequences of polymorphic variation, Gene 277 (2001) 49–62.
[4] J. Graf, J. Voisey, I. Hughes, et al., Promoter polymorphisms in the MATP (SLC45A2) gene are associated with normal human skin color variation, Hum. Mutat. 28 (2007) 710–717.
[5] M. Ibarrola-Villava, H.H. Hu, M. Guedj, et al., MC1R, SLC45A2 and TYR genetic variants involved in melanoma susceptibility in southern European populations: results from a meta-analysis, Eur. J. Cancer 48 (2012) 2183–2191.
[6] K. Nakayama, S. Fukamachi, H. Kimura, et al., Distinctive distribution of AIM1 polymorphism among major human populations with different skin color, J Hum Genet. 47 (2002) 92–94.
[7] F. Liu, K. van Duijn, J.R. Vingerling, et al., Eye color and the prediction of complex phenotypes from genotypes, Curr. Biol. 19 (2009) R192–R193.
[8] S. Walsh, F. Liu, A. Wollstein, et al., The HIrisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA, Forensic Sci. Int. Genet. 7 (2013) 98–115.

[9] S.D. Pena, G. Di Pietro, M. Fuchshuber-Moraes, et al., The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected, PLoS One 6 (2011) e17063.
[10] J. Mengel-From, C. Barsting, J.J. Sanchez, et al., Human eye colour and HERC2, OCA2 and MATP, Forensic Sci. Int. Genet. 4 (2010) 323–328.
[11] M. Soejima, Y. Koda, Population differences of two coding SNPs in pigmentation-related genes SLC24A5 and SLC45A2, Int. J. Legal Med. 121 (2007) 36–39.
[12] K.L. Hart, S.L. Kimura, V. Mushailov, et al., Improved eye- and skin-color prediction based on 8 SNPs, Croat. Med. J. 54 (2013) 248–256.
[13] F. de Araújo Lima, F. de Toledo Gonçalves, C. Fridman, SLC24A5 and ASIP as phenotypic predictors in Brazilian population for forensic purposes, Legal Med. (Tokyo) 17 (2015) 261–266.