

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO

ALISON LUIS EBURNEO PEREIRA

**Diversidade genética das regiões regulatórias e exônicas dos
genes *ASIP*, *MC1R*, *KITLG* e *BNC2* e sua implicação na
manifestação de vitiligo em amostra da população brasileira**

RIBEIRÃO PRETO

2022

ALISON LUIS EBURNEO PEREIRA

Diversidade genética das regiões regulatórias e exônicas dos genes *ASIP*, *MC1R*, *KITLG* e *BNC2* e sua implicação na manifestação de vitiligo em amostra da população brasileira

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor(a) em Ciências.

Área de concentração: Genética

Orientador: Dr. Celso Teixeira Mendes Junior

RIBEIRÃO PRETO

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Pereira, Alison Luis Eburneo

Diversidade genética das regiões regulatórias e exônicas dos genes *ASIP*, *MC1R*, *KITLG* e *BNC2* e sua implicação na manifestação de vitiligo em amostra da população brasileira/ Alison Luis Eburneo Pereira. Ribeirão Preto, 2022.

189p

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Celso Teixeira Mendes Junior.

Vitiligo. *Basonuclin 2*. *Agouti signaling protein*. *Melanocortin 1 receptor*. *KIT ligand*. Ancestralidade genômica. Interação gene-gene.

Nome: PEREIRA, Alison Luis Eburneo

Title: Genetic diversity of regulatory and exonic regions of *ASIP*, *MC1R*, *KITLG* and *BNC2* genes and their implication in the onset of vitiligo in a Brazilian sample

Título: Diversidade genética das regiões regulatórias e exônicas dos genes *ASIP*, *MC1R*, *KITLG* e *BNC2* e sua implicação na manifestação de vitiligo em amostra da população brasileira

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor(a) em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Celso Teixeira Mendes Junior

Aprovado em:

Banca examinadora:

Orientador: Celso Teixeira Mendes Junior

Instituição: Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

A todas e todos que escolheram
se manter na ciência em tempos tão
obscuros

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao meu orientador, Prof. Dr. Celso Teixeira Mendes Junior, a quem considero muito mais do que orientador. Por toda a paciência, pela compreensão, pelo apoio e pela orientação.

Aos meus colegas do Laboratório de Pesquisa Forense e Genômica (LPFG), por me ajudarem a crescer como pesquisador.

Ao Dr. Esteban Parra e Dr. Heather Norton, da Universidade de Cincinnati, por sua contribuição ao projeto de pesquisa.

À Dra. Renata Nahas Cardili, do Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, por nos receber no hospital e dar acesso aos pacientes com vitiligo.

À Dra. Milena Flória-Santos e seu grupo de pesquisa da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto (EERP) e ao Hemocentro de Ribeirão Preto pelo auxílio na coleta das amostras.

Ao Dr. Eduardo Antônio Donadi, e ao Laboratório de Imunopatologia Molecular, por disponibilizar seu laboratório para os ensaios de sequenciamento.

Ao Dr. Aguinaldo Luiz Simões, e ao Laboratório de Bioquímica Genética, pelo auxílio na coleta das amostras.

Ao Dr. Erick da Cruz Castelli, da Universidade Estadual Paulista (UNESP), pelo auxílio nas análises de bioinformática.

A todos os que aceitaram participar deste estudo, pelo voto de confiança que a doação de seu bem mais precioso e único neste mundo (seu material genético) será usado para contribuir com o conhecimento da humanidade.

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, e ao Departamento de Genética pela oportunidade de formar o profissional que me tornei hoje.

Aos meus pais, meus irmãos, meus amigos com quem falo todo dia, e com quem falo raramente. À minha esposa por me escolher para compartilhar essa caminhada.

Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Este estudo foi financiado em parte pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de S. Paulo (FAPESP).

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001.

*“I have no special talent.
I am only passionately curious”
Albert Einstein*

Pereira, ALE. **Diversidade genética das regiões regulatórias e exônicas dos genes ASIP, MC1R, KITLG e BNC2 e sua implicação na manifestação de vitiligo em amostra da população brasileira.** Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2022.

RESUMO

Introdução: O vitiligo é o distúrbio de pigmentação mais frequente do mundo, e afeta aproximadamente 0,05 a 2,28% da população mundial. É uma doença crônica caracterizada pela destruição dos melanócitos da pele, que causa máculas hipo-pigmentadas. A diversidade nas sequências dos genes envolvidos na biossíntese de melanina pode influenciar na incidência desta condição. Além disso, essa diversidade genética pode influenciar nas proporções produzidas de eumelanina e feomelanina, influenciando diretamente no fenótipo de pigmentação resultante. **Objetivo:** Análise da diversidade genética das regiões promotora, 5' UTR, 3' UTR e exônicas dos genes *ASIP*, *MC1R*, *KITLG* e *BNC2* envolvidos no processo de biossíntese de melanina. **Método:** Foram avaliados 544 indivíduos, sendo que 471 como grupo controle foram recrutados junto aos Hemocentros de Ribeirão Preto - SP, e 73 pacientes com vitiligo foram recrutados junto ao Ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Ambos grupos foram classificados de acordo com fenótipos de olhos, cabelos e pele. Bibliotecas de DNA (HaloPlex, Agilent) incluindo as sequências regulatórias e codificantes dos três genes foram preparadas e submetidas a análise por metodologia de sequenciamento de nova geração (MiSeq, Illumina). As associações entre fenótipo e genótipo foram testadas por modelos de regressão logística e de interação gene-gene. **Resultados:** Foram identificados 788 pontos de variação que se distribuem em: 71 no gene *ASIP*, 133 no *MC1R*, 431 no *BNC2* e 154 no *KITLG*. De todas as associações significativa a todos os fenótipos estudados (221), 121 foram identificadas sem considerar o efeito de confusão da ancestralidade, e 100 são significantes mesmo considerando a ancestralidade como covariável. Além de variantes de ponto, a definição de haplótipos permitiu identificar 50 associações, 27 no gene *ASIP*, 7 no *MC1R* e 16 no *BNC2*. Em relação especificamente ao fenótipo vitiligo, apenas os genes *BNC2* e *KITLG* apresentaram associações significativas, com 9 e 5, respectivamente. Resultados mostram evidências que o alelo G da variante rs1425090456 (associada a vitiligo com $p = 4,12 \cdot 10^{-06}$, OR = 124) do gene *BNC2*, que sobreposição de sítio de ligação de diversos fatores de transcrição, possa afetar a expressão correta deste gene, e levar ao fenótipo vitiligo. Para o gene *KITLG*, o alelo A da variante rs188394671 foi associado a vitiligo ($p = 2,04 \cdot 10^{-05}$ e OR = 30,77), e sobreposição também um complexo mecanismo de regulação, com interação de diversos

fatores de transcrição. Esta alteração pode refletir em uma alteração da expressão de *KITLG*, e assim, levar ao fenótipo vitiligo. **Conclusão:** os resultados deste estudo colaboram com o conhecimento sobre o desenvolvimento de vitiligo e sobre a melanogênese ao caracterizar profundamente as regiões codificantes e regulatórias de quatro genes que estão diretamente envolvidos na via metabólica de pigmentação humana. Esse é o primeiro estudo a identificar variantes no gene *BNC2* associadas ao desenvolvimento de vitiligo, assim como um dos primeiros a avaliar a contribuição da ancestralidade para a predisposição à doença em uma população miscigenada para estes genes.

Palavras-chave: Vitiligo. *Basonuclin 2*. *Agouti signaling protein*. *Melanocortin 1 receptor*. *KIT ligand*. Ancestralidade genômica. Interação gene-gene.

Pereira, ALE. **Genetic diversity of regulatory and exonic regions of *ASIP*, *MC1R*, *KITLG* and *BNC2* genes and their implication in the onset of vitiligo in a Brazilian sample.** Thesis (Doctorate) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

ABSTRACT

Introduction: Vitiligo is the most frequent pigmentation disorder in the world, affecting approximately 0.05 to 2.28% of the world population. It is a chronic disease characterized by the destruction of skin melanocytes, which causes hypo-pigmented macules. The diversity in the sequences of genes involved in melanin biosynthesis may influence the incidence of this condition. In addition, this genetic diversity can influence the proportions of eumelanin and pheomelanin produced, directly influencing the resulting pigmentation phenotype. **Objective:** Analysis of the genetic diversity of the promoter, 5'UTR, 3'UTR and exonic regions of the *ASIP*, *MC1R*, *KITLG* and *BNC2* genes involved in the process of melanin biosynthesis. **Method:** A total of 544 individuals were evaluated, of which 471 as a control group were recruited from the Blood Centers of Ribeirão Preto - SP, and 73 patients with vitiligo were recruited from the Dermatology Outpatient Clinic of the Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Both groups were classified according to eye, hair and skin phenotypes. DNA libraries (HaloPlex, Agilent) including the regulatory and coding sequences of the three genes were prepared and subjected to analysis by next-generation sequencing methodology (MiSeq, Illumina). The associations between phenotype and genotype were tested by logistic regression and gene-gene interaction models. **Results:** 788 points of variation were identified, distributed in: 71 in the *ASIP* gene, 133 in the *MC1R*, 431 in the *BNC2* and 154 in the *KITLG*. Of all significant associations to all phenotypes studied (221), 121 were identified without considering the confounding effect of ancestry, and 100 are significant even considering ancestry as a covariate. In addition to point variants, the definition of haplotypes allowed the identification of 50 associations, 27 in the *ASIP* gene, 7 in the *MC1R* and 16 in the *BNC2*. Regarding specifically the vitiligo phenotype, only the *BNC2* and *KITLG* genes showed significant associations, with 9 and 5, respectively. Results show evidence that the G allele of the rs1425090456 variant (associated with vitiligo with $p = 4.12 \cdot 10^{-06}$, OR = 124) of the *BNC2* gene, which overlaps the binding site of several transcription factors, can affect the correct expression of this gene, and lead to the vitiligo phenotype. For the *KITLG* gene, the A allele of the rs188394671 variant was associated with vitiligo ($p = 2.04 \cdot 10^{-05}$ and OR = 30.77), and it also overlaps a complex regulatory mechanism, with the interaction of several transcription factors. This change may reflect a change in *KITLG*

expression, and thus lead to the vitiligo phenotype. **Conclusion:** the results of this study contribute to the knowledge about the development of vitiligo and about melanogenesis by deeply characterizing the coding and regulatory regions of four genes that are directly involved in the human pigmentation metabolic pathway. This is the first study to identify variants in the *BNC2* gene associated with the development of vitiligo, as well as one of the first studies to assess the contribution of ancestry to disease predisposition in an admixed population for these genes.

Keywords: Vitiligo. *Basonuclin 2*. *Agouti signaling protein*. *Melanocortin 1 receptor*. *KIT ligand*. Genomic ancestry. Gene-gene interaction.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Ilustração da organização dos melanócitos e queratinócitos na epiderme. Os melanócitos produzem melanina em organelas chamadas melanossomos, os quais são distribuídos aos queratinócitos adjacentes.....19**
- Figura 2 – Melanina é sintetizada nos melanócitos como resposta à radiação UV. A incidência de radiação (UVR), libera o hormônio α -MSH, que interage e ativa a proteína transmembrana MC1R. O antagonista do α -MSH é a proteína ASIP. Paralelo à esta interação, ocorre a ligação da proteína KITLG com a proteína transmembrana KIT. Dessa forma, mediada pelas proteínas BNC2 e HERC2, ocorre a sinalização de aumento da transcrição das proteínas que atuam na produção de melanina no melanossomo (TYRP1/2, OCA2, SLC24A4, SLC45A2, TPCN2, SLC24A5), o que leva a um aumento de eumelanina. Adaptado de HUANG et al., 2021.....22**
- Figura 3 – Captura de tela do UCSC Genome Browser com base no genoma de referência hg19. Em destaque, o gene *BNC2* curado pelo NCBI (azul escuro), e os diversos transcritos já identificados na literatura (azul mais claro, UCSC Genes). O transcrito utilizado como referência neste estudo está indicado por uma seta. As regiões cobertas pelas sondas desenhadas para capturar os exons e a região promotora (~3kb) dos diferentes transcritos deste gene estão assinalados em verde.....31**
- Figura 4 - Captura de tela do UCSC Genome Browser com base no genoma de referência hg19. Em destaque, os genes *KITLG* (a), *MC1R* (b) e *ASIP* (c), curados pelo NCBI (azul escuro), e os diversos transcritos já identificados na literatura, quando presentes (azul mais claro, UCSC Genes). O transcrito utilizado como referência para cada gene neste estudo está indicado por uma seta. As regiões cobertas pelas sondas desenhadas para capturar os exons e a região promotora (~3kb) dos diferentes transcritos e a região promotora de cada gene está assinalada em verde.....32**
- Figura 5 – Análise de desequilíbrio de ligação do gene *ASIP*. O gradiente representa D' de desequilíbrio de ligação, sendo que quadrados brancos representam $D' = 0$ (equilíbrio), e quadrados vermelhos representam $D' = 1$ (desequilíbrio)40**
- Figura 6 - Associações fortes e significativas ($p < 0,05$ e $OR > 10$) envolvendo sítios de variação presentes no gene *ASIP* sem (UNADJ) e com (ADJ) correção para ancestralidade. Os quadrados azuis representam os valores de OR na base logarítmica ($\log_{10} OR$), as barras horizontais representam os intervalos de confiança de 95%, e a última coluna relaciona o valor da probabilidade do teste exato de Fisher bicaudal. A linha vertical pontilhada em azul se localiza em $OR = 1$, e a linha sólida preta se localiza em $OR = 0$. As associações se encontram ordenadas em ordem decrescente de valores de OR.....42**
- Figura 7 – Ilustração do impacto dos alelos A e G do SNP rs6058017 do gene *ASIP* na interação com o microRNA hsa-miR-3173-5p.....46**
- Figura 8 – Captura de tela das variantes do gene *ASIP* na ferramenta Regulome DB. No eixo x se encontram as coordenadas genômicas das variantes deste gene, e no eixo y o valor de $-\log e$, que reflete a probabilidade de afetar diversos fatores regulatórios.46**
- Figura 9 – Análise de desequilíbrio de ligação do gene *MC1R*. O gradiente representa D' de desequilíbrio de ligação, sendo que quadrados brancos representam $D' = 0$ (equilíbrio), e quadrados vermelhos representam $D' = 1$ (desequilíbrio)47**
- Figura 10 – Associações significativas ($p < 0,05$ e $OR > 10$) envolvendo sítios de variação presentes no gene *MC1R* sem (UNADJ) e com (ADJ) correção para ancestralidade. Os quadrados representam os valores de OR na base logarítmica ($\log_{10} OR$), as barras horizontais**

representam os intervalos de confiança de 95%, a quarta coluna relaciona o valor da probabilidade do teste exato de Fisher bilateral. A linha vertical pontilhada em azul se localiza em 1, e a linha sólida preta se localiza em 0. As associações se encontram ordenadas em ordem decrescente de valores de OR.....	49
Figura 11 - Captura de tela das variantes do gene MC1R na ferramenta Regulome DB. No eixo x se encontram as coordenadas genômicas das variantes deste gene, e no eixo y o valor de $-\log e$, que reflete a probabilidade de afetar diversos fatores regulatórios.....	51
Figura 12 – Ilustração do impacto dos alelos C e A do SNP rs321270 do gene <i>MC1R</i> na interação com os microRNAs hsa-miR-3154 e hsa-miR-4669.....	52
Figura 13 - Análise de desequilíbrio de ligação do gene BNC2. O gradiente representa D' de desequilíbrio de ligação, sendo que quadrados brancos representam $D' = 0$ (equilíbrio), e quadrados vermelhos representam $D' = 1$ (desequilíbrio).	53
Figura 14 - Associações significativas ($p < 0,05$ e $OR > 10$) envolvendo sítios de variação presentes no gene <i>BNC2</i> sem (UNADJ) correção para ancestralidade. Os quadrados representam os valores de OR na base logarítmica ($\log_{10} OR$), as barras horizontais representam os intervalos de confiança de 95%, a quarta coluna relaciona o valor da probabilidade do teste exato de Fisher bilateral. A linha vertical pontilhada em azul se localiza em 1, e a linha sólida preta se localiza em 0. As associações se encontram ordenadas em ordem decrescente de valores de OR.....	55
Figura 15 - Associações significativas ($p < 0,05$ e $OR > 10$) envolvendo sítios de variação presentes no gene <i>BNC2</i> com (ADJ) correção para ancestralidade. Os quadrados representam os valores de OR na base logarítmica ($\log_{10} OR$), as barras horizontais representam os intervalos de confiança de 95%, a quarta coluna relaciona o valor da probabilidade do teste exato de Fisher bilateral. A linha vertical pontilhada em azul se localiza em 1, e a linha sólida preta se localiza em 0. As associações se encontram ordenadas em ordem decrescente de valores de OR.....	56
Figura 16 – Ilustração do impacto dos alelos T e C do SNP rs7021128 do gene <i>BNC2</i> na interação com o microRNA hsa-miR-3127-3p.....	60
Figura 17 - Captura de tela das variantes do gene BNC2 na ferramenta Regulome DB. No eixo x se encontram as coordenadas genômicas das variantes deste gene, e no eixo y o valor de $-\log e$, que reflete a probabilidade de afetar diversos fatores regulatórios.....	60
Figura 18 - Análise de desequilíbrio de ligação do gene KITLG. O gradiente representa D' de desequilíbrio de ligação, sendo que quadrados brancos representam $D' = 0$ (equilíbrio), e quadrados vermelhos representam $D' = 1$ (desequilíbrio).	61
Figura 19 - Associações significativas ($p < 0,05$ e $OR > 10$) envolvendo sítios de variação presentes no gene <i>KITLG</i> sem (UNADJ) e com (ADJ) correção para ancestralidade. Os quadrados representam os valores de OR na base logarítmica ($\log_{10} OR$), as barras horizontais representam os intervalos de confiança de 95%, a quarta coluna relaciona o valor da probabilidade do teste exato de Fisher bilateral. A linha vertical pontilhada em azul se localiza em 1, e a linha sólida preta se localiza em 0. As associações se encontram ordenadas em ordem decrescente de valores de OR.....	63
Figura 20 - Captura de tela das variantes do gene KITLG na ferramenta Regulome DB. No eixo x se encontram as coordenadas genômicas das variantes deste gene, e no eixo y o valor de $-\log e$, que reflete a probabilidade de afetar diversos fatores regulatórios.....	65
Figura 21 – Gráfico circular que evidencia a frequência absoluta de interações significativas ($p < 0,05$) gene-gene no presente estudo. Relações redundantes não foram consideradas.	66
Figura 22 – Captura de tela da ferramenta GTE_x, identificando as diferentes isoformas do gene <i>BNC2</i>, e expressão de cada uma nos diferentes tecidos. Células brancas indicam expressão	

próxima a 0 naquele tecido específico, que vai aumentando gradativamente em função da cor roxa. A isoforma destacada (ENST00000468187.6_1) apresenta uma possível interação quanto a variante rs1229083966.71

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1– Dados de composição dos sexos e das idades de ambos grupos amostrados. ----- 38
- Tabela 2 – Categorização das amostras de ambos grupos (Pacientes, controles aleatórios e controles total) para os fenótipos: Tipo de pele Fitzpatrick, cor dos olhos, cor dos cabelos. Os números entre parênteses indicam a frequência relativa expressa em porcentagem.----- 39
- Tabela 3 – Distribuição dos sítios de variação no gene ASIP de acordo com a região de ocorrência e número de associações observadas estratificadas de acordo com as regiões em que os sítios se localizam. Os valores à esquerda da barra representam o número de associações identificadas sem aplicação da ancestralidade como covariável, enquanto que à direita é o número de associações com a ancestralidade como covariável. ----- 41
- Tabela 4 – Caracterização dos haplótipos da região promotora do gene ASIP, e associações identificadas. Os valores estatísticos são o valor de p de Fisher (P-Fisher), e *odds ratio* (OR) acompanhado do intervalo de confiança de 95% em parênteses (IC95%). São listados os valores de número de amostras com haplótipo definido (nSamp), número de haplótipos diferentes naquela região (NH), diversidade haplotípica observada (DH₀), diversidade haplotípica esperada (DH_E), e probabilidade de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (pHWE). ----- 44
- Tabela 5 - Caracterização da região de incidência de sítios de variação no gene MC1R. Associações e região em que os sítios se localizam. Os valores à esquerda da barra representam o número de associações identificadas sem aplicação da ancestralidade como covariável, enquanto que à direita é o número de associações com a ancestralidade como covariável. ----- 48
- Tabela 6 - Caracterização dos haplótipos da região completa do gene MC1R, e associações identificadas. Os valores estatísticos são o valor de p de Fisher (P-Fisher), e *odds ratio* (OR) acompanhado do intervalo de confiança de 95% em parênteses (IC95%). São listados os valores de número de amostras com haplótipo definido (nSamp), número de haplótipos diferentes naquela região (NH), diversidade haplotípica observada (DH₀), diversidade haplotípica esperada (DH_E), e probabilidade de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (pHWE). ----- 50
- Tabela 7 - Caracterização da região de incidência de sítios de variação no gene BNC2. Associações e região em que os sítios se localizam. Os valores à esquerda da barra representam o número de associações identificadas sem aplicação da ancestralidade como covariável, enquanto que à direita é o número de associações com a ancestralidade como covariável. ----- 54
- Tabela 8 - Caracterização dos haplótipos da região promotora do gene BNC2, e associações identificadas. Os valores estatísticos são o valor de p de Fisher (P-Fisher), e *odds ratio* (OR) acompanhado do intervalo de confiança de 95% em parênteses (IC95%). ----- 57
- Tabela 9 - Caracterização dos haplótipos das regiões: exon 2, íntron 3 e 6 do gene BNC2, e associações identificadas. Os valores estatísticos são o valor de p de Fisher (P-Fisher), e *odds ratio* (OR) acompanhado do intervalo de confiança de 95% em parênteses (IC95%). ----- 58
- Tabela 10 - Caracterização dos haplótipos da região 3'UTR do gene BNC2, e associações identificadas. Os valores estatísticos são o valor de p de Fisher (P-Fisher), e *odds ratio* (OR) acompanhado do intervalo de confiança de 95% em parênteses (IC95%). ----- 59
- Tabela 11 - Caracterização da região de incidência de sítios de variação no gene KITLG. Associações e região em que os sítios se localizam. Os valores à esquerda da barra representam o número de associações identificadas sem aplicação da ancestralidade como covariável, enquanto que à direita é o número de associações com a ancestralidade como covariável. ----- 62

Tabela 12 – Relação dos SNPs do gene KITLG e interações com microRNAs identificados. A coluna SNP ID relaciona o SNP estudado, a coluna REF/ALT identifica os alelos referência e alternativo de acordo com o genoma de referência hg19, miRNA se refere aos microRNAs identificados, a coluna efeito relaciona a alteração que a substituição do alelo referência pelo alternativo causa para aquele microRNA. A coluna ΔG_{ref} e ΔG_{alt} relacionam a energia livre da ligação do alelo referência e alternativo, respectivamente, com o microRNA. A coluna $\Delta\Delta G$ relaciona a alteração de energia observada pelos diferentes alelos. ----- 64

Tabela 13 – Relação dos 20 sítios de variação com maior número de modelos de interação de segunda ordem significativos de regressão logística para vitiligo. Estão listados os resultados sem a correção por ancestralidade (UNADJ) e com correção para ancestralidade (ADJ). Os sítios de variação estão divididos de acordo com a classificação dos modelos em alto risco (H) e baixo risco (L).----- 67

Tabela 14 - Vinte modelos de interação de segunda ordem mais significativos (com menores valores de probabilidade) para regressão logística de vitiligo. Os modelos se classificam em categorias (CAT.) de alto risco (H) e baixo risco (L). ----- 68

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Vitiligo	19
1.2. Pigmentação humana	20
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1. Coleta de amostras e extração de DNA	29
4.2. Design dos <i>amplicons</i>	30
4.3. Preparo da biblioteca de DNA, validação e sequenciamento	33
4.4. Procedimento computacional e alinhamento	33
4.5. Algoritmo <i>haplotypcaller</i> e filtro de variantes	33
4.6. Determinação de fase física computacional	34
4.7. Análises estatísticas	34
4.8. Análises de microRNAs	35
4.9. Análises de interações gene-gene	35
5. RESULTADOS	38
5.1. Caracterização da amostra	38
5.2. Caracterização dos genes	40
5.2.1. Gene <i>ASIP</i>	40
5.2.2. Gene <i>MCIR</i>	47
5.2.3. Gene <i>BNC2</i>	53
5.2.4. Gene <i>KITLG</i>	61
5.3. Interação gene-gene	65
6. DISCUSSÃO	70
6.1. Associações identificadas	70
6.1.1. Gene <i>BNC2</i>	70
6.1.2. Gene <i>KITLG</i>	73
6.1.3. Gene <i>ASIP</i>	75
6.1.4. Gene <i>MCIR</i>	76
7. CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
APÊNDICE A	90
ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	107
ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA ARMAZENAMENTO DE MATERIAL BIOLÓGICO	109
ANEXO C - PROTOCOLO DE ANÁLISE LABORATORIAL (HALOPLEX) PARA SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO	108
ANEXO D - PROTOCOLO DE PROCESSAMENTO COMPUTACIONAL DE DADOS DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO	132
ANEXO E - PROTOCOLO PARA IDENTIFICAÇÃO COMPUTACIONAL DE INTERAÇÕES ENTRE MIRNAS E REGIÃO 3'UTR	167

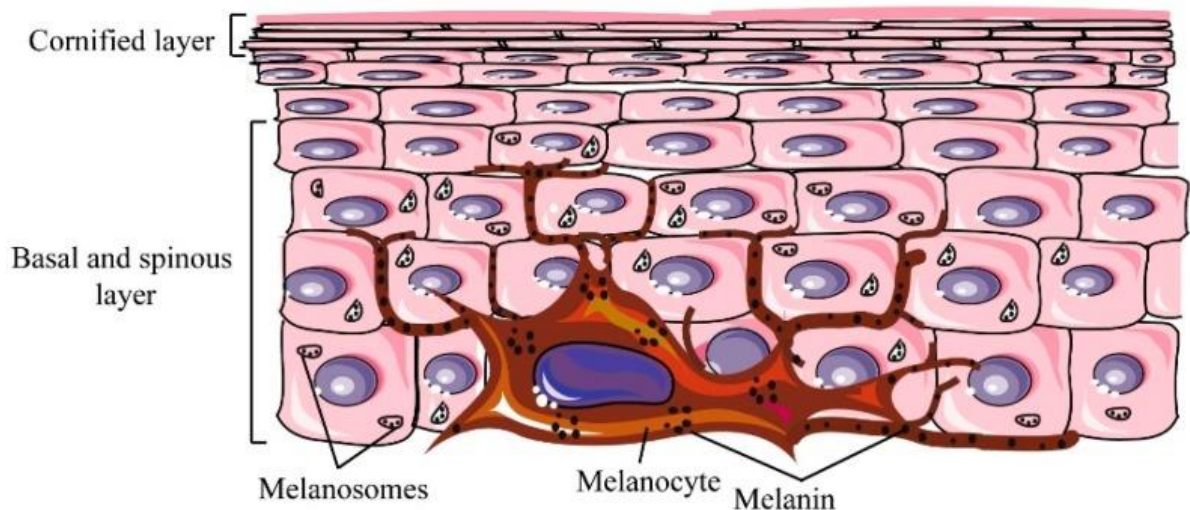
INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Vitiligo

O vitiligo é o distúrbio de pigmentação mais frequente do mundo, e afeta aproximadamente 0,05 a 2,28% da população mundial. É uma doença crônica caracterizada pela destruição dos melanócitos da pele, que causa máculas hipopigmentadas (EZZEDINE et al., 2012). Os melanócitos se encontram na camada basal da epiderme, envoltos por diversos queratinócitos, que dão origem a unidade básica epidérmica (Figura 1), e sua função principal é produzir e distribuir melanina por meio da via metabólica chamada melanogênese (EZZEDINE et al., 2012).

Figura 1 - Ilustração da organização dos melanócitos e queratinócitos na epiderme. Os melanócitos produzem melanina em organelas chamadas melanossomos, os quais são distribuídos aos queratinócitos adjacentes.



Fonte: Reprodução de D'MELLO et al., 2016.

A etiologia do vitiligo ainda não foi completamente elucidada, porém, a teoria prevalente é a autoimune, que se sustenta com diversas evidências, como: associação de vitiligo com outras doenças autoimunes; altos níveis de anticorpos contra melanócitos identificado em 10% dos pacientes com vitiligo; loci de suscetibilidade que codificam proteínas imunomoduladoras identificados por GWAS e o infiltrado inflamatório observado nas margens das lesões (BONIFACE et al., 2018; IANNELLA et al., 2016). Estudos da ativação imune permitiram identificar envolvimento de células T no desenvolvimento de vitiligo (WAŃKOWICZ-KALIŃSKA et al., 2003). Nas regiões perilesionais com progressão ativa, foi identificado uma menor proporção CD4/CD8 em pacientes com vitiligo quando comparado com pele saudável (WAŃKOWICZ-KALIŃSKA et al., 2003). Apesar do mecanismo não ser esclarecido, é

possível que melanócitos MHC classe II+ em pele perilesional, apresentem esses antígenos para as células T, ativando assim a autorresposta imune. Além disso, em tecido perilesional isolado, células T CD8 reconheceram antígenos melanossomais, e agiram de maneira citotóxica.

No entanto, outras teorias são estudadas, como é o caso da teoria bioquímica, na qual o dano aos melanócitos ocorre devido a um desequilíbrio no stress oxidativo, que foi evidenciada por um estudo que identificou maiores níveis de peróxido de hidrogênio e superóxido-dismutase em pacientes com vitiligo (IANNELLA et al., 2016). Outra teoria é a da melanocitorragia, a qual indica que falhas no sistema de adesão celular leva a um destacamento, o que causa perda de melanócitos transepidermais por exposição a autoantígenos, mecanismo que ativa o sistema imune, causando danos aos melanócitos (GAUTHIER; ANDRE; TAÏEB, 2003). Além destas, a teoria da convergência aponta para uma série de alterações complexas para a incidência do vitiligo, entre elas: suscetibilidade a alterações ambientais, alterações no microambiente epidérmico, defeitos intrínsecos do melanócito, respostas autoimunes e stress (KUNDU et al., 2019; MORETTI, 2002).

O termo “stress” pode funcionar como gatilho para o vitiligo de várias maneiras. Um estudo indicou que metade dos pacientes de uma amostra na Índia desenvolveram esta condição após sofrerem stress mecânico (KHURRUM et al., 2017), que desencadeou um evento de melanocitorragia, com redução de expressão de E-caderinas (molécula responsável pela adesão celular). Além disso, casos de stress psicológico servindo de gatilho para o vitiligo também já foram relatados na literatura (MANOLACHE; BENEÀ, 2007). Nestes casos, a hipótese levantada é que com o estado psicológico abalado (o qual é evidenciado pelo frequente quadro de alexitimia nos pacientes com vitiligo), respostas imunes citotóxicas são ativadas, o que resulta em progressiva despigmentação. Outro fator estudado envolve a alimentação, pois esta pode causar um desequilíbrio micro biótico que pode ser responsável pela incidência da doença (THAPPA; KAIMAL, 2010)

O desenvolvimento deste fenótipo envolve enzimas (como catalases, NRF2, SOD, COMT) responsáveis pela remoção de intermediários tóxicos gerados durante a atividade do melanócito. Dessa forma, a redução da concentração ou da atividade dessas enzimas, pode se refletir em uma menor capacidade do indivíduo em se proteger do stress oxidativo natural deste processo (TOOSI; ORLOW; MANGA, 2012)

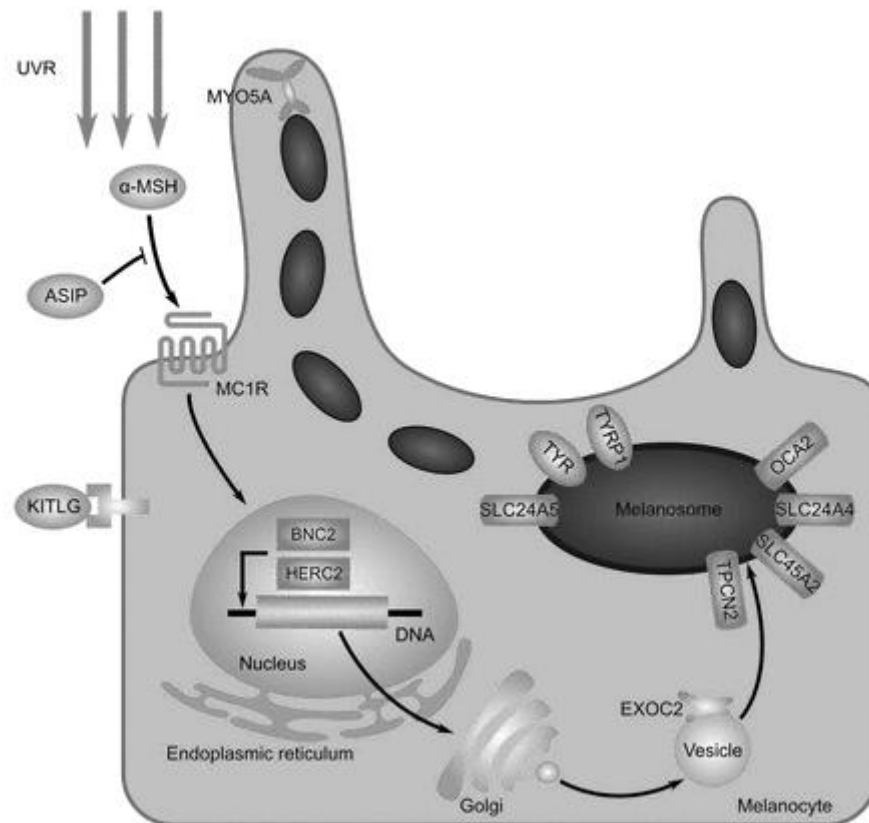
1.2. Pigmentação humana

A pigmentação humana sofre a influência de mais de uma centena de genes. Entre eles estão o *Agouti Signaling Protein (ASIP)*, o *Melanocortin Receptor 1 (MC1R)*, o *c-KIT ligand (KITLG)*,

e o *Basonuclin 2 (BNC2)*, ilustrados na Figura 2. Esta plethora de genes permite a grande diversidade fenotípica observada ao redor do mundo, que é explicada por adaptações à radiação ultravioleta (RUV) e produção de vitamina D (PARRA, 2007). Enquanto fenótipos mais escuros proporcionam maior proteção contra a radiação, principalmente em regiões de baixas latitudes e alta RUV, fenótipos mais claros implicam em produção de vitamina D de uma maneira mais eficiente em regiões com baixa incidência de RUV e latitudes maiores (HUANG et al., 2021).

Radiação UV induz clivagem do hormônio pro-opiomelanocortina (POMC, do inglês *pro-opiomelanocortin*), precursor do hormônio alfa-melanócito estimulante (α -MSH, do inglês, *melanocyte-stimulating hormone*) para ativar a via de pigmentação. A ligação do MSH ao MC1R, que é expresso na superfície de melanócitos epidérmicos, inicia a ativação da adenilato ciclase. O conseqüente aumento do nível de AMP cíclico (cAMP) estimula a proteína quinase A (PKA, do inglês, *protein kinase A*). PKA fosforila os fatores de transcrição da família de proteínas de ligação a elementos em resposta a cAMP (CREB, do inglês, *cAMP response element-binding protein*), os quais regulam positivamente a expressão do fator de transcrição associado a microftalmia (MITF, do inglês, *microphthalmia-associated transcription factor*). Paralelo a este processo, o ligante KITLG ao interagir com a proteína KIT, ativa a via de sinalização MAPK, a qual também resulta no aumento da expressão do fator de transcrição MITF. MITF, por sua vez, ativa a transcrição de proteínas específicas como tirosinase (TYR), proteína relacionada com a tirosinase 1 (TYRP1) e a dopacroma tautomerase (DCT). A enzima limitante na melanogênese é a TYR, que é crucial para a síntese de eumelanina (pigmento mais escuro) assim como de feomelanina (pigmento mais claro). Enquanto a atividade basal da TYR leva à produção de feomelanina, indução da expressão de TYR implica em eumelanogênese (BARSH, 2003; GARCIA-BORRON; SANCHEZ-LAORDEN; JIMENEZ-CERVANTES, 2005).

Figura 2 – Melanina é sintetizada nos melanócitos como resposta à radiação UV. A incidência de radiação (UVR), libera o hormônio α -MSH, que interage e ativa a proteína transmembrana MC1R. O antagonista do α -MSH é a proteína ASIP. Paralelo à esta interação, ocorre a ligação da proteína KITLG com a proteína transmembrana KIT. Dessa forma, mediada pelas proteínas BNC2 e HERC2, ocorre a sinalização de aumento da transcrição das proteínas que atuam na produção de melanina no melanosomo (TYRP1/2, OCA2, SLC24A4, SLC45A2, TPCN2, SLC24A5), o que leva a um aumento de eumelanina. Adaptado de HUANG et al., 2021.



O gene *MC1R* codifica um receptor acoplado à proteína G que se localiza na membrana celular do melanócito. A proteína MC1R possui papel semelhante à de um interruptor para a melanogênese: a ligação do hormônio α -melanócito estimulante (α -MSH) estimula a via melanogênica, que leva à produção de eumelanina, pigmento que possui um espectro que varia do marrom ao preto. Por outro lado, a ligação do antagonista ASIP favorece a produção de feomelanina, pigmento que varia do vermelho ao amarelo (BRANICKI et al., 2011). Ambos genes possuem fortes associações a fenótipos de pigmentação, sendo que as mais fortes delas envolvem alelos alternativos dos SNPs rs1805006, rs1805007, rs1805008 e rs1805009, todos do gene *MC1R*, associados ao fenótipo de pele clara e cabelos ruivos. Este conjunto de modificações alteram os aminoácidos Arg142His, Arg151Cys, Arg160Trp e Asp294His, respectivamente, o que resulta em uma proteína deficiente ou inativa (BOX et al., 1997). Para o *ASIP*, o polimorfismo rs6058017 apresentou alelo associado a fenótipos mais escuros. Este

polimorfismo se localiza em região 3'UTR, e sofre regulação por microRNAs, o que altera sua expressão e influencia no fenótipo resultante (VOISEY; KELLY; VAN DAAL, 2003).

Por sua vez, o ligante de c-Kit (KITLG) interage com a proteína KIT intermembrana, de maneira paralela à ligação do ASIP-MC1R, e desencadeia a via de sinalização MPAK. Esta ligação influencia a proliferação de melanócitos e na distribuição dos melanosomos (CHEN et al., 2015). Ela promove a fosforilação de PIK3R1, a subunidade reguladora da fosfatidilinositol 3-quinase, e subsequente ativação da AKT1 quinase. KITLG e KIT também transmitem sinais via GRB2 e participam da ativação de RAS, RAF1 e das MAP quinases MAPK1/ERK2, MAPK3/ERK1. KITLG e KIT promovem a ativação dos membros da família STAT STAT1, STAT3 e STAT5. KITLG e KIT promovem a ativação de PLCG1, levando à produção das moléculas de sinalização celular diacilglicerol e inositol 1,4,5-trisfosfato. KITLG atua sinergicamente com outras citocinas, provavelmente interleucinas (HATTORI et al., 2018). Algumas variantes deste gene já foram associadas a distúrbios familiares hipo- e hiperpigmentares (AMYERE et al., 2011). Adicionalmente, a variante rs12821256 foi identificada em estudo GWAS em associação a cabelos claros (SULEM et al., 2007).

Já a Basonuclina 2 (BNC2) está envolvida no processamento de mRNA, como por exemplo, splicing alternativo, além de participar da regulação da expressão de outros genes. A super expressão de *bnc2* em camundongos levou a morte dos melanócitos, e subsequente perda de pigmentação, possivelmente pelo seu papel no aumento da expressão das proteínas eumelanogênicas. Por outro lado, o knockout de *bnc2* se mostrou letal na etapa embrionária (VANHOUTTEGHEM et al., 2009). Na literatura, algumas variantes já foram identificadas associada a fenótipos de pigmentação, como é o caso da rs16935073 e sardas em amostra de mulheres coreanas ($p\text{-value} = 2.11 \times 10^{-46}$) (SHIN et al., 2021), rs2153271 e sardas em europeus (BayesFactor = 7,28) (ERIKSSON et al., 2010) e rs12350739 com pele mais clara (VISSER; PALSTRA; KAYSER, 2014).

Estes genes já foram amplamente associados à pigmentação, e possuem variantes causais bem caracterizadas. No entanto, pouco se sabe sobre o impacto destes genes de pigmentação sobre o vitiligo. Nenhuma associação foi encontrada entre variantes do gene *ASIP* e este fenótipo (KINGO et al., 2007). Para o gene *KITLG*, os polimorfismos rs995029 e rs11104947 já foram associados fortemente a vitiligo em estudo com amostra taiwanesa (LAN et al., 2009). Para o *MC1R*, ainda é incerto se ele possui papel na patogênese, ou se este fenótipo altera a expressão deste gene (NAGUI et al., 2017). Destaca-se que, o estudo entre a associação de *BCN2* e vitiligo é inédito.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A identificação de polimorfismos genéticos associados à pigmentação humana e a compreensão dos mecanismos moleculares responsáveis pela causalidade de distúrbios pigmentares é de grande relevância para pelo menos duas áreas de conhecimento. Uma delas é a área clínica. Visto que vitiligo ainda não possui cura, a caracterização das regiões regulatórias de genes envolvidos na biossíntese de melanina permitirá a busca por fatores de transcrição e microRNAs com afinidade por essas regiões. Estas descobertas podem possibilitar novos tratamentos para estes distúrbios, como a utilização de microRNAs. Outra área do conhecimento que se beneficia com as informações geradas por este estudo é a área das ciências forenses, visto que o pleno entendimento da via de pigmentação permite a criação de modelos de predição de fenótipos a partir de genótipos. Desta forma, materiais biológicos encontrados em cenas de crime podem ser suficientes para gerar um perfil preliminar de um possível suspeito.

A metodologia de sequenciamento de nova geração (NGS) aplicada permite análise profunda dos genes selecionados sob uma perspectiva pouco ou ainda não explorada. O conhecimento gerado neste projeto contribui para detecção de novas variantes correlacionadas ao vitiligo, descrição da diversidade genética destes genes em população altamente miscigenada e no entendimento do processo de biossíntese de melanina humana.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho consiste na análise da diversidade genética das regiões promotora, 5' UTR, 3' UTR e exônicas dos genes *ASIP*, *MC1R*, *KITLG* e *BNC2* envolvidos no processo de biossíntese de melanina, por meio de sequenciamento de nova geração, em amostras de 73 pacientes e 471 controles pertencentes à população do Estado de São Paulo. Isto permitirá:

- Determinar, por meio de sequenciamento de nova geração, as frequências de alelos, genótipos e haplótipos compostos pelos SNPs de cada região gênica analisada;
- Caracterizar as regiões exônicas e regulatórias (3'UTR e promotora) de cada um destes genes;
- Avaliar a intensidade do desequilíbrio de ligação (LD) entre as regiões regulatórias e as regiões exônicas analisadas em cada gene;
- Identificar novos polimorfismos funcionais em cada um destes três genes;
- Identificar computacionalmente fatores de transcrição que apresentem afinidade por elementos específicos dos haplótipos promotores encontrados e avaliar o impacto de SNPs nesta relação de afinidade;
- Identificar computacionalmente microRNAs que apresentem afinidade por sequências específicas dos haplótipos de 3'UTR encontrados e avaliar o impacto de SNPs nesta relação de afinidade;
- Identificar um conjunto de polimorfismos funcionais de cada gene que contribua com a causalidade do vitiligo, assim como para a determinação da pigmentação da pele, cabelos e olhos em indivíduos da população brasileira.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta de amostras e extração de DNA

O presente projeto de pesquisa está vinculado ao projeto “Sequenciamento de nova geração de genes envolvidos na biossíntese de melanina em amostra da população brasileira” aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa segundo processo CEP-FFCLRP CAAE n.º 25696413.7.0000.5407. Todos os 544 participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, permitindo o uso de seu material biológico (amostra de sangue) para estudo (Anexos A e B). O recrutamento do grupo controle ($n = 471$) ocorreu junto aos Hemocentros de Ribeirão Preto - SP, nas unidades Hemocentro Campus (USP) e no Posto de Coleta de Sangue (Centro), enquanto os pacientes ($n = 73$) foram recrutados junto ao Ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Critérios de inclusão para os controles: idade superior a 18 anos, de ambos os sexos. Critério de exclusão para os controles: presença de vitiligo. Para os casos, os critérios de inclusão são os mesmos, adicionando-se a confirmação de vitiligo por um médico dermatologista.

Imagens fotográficas de regiões corporais pequenas e bem delimitadas foram obtidas das seguintes áreas: frontal do crânio (área muito exposta ao sol), interna do braço (área pouco exposta ao sol), cabelos, olho esquerdo e olho direito, e para os pacientes, da região afetada por vitiligo, quando possível. Adicionalmente, a intensidade da pigmentação da pele foi quantificada de forma objetiva por meio do índice de melanina obtido a partir de espectrofotômetro CM2500D e do software *SkinAnalysis* (Konica Minolta Holdings, Inc).

Além das imagens fotográficas e do índice de melanina, todos os participantes responderam a um questionário, o qual visava obter informações sobre ancestralidade, e a autoclassificação das suas características de pigmentação. As seguintes características físicas de cada participante foram ainda categorizadas por dois pesquisadores: cor dos olhos (azul, mel, verde, castanho claro e castanho escuro), cor dos cabelos (ruivos, loiro claros, loiro-escuros, castanho claros, castanho-escuros), presença/ausência de sardas, e classificação da pele segundo Fitzpatrick (FITZPATRICK, 1988).

Cada participante doou cerca de 10 mL de sangue periférico, mantido em tubo *Vacutainer*® com anticoagulante EDTA. O material biológico foi armazenado a -20°C até a etapa de extração do DNA. O DNA das amostras de sangue foi então extraído através do protocolo de *salting-out* com modificações (MILLER; DYKES; POLESKY, 1988) e o DNA genômico foi armazenado a -20°C . Após extração do DNA, este foi quantificado tanto por

fluorescência (Qubit™ dsDNA BR Assay (Life Technologies)) quanto por medidas espectrofotométricas *NanoDrop*® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.), além de sua degradação ser analisada por gel de agarose.

4.2. Design dos *amplicons*

O presente estudo faz parte de um estudo maior. Desta forma, as regiões regulatórias e codificantes dos quatro genes aqui descritos (*ASIP*, *MC1R*, *KITLG* e *BNC2*), assim como dos outros envolvidos na biossíntese de melanina (*OCA2*, *HERC2*, *SLC45A2*, *SLC24A5*, *TYR*, *DCT*, *MITF* e *TYRP1*) foram amplificados e sequenciados em um único ensaio customizado. Este ensaio foi desenhado através do software *SureDesign* da *Agilent Technologies* (<https://earray.chem.agilent.com/suredesign/home.htm>), e utilizou-se das coordenadas genômicas de cada gene segundo a referência GRCh37/hg19 do genoma humano. Devido ao desenho das sondas, algumas regiões de introns flanqueadoras aos exons alvos foram incluídas, como é possível ver nas Figuras 3 e 4.

Figura 3 – Captura de tela do UCSC Genome Browser com base no genoma de referência hg19. Em destaque, o gene *BNC2* curado pelo NCBI (azul escuro), e os diversos transcritos já identificados na literatura (azul mais claro, UCSC Genes). O transcrito utilizado como referência neste estudo está indicado por uma seta. As regiões cobertas pelas sondas desenhadas para capturar os exons e a região promotora (~3kb) dos diferentes transcritos deste gene estão assinalados em verde.

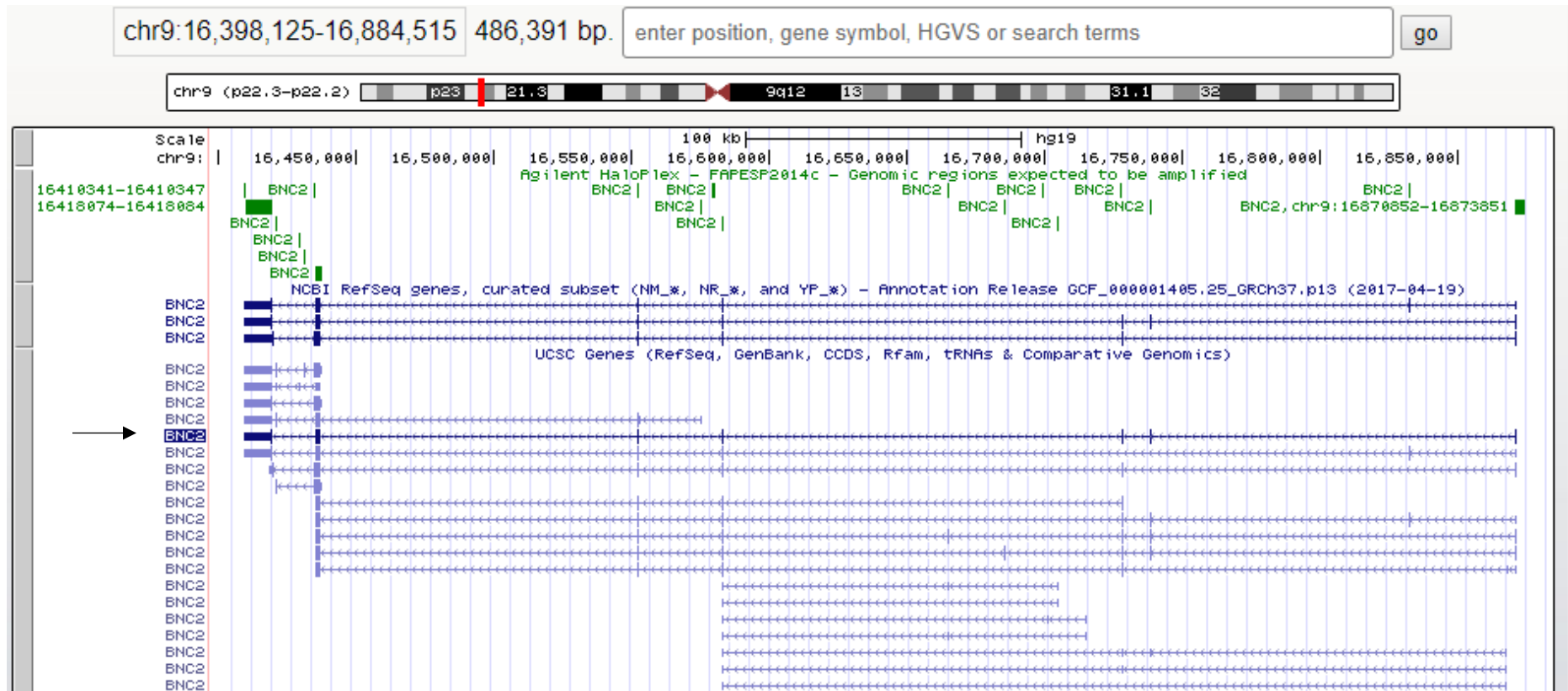
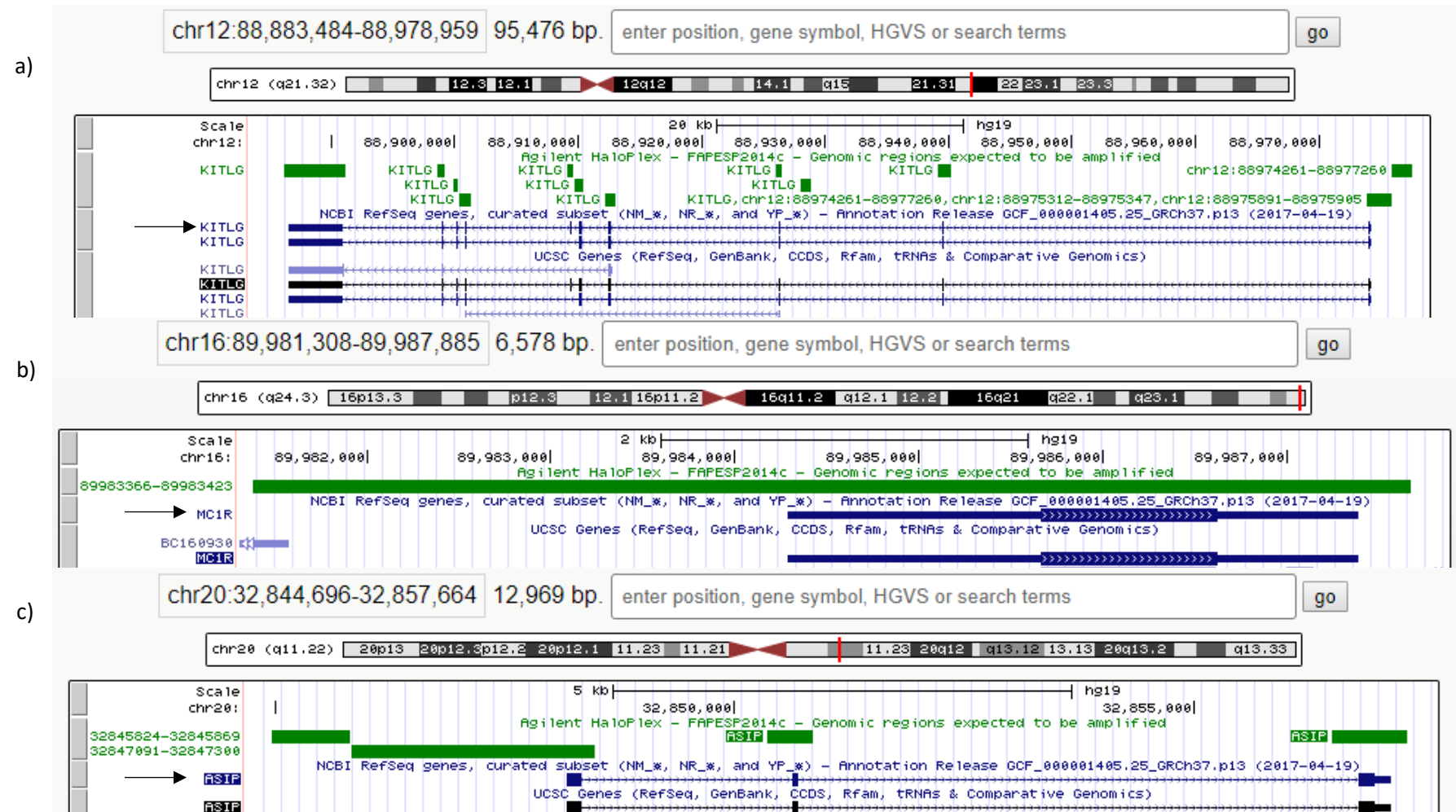


Figura 4 - Captura de tela do UCSC Genome Browser com base no genoma de referência hg19. Em destaque, os genes KITLG (a), MC1R (b) e ASIP (c), curados pelo NCBI (azul escuro), e os diversos transcritos já identificados na literatura, quando presentes (azul mais claro, UCSC Genes). O transcrito utilizado como referência para cada gene neste estudo está indicado por uma seta. As regiões cobertas pelas sondas desenhadas para capturar os exons e a região promotora (~3kb) dos diferentes transcritos e a região promotora de cada gene está assinalada em verde.



4.3. Preparo da biblioteca de DNA, validação e sequenciamento

Após devidamente quantificadas, todas as amostras foram processadas utilizando-se do kit de enriquecimento de alvo customizado Haloplex (Agilent Technologies). O protocolo utilizado foi o sugerido pelo fabricante e está descrito detalhadamente no Anexo C. Finalizada a preparação das amostras, todas as bibliotecas foram submetidas a eletroforese capilar via *2100 Bioanalyzer* em chip de alta sensibilidade para validação. Para o ensaio desenhado neste estudo, a própria fabricante (*Agilent*) cedeu um perfil do espectro esperado.

O equipamento utilizado foi o *Illumina MiSeq Personal Sequencer*. O kit de reagentes utilizado foi *MiSeq Reagent Kit V3 (600 cycle)*, que permite 301 ciclos de leituras no modo *paired-end* (em que cada fragmento é lido tanto na fita *forward* quanto na *reverse*), totalizando 2x301 ciclos de leitura de fragmentos e 8 ciclos de leitura de índices de identificação. Maiores detalhes estão disponíveis no Anexo C.

4.4. Procedimento computacional e alinhamento

Os dados brutos obtidos a partir do sequenciamento foram avaliados em função da qualidade das *reads* sequenciadas por meio do *software* FastQC (ANDREWS, 2010). A análise do relatório gerado pelo FastQC mostrou a necessidade da remoção de fragmentos repetitivos e de fragmentos das extremidades das *reads* que não pertençam ao ensaio. Esta remoção é denominada trimagem, e utilizou-se da ferramenta cutadapt (MARTIN, 2011) para esta finalidade.

Após todas as *reads* de todas as amostras serem trimadas, o próximo passo foi alinhá-las a um genoma de referência. Para fazer o alinhamento foi utilizado o *Burrows-Wheeler Aligner - BWA* (LI; DURBIN, 2009), com o algoritmo BWA-MEM em função da sua especificidade para sequências com tamanho entre 70 e 1Mb e por ser mais rápido e acurado que os outros deste programa.

Neste ponto, cada amostra apresentou um arquivo output do alinhamento que se encontra no formato SAM (Sequencing Alignment/Map) (LI et al., 2009). Estes procedimentos estão descritos detalhadamente no Anexo D.

4.5. Algoritmo *haplotypcaller* e filtro de variantes

Esta etapa envolve os algoritmos do conjunto de ferramentas denominado *Genome Analysis Toolkit* (GATK) v.3.5, o qual apresenta uma estrutura modular capaz de diversas análises de dados, e é disponibilizado pelo *Broad Institute* (MCKENNA et al., 2010). O algoritmo utilizado neste estudo é denominado *HaplotypeCaller* no modo *g.vcf*.

O formato de *output* padrão consiste em arquivo VCF (do inglês, *variant call format*). Alguns dos genótipos considerados pelo *HaplotypeCaller* podem não ser verdadeiros, principalmente quando a genotipagem se refere a um segmento com baixa cobertura de sequenciamento ou quando, no caso de genótipos heterozigotos, um dos alelos é pouco representado. Visando diminuir a taxa de falso-positivos, a ferramenta VCFx (v.0.10.1) (CASTELLI et al., 2015) foi empregada no VCF gerado pelo *HaplotypeCaller*. Estes procedimentos estão descritos detalhadamente no Anexo D.

4.6. Determinação de fase física computacional

A metodologia para a construção dos haplótipos via cálculos computacionais se utilizou do software PHASE (STEPHENS; SMITH; DONNELLY, 2001), o qual realiza cálculos de estatística Bayesiana para determinação da probabilidade dos haplótipos possíveis. Os parâmetros utilizados neste estudo para número de interações, intervalo de *thinning* e *burn-in* foram 100, 1 e 10, respectivamente. Haplótipos com probabilidades abaixo de 80% de definição foram descartados. Este procedimento está descrito detalhadamente no Anexo D.

4.7. Análises estatísticas

As seguintes análises estatísticas foram executadas: equilíbrio de Hardy-Weinberg, estimativa de frequências alélicas e haplotípicas, definição de blocos de desequilíbrio de ligação, associações genótipos-fenótipos e associações haplótipos-fenótipos. Os cálculos de equilíbrio de Hardy-Weinberg foram realizados para cada região dos genes estudados. Além disso, estes cálculos também foram realizados para cada marcador de todos os genes com o software Arlequin (EXCOFFIER; LISCHER, 2010).

Por sua vez, as associações entre os genótipos encontrados com os fenótipos amostrados foram testadas no software PLINK 1.9 (CHANG et al., 2015). As associações foram também testadas adicionando-se como covariável a ancestralidade individual, fornecida em análises pelo software STRUCTURE (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000), a qual é

detalhadamente descrita no Anexo D. Foram adotados como associações significativas aquelas que apresentaram simultaneamente modelos de regressão logística com valores de $p < 0,05$ e $OR > 10$ associado a limite inferior de intervalo de confiança de 95% superior a 1. Além disso, no PLINK 1.9, também foram gerados os gráficos de bloco de desequilíbrio de ligação.

Especificamente para os haplótipos, associações foram testadas por script desenvolvido pelo pesquisador em ambiente estatístico R (R CORE TEAM, 2020), o qual permitiu realizar teste exato de Fisher para investigar associações dos diferentes haplótipos definidos anteriormente com os fenótipos estudados. Novamente, associações significativas foram aquelas que apresentaram simultaneamente $p < 0,05$ e $OR > 10$, com limite inferior de intervalo de confiança de 95% superior a 1.

Para identificação de sítios de regulação e possíveis danos causados pelas mutações foi utilizada a ferramenta *Variant Effect Predictor (VEP)* (MCLAREN et al., 2016) do projeto ENCODE (ENCODE CONSORTIUM, 2012; DAVIS et al., 2018), em conjunto com os bancos de dados Regulome DB (BOYLE et al., 2012) e Haploreg (WARD; KELLIS, 2012). Em cada uma das ferramentas, analisou-se a interação com fatores de transcrição e possível patogenicidade que provenha das alterações. Estes procedimentos estão descritos detalhadamente no Anexo D.

4.8. Análises de microRNAs

O estudo da região 3'UTR como alvo de microRNAs (miRNAs) permite identificar possíveis alterações da regulação do processo de expressão gênica decorrentes de polimorfismos presentes nesta região. Desta forma, para a análise de regulação por miRNAs foram consultados dois bancos de dados principais: *MirSNP* (LIU et al., 2012) e *MicroSNiPer* (BARENBOIM et al., 2010). Ambos se baseiam em dados da literatura sobre sítios de ligação de microRNAs que podem ser alterados devido a incidência de SNPs. Estes procedimentos estão descritos mais detalhadamente no Anexo E.

4.9. Análises de interações gene-gene

A investigação de possíveis efeitos aditivos resultantes das combinações de genótipos foi realizada em ambiente estatístico R, com a implementação do pacote *mbmdr* (CALLE et al., 2010), o qual permite utilizar a metodologia Redução da Dimensionalidade Multifatorial (MDR, do inglês

Multifactor Dimensionality Reduction) como uma metodologia de redução de dimensão para explorar interações gene-gene.

Nesta metodologia, cada combinação de genótipos é reduzida a uma variável, a qual é testada para associação com a resposta e é classificado como risco alto, baixo ou não significativo. Em seguida, todos os genótipos da mesma classe são fundidos e, para cada uma das categorias de risco, um novo teste de associação é realizado. O resultado permite definir uma estatística Wald, conforme descrito em YU; DEMETRIOU; GILLEN, 2015.

No presente estudo, as análises de interações gene-gene envolveram a presença de vitiligo, para variantes com frequências maiores que 5%, que foram realizadas considerando-se como covariável a ancestralidade.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização da amostra

A amostra final permitiu avaliar 544 pessoas, as quais foram divididas em pacientes ($n = 73$) e controles ($n = 471$), caso apresentassem vitiligo ou não, respectivamente. Dessa forma, as características como sexo e idade se encontram listadas na Tabela 1. Para os fenótipos de pigmentação estudados, que foram cor dos olhos, dos cabelos, pele segundo índice Fitzpatrick, e presença de sardas, realizamos uma primeira coleta de 297 amostras de maneira aleatória (Tabela 2). Avaliou-se nessa etapa fenótipos que estavam sendo mais representados, como é o caso dos olhos castanho escuros, pele Fitzpatrick tipo III, e cabelos castanho escuro. Dessa forma, a coleta dos controles restantes foi direcionada a fenótipos que estavam menos representados, como olhos mel, pele dos tipos Fitzpatrick I e VI, cabelos ruivos e loiro-claros. Esta segunda etapa da amostragem permitiu um enriquecimento com 174 indivíduos com fenótipos que antes eram sub representados, atingindo assim uma representatividade satisfatória no grupo controle de 471 indivíduos.

Tabela 1– Dados de composição dos sexos e das idades de ambos grupos amostrados.

	Pacientes ($n = 73$)	Controles ($n = 471$)
Sexo: N (% grupo)		
Masculino	27 (36,99)	240 (50,96)
Feminino	46 (63,01)	231 (49,04)
Média de Idade (S.D.)	44,74 (14,18)	35,02 (25,00)
Idade mediana [IIQ]	46 [33-55]	33 [25-44]
Idade mínima	18	18
Idade máxima	75	80

Tabela 2 – Categorização das amostras de ambos grupos (Pacientes, controles aleatórios e controles total) para os fenótipos: Tipo de pele Fitzpatrick, cor dos olhos, cor dos cabelos. Os números entre parênteses indicam a frequência relativa expressa em porcentagem.

	Pacientes (<i>n</i> = 73)	Controles Aleatórios (<i>n</i> = 297)	Controles Total (<i>n</i> = 471)
Pele Fitzpatrick			
I	1 (1,37)	23 (7,74)	69 (14,65)
II	8 (10,96)	87 (29,29)	140 (29,72)
III	25 (34,51)	99 (33,33)	130 (27,60)
IV	26 (35,35)	57 (19,19)	68 (14,44)
V	11 (15,07)	26 (8,75)	41 (8,70)
VI	2 (2,74)	5 (1,68)	23 (4,88)
Cor dos Olhos			
Azul	1 (1,37)	14 (4,71)	43 (9,13)
Verde	8 (10,96)	30 (10,10)	79 (16,77)
Mel	0 (0)	10 (3,37)	23 (4,88)
Castanho-claro	23 (31,51)	92 (30,98)	113 (23,99)
Castanho-escuro	41 (56,16)	151 (50,84)	213 (45,22)
Cor dos Cabelos			
Castanho-escuro	20 (27,40)	131 (44,11)	177 (37,58)
Castanho-claro	7 (9,59)	56 (18,86)	86 (18,26)
Loiro-claro	0 (0)	2 (0,67)	18 (3,82)
Loiro-escuro	2 (2,74)	25 (8,42)	44 (9,34)
Preto	29 (39,73)	68 (22,90)	110 (23,35)
Ruivo	1 (1,37)	0 (0)	11 (2,34)
Presença de Sardas	4 (5,63)	30 (10,10)	55 (11,68)

5.2. Caracterização dos genes

5.2.1. Gene *ASIP*

O tratamento dos dados brutos de sequenciamento permitiu identificar 70 sítios de variação no gene *ASIP*. Na Figura 5 está representada a análise de desequilíbrio de ligação do gene como um todo. Os 71 sítios de variação se distribuem na região do gene conforme a Tabela 3, e permitiram identificar 35 associações a fenótipos de pigmentação, sendo que 26 são sem ancestralidade aplicada como covariável, e 9 após sua aplicação (Figura 6). Estatísticas populacionais para todos os sítios de variação, tais como frequências alélicas, heterozigotes e aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, se encontram listadas no Apêndice A.

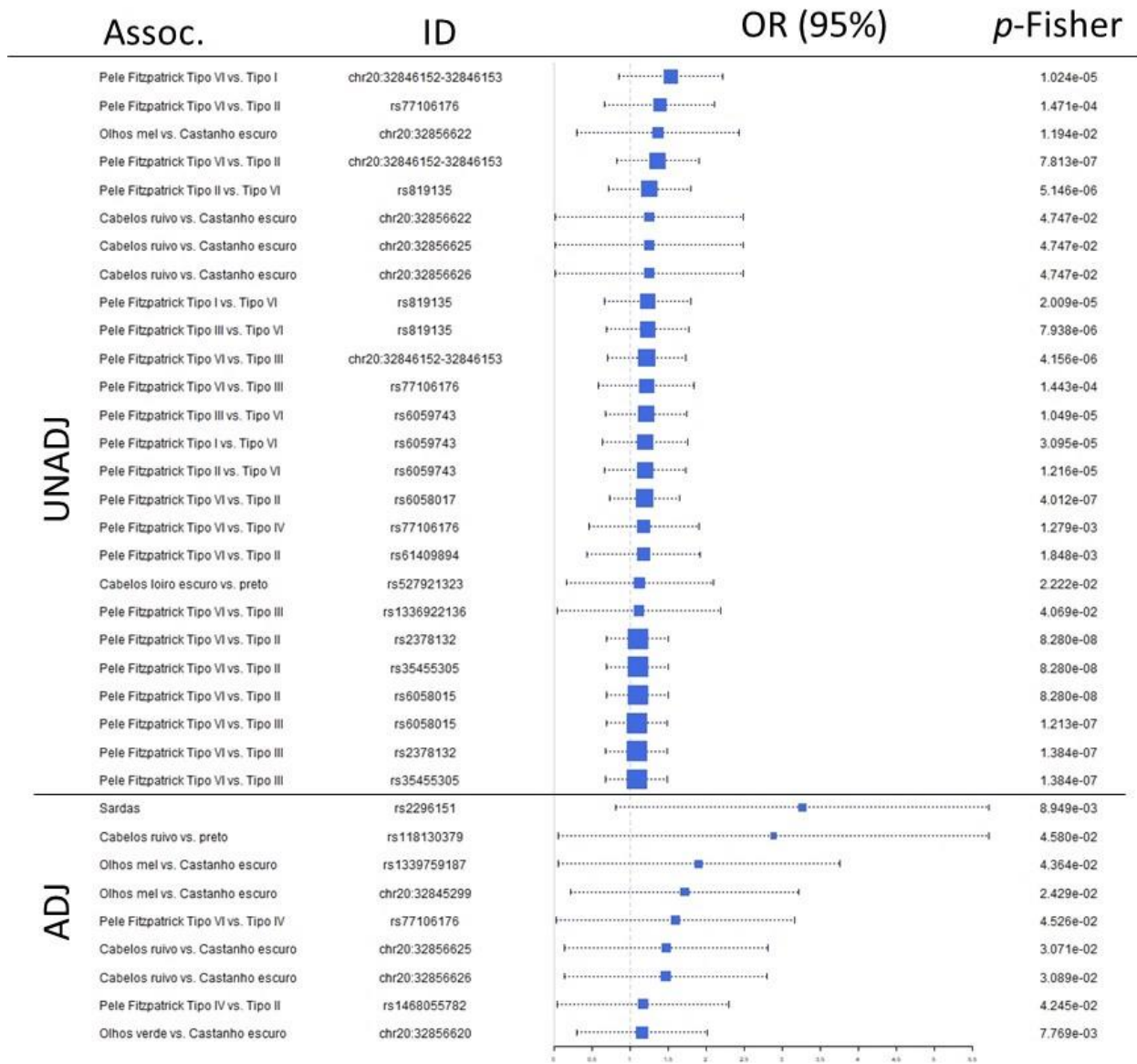
Figura 5 – Análise de desequilíbrio de ligação do gene *ASIP*. O gradiente representa D' de desequilíbrio de ligação, sendo que quadrados brancos representam $D' = 0$ (equilíbrio), e quadrados vermelhos representam $D' = 1$ (desequilíbrio)



Tabela 3 – Distribuição dos sítios de variação no gene *ASIP* de acordo com a região de ocorrência e número de associações observadas estratificadas de acordo com as regiões em que os sítios se localizam. Os valores à esquerda da barra representam o número de associações identificadas sem aplicação da ancestralidade como covariável, enquanto que à direita é o número de associações com a ancestralidade como covariável.

Gene	Região	InDels	SNPs	Total
<i>ASIP</i>	Promotora	19	28	47
	5' UTR	-	-	-
	Íntron	1	16	17
	<i>Missense</i>	-	2	2
	Sinônima	-	3	3
	3' UTR	-	2	2
Associações de genótipos do gene <i>ASIP</i> (sem/com ancestralidade aplicada como covariável)				
Pele				
	Promotora		16/1	
	Íntron		4/1	
	<i>Missense</i>		-	
	Sinônima		-	
	3' UTR		1/0	
Sardas				
	Promotora		-	
	Íntron		-	
	<i>Missense</i>		0/1	
Cabelos				
	Promotora		1/1	
	Íntron		3/2	
	<i>Missense</i>		-	
	3' UTR		-	
Olhos				
	Promotora		1/2	
	5' UTR		-	
	Íntron		0/1	
	<i>Missense</i>		-	
	3' UTR		-	
	Total		26/9	

Figura 6 - Associações fortes e significativas ($p < 0,05$ e $OR > 10$) envolvendo sítios de variação presentes no gene *ASIP* sem (UNADJ) e com (ADJ) correção para ancestralidade. Os quadrados azuis representam os valores de OR na base logarítmica ($\log_{10} OR$), as barras horizontais representam os intervalos de confiança de 95%, e a última coluna relaciona o valor da probabilidade do teste exato de Fisher bicaudal. A linha vertical pontilhada em azul se localiza em $OR = 1$, e a linha sólida preta se localiza em $OR = 0$. As associações se encontram ordenadas em ordem decrescente de valores de OR.



Em relação aos haplótipos, o gene *ASIP* apresenta 2 regiões definidas: a região que engloba a região promotora e o exon 1 (denominada *ASIP-prom*), e outra referente à região 3'UTR (denominada *ASIP-3'UTR*). As estatísticas populacionais, a relação de variantes em cada uma das regiões e a descrição das associações se encontram na Tabela 4.

Tabela 4 – Caracterização dos haplótipos da região promotora do gene *ASIP*, e associações identificadas. Os valores estatísticos são o valor de *p* de Fisher (*P*-Fisher), e *odds ratio* (OR) acompanhado do intervalo de confiança de 95% em parênteses (IC95%). São listados os valores de número de amostras com haplótipo definido (nSamp), número de haplótipos diferentes naquela região (NH), diversidade haplotípica observada (DH_o), diversidade haplotípica esperada (DH_E), e probabilidade de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (*p*HWE).

	nSamp (%)	NH	DH _o	DH _E	<i>p</i> HWE
ASIP-Prom	408 (0.75)	5	0.5907	0.6695	0.00004 +/- 0.00002
ASIP-3UTR	458 (0.84)	2	0.2926	0.3266	0.03179 +/- 0.00078

Sítios de variação (em ordem de coordenada genômica)									Número de associações identificadas com os fenótipos de pigmentação		
	rs6058014	rs879344613	rs2378132	chr20:32846152-32846153	rs35455305	rs6058015	rs6059743	rs819135	Cabelos	Pele	Total
ASIP-prom-1*	T	TA	A	CT	C	G	G	A	-	4	4
ASIP-prom-2	-	-	G	-	CAG	A	A	G	-	4	4
ASIP-prom-3	-	-	G	CTT	CAG	A	A	G	3	7	10
ASIP-prom-4	-	TAA	-	-	-	-	-	-	2	-	2

ASSOCIAÇÃO	Haplótipo	<i>P</i> -Fisher	OR (IC95%)
Pele tipo I vs. VI	ASIP-prom-1*	5,92 x 10 ⁻⁷	15,53 (3,59-67,17)
Pele tipo II vs. VI		2,51 x 10 ⁻¹⁰	22,82 (5,4-96,49)
Pele tipo III vs. VI		2,39 x 10 ⁻⁰⁹	20,05 (4,74-84,81)
Pele tipo IV vs. VI		1,21 x 10 ⁻⁰⁵	11,77 (2,73-50,75)
Pele tipo V vs. II	ASIP-prom-2	0,0007	11,37 (2,36-54,72)
Pele tipo V vs. I		0,0008	25,89 (1,47-455,1)
Pele tipo VI vs. II		5,35 x 10 ⁻⁰⁷	30,00 (6,31-142,57)
Pele tipo VI vs. I		1,58 x 10 ⁻⁰⁶	67,03 (3,83-1171,91)

Cabelos castanho escuro vs. Castanho claro		0,0003	21,58 (1,3-359,43)
Cabelos pretos vs. Castanho claro		$5,27 \times 10^{-06}$	34,74 (2,09-576,66)
Cabelos pretos vs. Loiro escuro		0,0012	16,95 (1,02-282,74)
Pele tipo IV vs. II		$5,23 \times 10^{-05}$	21,70 (2,79-168,93)
Pele tipo IV vs. I	<i>ASIP-prom-3</i>	0,0028	11,50 (1,47-89,87)
Pele tipo V vs. II		$1,56 \times 10^{-05}$	29,32 (3,69-232,97)
Pele tipo V vs. I		0,0009	15,54 (1,95-123,93)
Pele tipo VI vs. II		$6,72 \times 10^{-12}$	105,00 (13,40-822,94)
Pele tipo VI vs. III		$4,42 \times 10^{-09}$	20,42 (6,93-60,13)
Pele tipo VI vs. I		$1,21 \times 10^{-08}$	55,65 (7,07-437,79)
Cabelos ruivo vs. Pretos	<i>ASIP-prom-4</i>	0,0067	59,05 (2,73-1276,25)
Cabelos ruivo vs. Castanho claro		0,0142	39,05 (1,8-845,26)

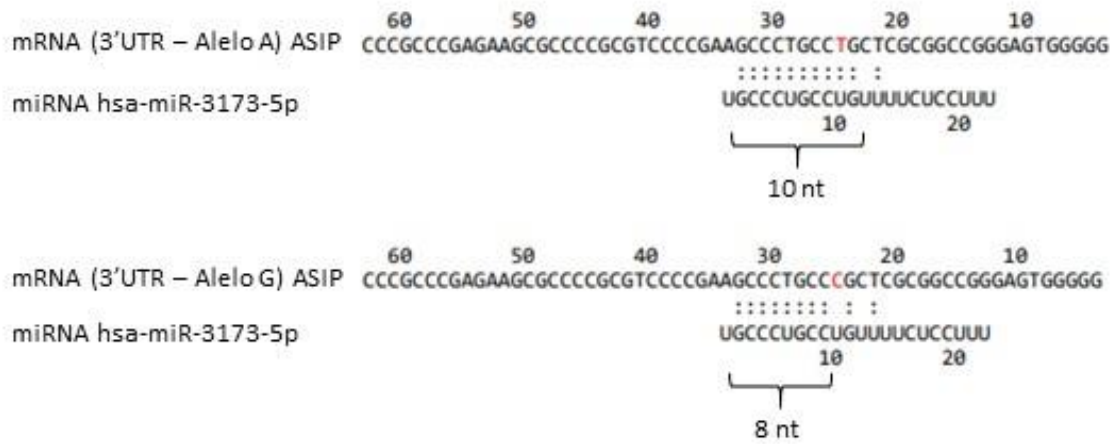
Número de associações identificadas para os haplótipos da região 3'UTR do ASIP

	rs140598557	rs6058017	Pele	Olhos	Cabelos
ASIP-3'utr-01	C	A	1	-	-
ASIP-3'utr-02	CA	G	3	1	2

ASSOCIAÇÃO	Haplótipo	P-Fisher	OR (IC95%)
Pele tipo II vs. VI	ASIP-3'utr-01	$2,90 \times 10^{-05}$	10,60 (5,28-21,26)
Pele tipo VI vs. II		$7,04 \times 10^{-05}$	25,67 (10,71-61,5)
Pele tipo VI vs. III		0,0301	19,50 (8,67-43,85)
Pele tipo VI vs. I		0,0145	21,00 (7,76-56,82)
Olhos castanho-escuros vs. Azuis	ASIP-3'utr-02	$2,48 \times 10^{-03}$	31,33 (1,92-511,27)
Cabelos castanho-escuros vs. Loiro-escuros		$2,42 \times 10^{-02}$	11,20 (1,52-82,75)
Cabelos pretos vs. Loiro-escuros		0,0276	20,54 (2,79-151,27)

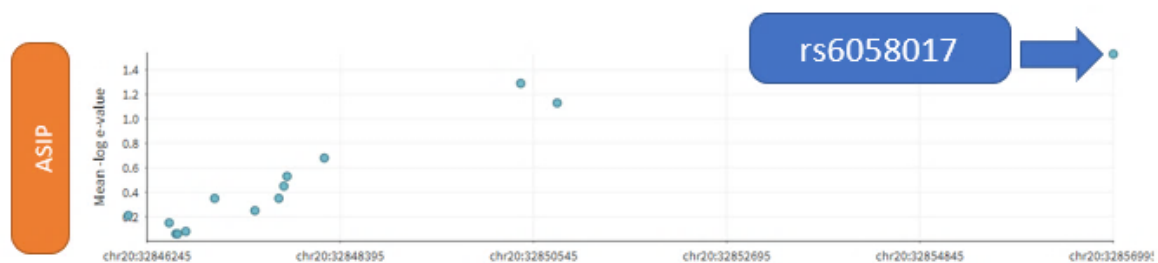
Para o gene *ASIP*, ligação diferencial por apenas um microRNA foi identificada por ambos algoritmos em relação ao SNP rs6058017, e a alteração da região de *seed* está indicada na Figura 7. Além disso, o algoritmo *MirSNP* indicou uma alteração de energia de ligação $\Delta\Delta G = (-25,27) - (-25,92) = + 0,65$, entre os alelos T e C, respectivamente, o que indica uma diminuição na força de interação deste par mRNA-microRNA.

Figura 7 – Ilustração do impacto dos alelos A e G do SNP rs6058017 do gene *ASIP* na interação com o microRNA hsa-miR-3173-5p



Em relação à regulação deste gene, a análise do Regulome DB (Figura 8) permitiu identificar que o principal sítio de variação que participa da regulação é o rs6058017, situado na região 3'UTR.

Figura 8 – Captura de tela das variantes do gene *ASIP* na ferramenta Regulome DB. No eixo x se encontram as coordenadas genômicas das variantes deste gene, e no eixo y o valor de $-\log e$, que reflete a probabilidade de afetar diversos fatores regulatórios.



5.2.2. Gene *MC1R*

Para o gene *MC1R*, foram identificados 133 sítios de variação, dos quais 56 são singletons. Na Figura 9, se encontra ilustrada a análise de desequilíbrio de ligação do gene como um todo. Estes sítios de variação se distribuem na região do gene conforme indicado na Tabela 5, e permitiram identificar 44 associações a fenótipos de pigmentação, sendo que 23 são sem ancestralidade aplicada como covariável, e 21 após sua aplicação (Figura 10). Estatísticas populacionais de frequências alélicas, heterozigosidade e aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg se encontram listadas no Apêndice A.

Figura 9 – Análise de desequilíbrio de ligação do gene *MC1R*. O gradiente representa D' de desequilíbrio de ligação, sendo que quadrados brancos representam $D' = 0$ (equilíbrio), e quadrados vermelhos representam $D' = 1$ (desequilíbrio)

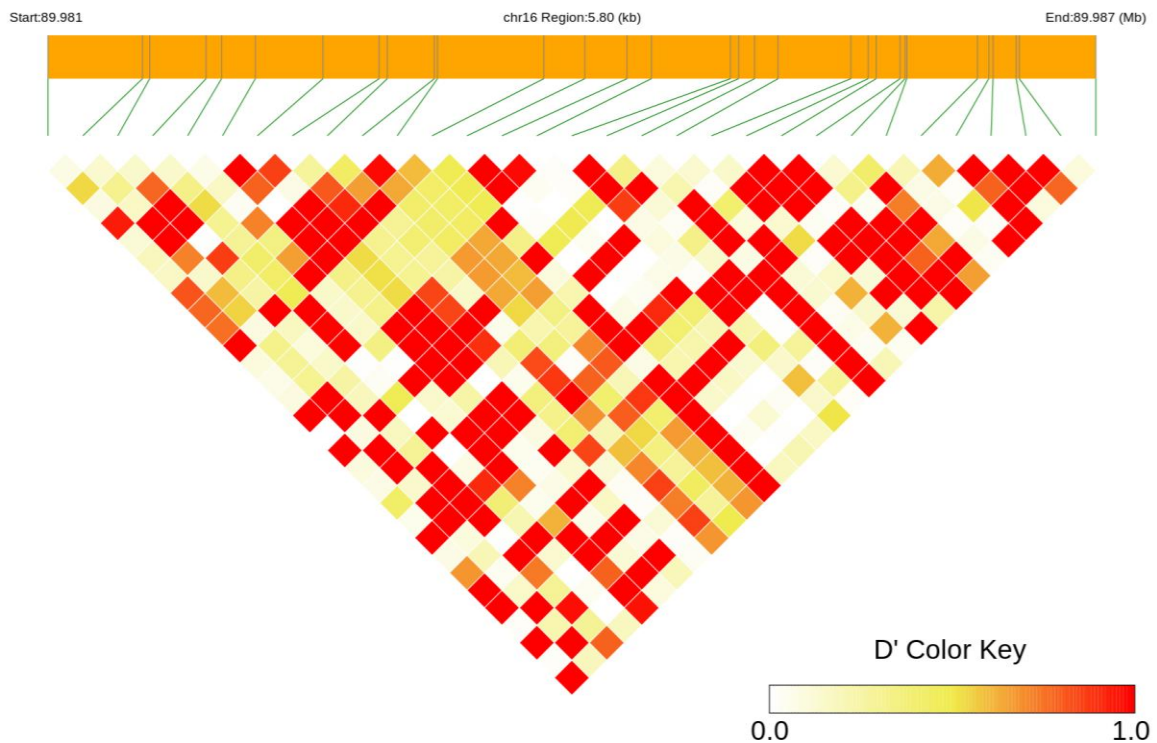


Tabela 5 - Caracterização da região de incidência de sítios de variação no gene *MC1R*. Associações e região em que os sítios se localizam. Os valores à esquerda da barra representam o número de associações identificadas sem aplicação da ancestralidade como covariável, enquanto que à direita é o número de associações com a ancestralidade como covariável.

	Região	InDels	SNPs	Total
<i>MC1R</i>	Promotora	8	48	56
	5' UTR	1	25	26
	<i>Frameshift</i>	3	-	3
	Missense	-	23	23
	Sinônima	-	11	11
	3' UTR	1	11	12
Associações de genótipos do gene <i>MC1R</i> (Sem/com ancestralidade aplicada como covariável)				
Pele				
	Promotora		10/4	
	<i>Missense</i>		0/3	
	Sinônima		2/0	
	3' UTR		2/0	
Sardas				
	<i>Missense</i>		1/0	
Cabelos				
	Promotora		0/1	
	<i>Missense</i>		7/3	
	3' UTR		0/2	
Olhos				
	Promotora		0/1	
	5' UTR		0/2	
	<i>Missense</i>		1/1	
	3' UTR		0/4	
	Total		23/21	

Figura 10 – Associações significativas ($p < 0,05$ e $OR > 10$) envolvendo sítios de variação presentes no gene *MC1R* sem (UNADJ) e com (ADJ) correção para ancestralidade. Os quadrados representam os valores de OR na base logarítmica ($\log_{10} OR$), as barras horizontais representam os intervalos de confiança de 95%, a quarta coluna relaciona o valor da probabilidade do teste exato de Fisher bilateral. A linha vertical pontilhada em azul se localiza em 1, e a linha sólida preta se localiza em 0. As associações se encontram ordenadas em ordem decrescente de valores de OR.

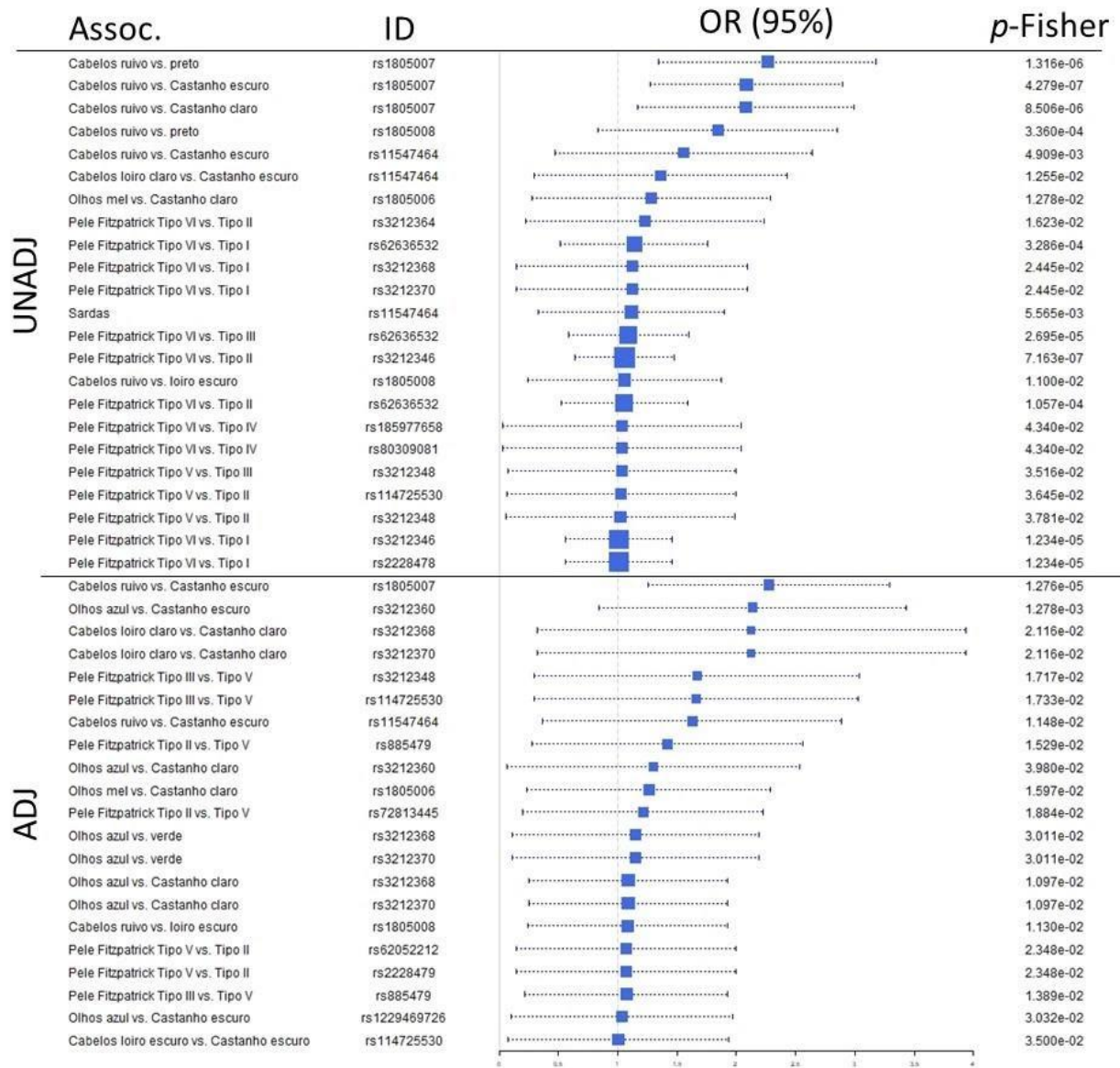


Tabela 6 - Caracterização dos haplótipos da região completa do gene *MC1R*, e associações identificadas. Os valores estatísticos são o valor de *p* de Fisher (*P*-Fisher), e *odds ratio* (OR) acompanhado do intervalo de confiança de 95% em parênteses (IC95%). São listados os valores de número de amostras com haplótipo definido (nSamp), número de haplótipos diferentes naquela região (NH), diversidade haplotípica observada (DH_o), diversidade haplotípica esperada (DH_e), e probabilidade de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (*p*HWE).

	nSamp (%)	NH	DH _o	DH _e	<i>p</i> HWE							
MC1R-Gene	387 (0.71)	13	0.7855	0.8517	0.33334 +/- 0.00416							
Variantes da região do gene MC1R												
	rs62052212	rs3212345	rs72813445	rs11641201	rs928484921	rs3212351	rs3212354	rs3212357	rs3212358	rs3212359	rs3212361	rs885479
MC1R-GENE-01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MC1R-GENE-02	A	-	-	C	Del	C	C	C	G	-	-	-
MC1R-GENE-03	A	-	-	C	Del	C	C	C	G	T	A	-
MC1R-GENE-04	A	C	A	C	-	C	C	C	G	-	-	A
Número de associações identificadas para os haplótipos do gene <i>MC1R</i>												
	Cabelos		Pele		Total							
MC1R-GENE-01					2							
MC1R-GENE-02					1							
MC1R-GENE-03			1		1							
MC1R-GENE-04					3							
Associação	Haplótipo		<i>P</i> -Fisher	OR (IC95%)								
II vs. VI	MC1R-GENE-01		2.90E-05	10.74 (2.52-45.73)								
I vs. VI	MC1R-GENE-01		7.04E-05	10.64 (2.44-46.41)								
I vs. V	MC1R-GENE-02		2.48E-03	12.47 (1.61-96.52)								
Cabelos Ruivos vs. Cabelos Loiro Claros	MC1R-GENE 03		0.027594	10.38 (1.1-98.2)								
VI vs. II	MC1R-GENE-01		2.28E-08	36.75 (7.86-171.92)								
VI vs. III	MC1R-GENE-04		3.35E-06	10.98 (4.02-29.97)								
VI vs. I	MC1R-GENE-01		1.98E-05	13.38 (3.55-50.34)								

A análise de associação a nível haplótipo permitiu identificar 7 associações, com 4 haplótipos, majoritariamente associados a fenótipos de pigmentação de pele (Tabela 6).

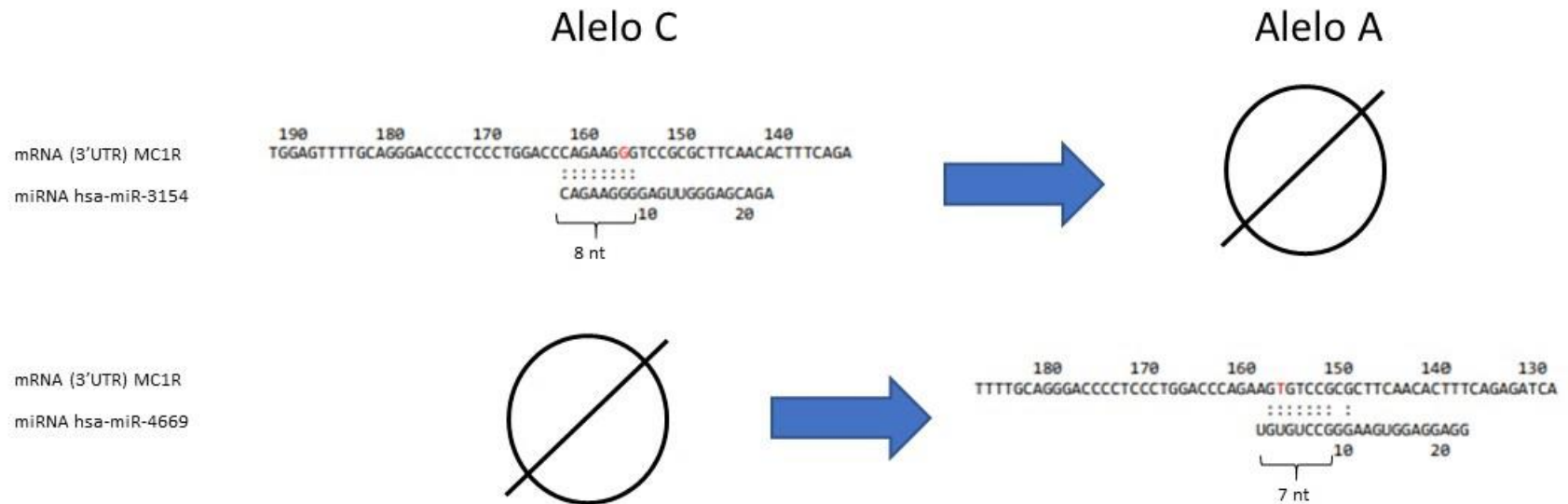
A análise do Regulome DB (Figura 11) para avaliar sítios mais regulatórios permitiu identificar que o principal sítio de variação com maior probabilidade de participar da regulação é o rs3212360, situado na região regulatória 5'UTR.

Para o gene *MC1R*, ligação diferencial por dois microRNAs foi identificada por ambos algoritmos, ambos em relação ao SNP rs3212370. A substituição do alelo A pelo alelo G anula a interação com o microRNAs hsa-miR-4669, ao mesmo tempo que faz surgir a interação com o hsa-mir-3154, como é possível identificar na Figura 12. Durante as análises de associação, foram detectadas evidências de que o alelo A esteja associado a fenótipos de cabelos claros (rs3212370*A: Cabelos loiro-claros vs. Cabelos castanho-claros, $p = 0,0212$, OR = 133,60) e a olhos claros (rs3212370*A: Olhos azuis vs. Olhos castanho-claros, $p = 0,0110$, OR = 12,22 e Olhos azuis vs. Olhos verdes, $p = 0,03011$, OR = 14,20).

Figura 11 - Captura de tela das variantes do gene *MC1R* na ferramenta Regulome DB. No eixo x se encontram as coordenadas genômicas das variantes deste gene, e no eixo y o valor de $-\log e$, que reflete a probabilidade de afetar diversos fatores regulatórios.



Figura 12 – Ilustração do impacto dos alelos C e A do SNP rs321270 do gene *MC1R* na interação com os microRNAs hsa-miR-3154 e hsa-miR-4669



5.2.3. Gene *BNC2*

Para o gene *BNC2*, foram identificados 431 sítios de variação, dos quais 154 são singletons. Na Figura 13, se encontra ilustrada a análise de desequilíbrio de ligação do gene como um todo. Estes sítios de variação se distribuem na região do gene conforme indicado na Tabela 7, e permitiram identificar 114 associações a fenótipos de pigmentação, sendo que 59 são sem ancestralidade aplicada como covariável (Figura 14), e 55 após sua aplicação (Figura 15). Estatísticas populacionais de frequências alélicas, heterozigosidade e aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg se encontram listadas no Apêndice A.

Figura 13 - Análise de desequilíbrio de ligação do gene *BNC2*. O gradiente representa D' de desequilíbrio de ligação, sendo que quadrados brancos representam $D' = 0$ (equilíbrio), e quadrados vermelhos representam $D' = 1$ (desequilíbrio).

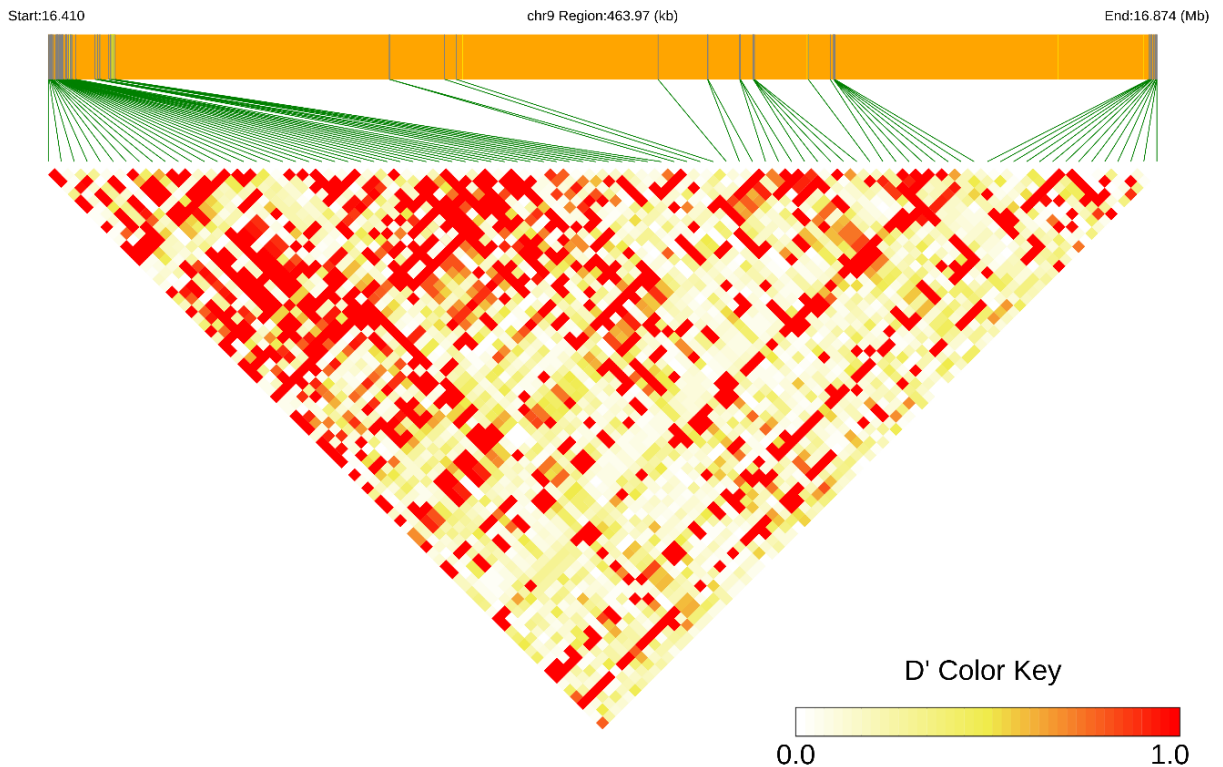


Tabela 7 - Caracterização da região de incidência de sítios de variação no gene *BNC2*. Associações e região em que os sítios se localizam. Os valores à esquerda da barra representam o número de associações identificadas sem aplicação da ancestralidade como covariável, enquanto que à direita é o número de associações com a ancestralidade como covariável.

Gene	Região	InDels	SNPs	Total
<i>BNC2</i>	Promotora	12	56	68
	5' UTR	-	3	3
	Íntron	13	137	150
	<i>Missense</i>	-	20	20
	Sinônima	-	12	12
	3' UTR	16	131	147
Associações de genótipos do gene <i>BNC2</i> (Sem/com ancestralidade aplicada como covariável)				
Vitiligo				
	Promotora	1/1		
	Íntron	2/2		
	<i>Missense</i>	1/0		
	Sinônima	1/0		
	3' UTR	1/0		
Pele				
	Promotora	1/5		
	Íntron	14/13		
	<i>Missense</i>	0/2		
	Sinônima	0/1		
	3' UTR	33/14		
Sardas				
	Promotora	0/1		
	Íntron	0/1		
Cabelos				
	Promotora	0/4		
	Íntron	1/5		
	3' UTR	1/4		
Olhos				
	Promotora	0/2		
	3' UTR	3/1		
	Total	59/55		

Figura 14 - Associações significativas ($p < 0,05$ e $OR > 10$) envolvendo sítios de variação presentes no gene *BNC2* sem (UNADJ) correção para ancestralidade. Os quadrados representam os valores de OR na base logarítmica ($\log_{10} OR$), as barras horizontais representam os intervalos de confiança de 95%, a quarta coluna relaciona o valor da probabilidade do teste exato de Fisher bilateral. A linha vertical pontilhada em azul se localiza em 1, e a linha sólida preta se localiza em 0. As associações se encontram ordenadas em ordem decrescente de valores de OR.

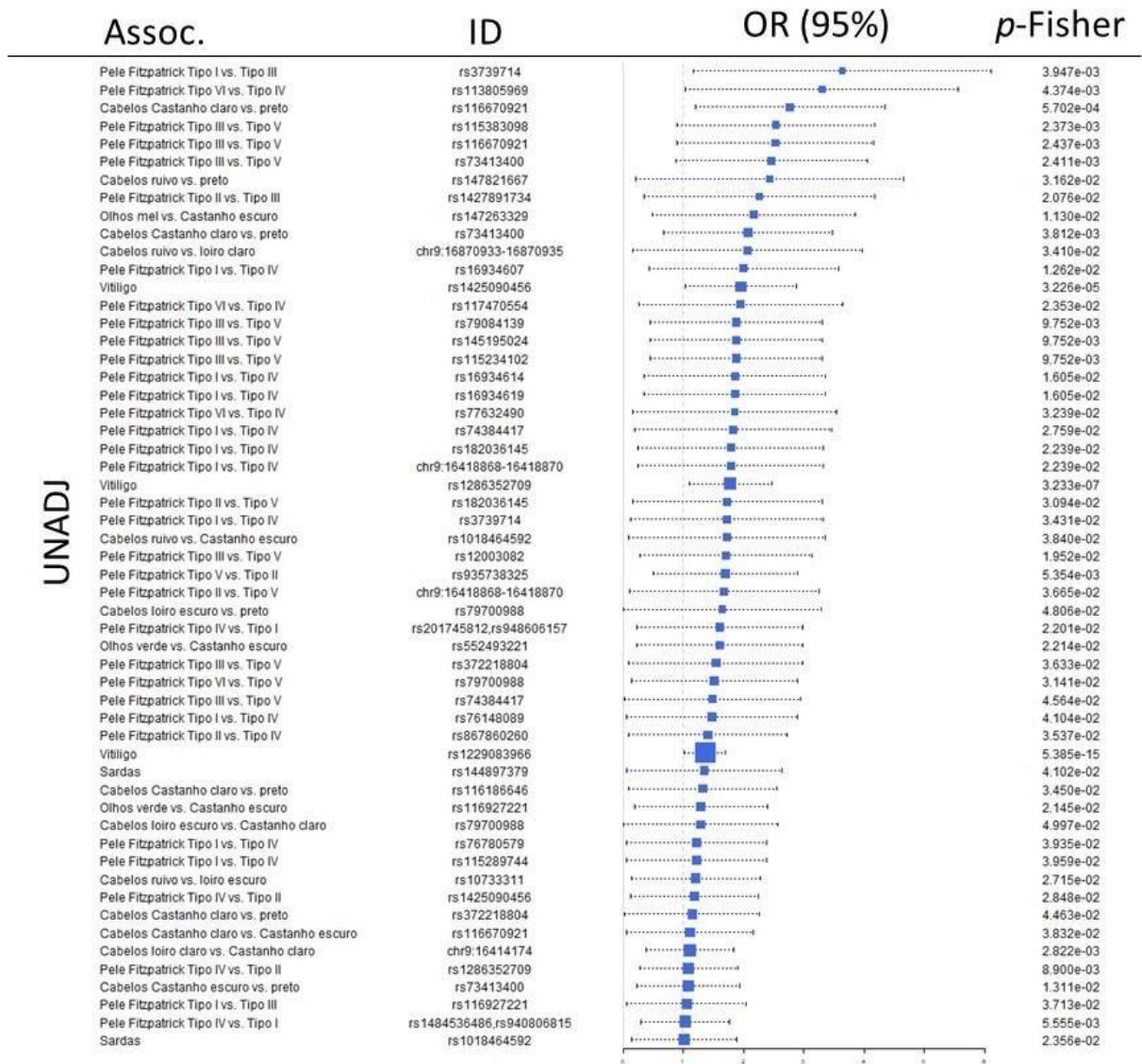
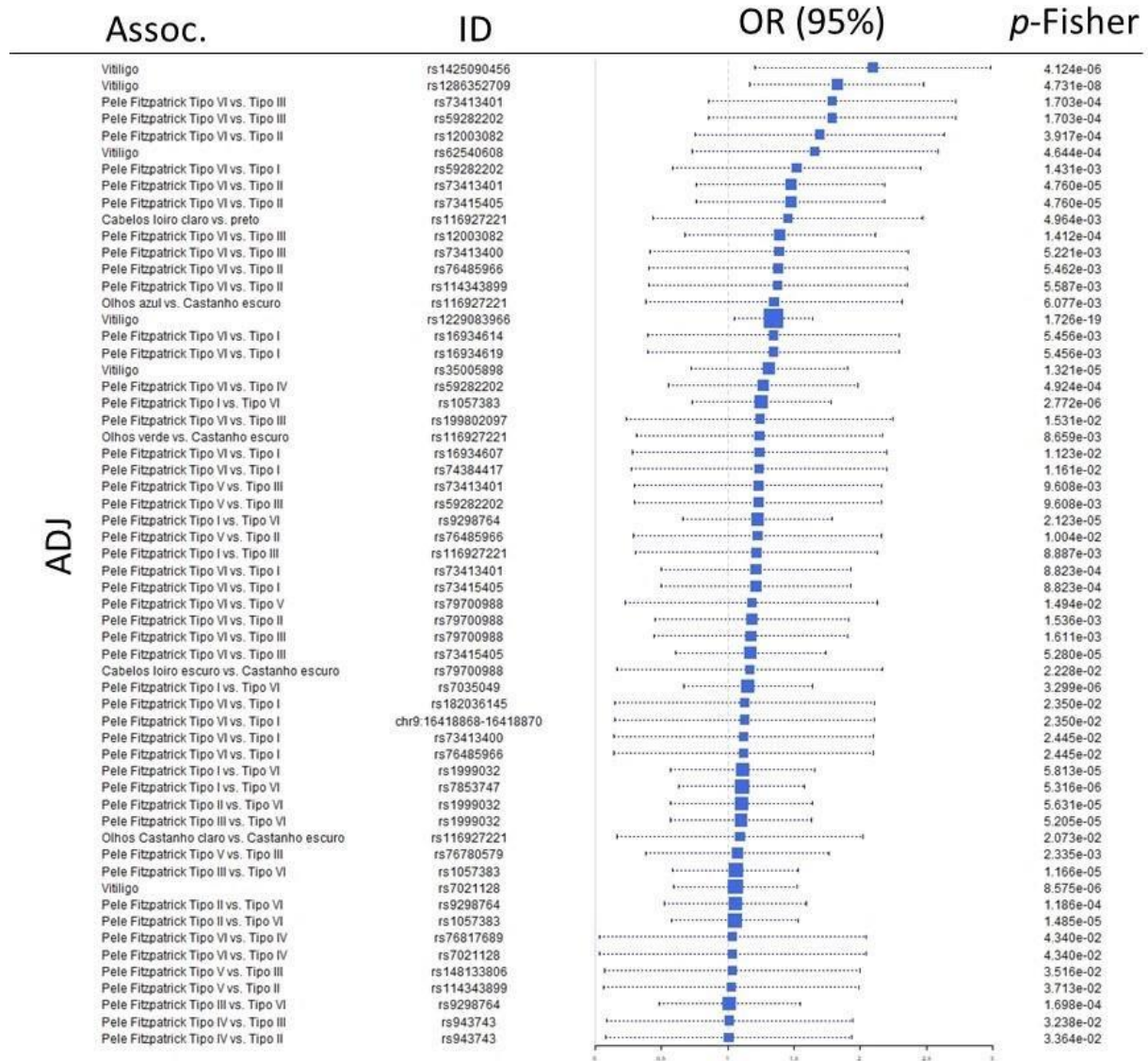


Figura 15 - Associações significativas ($p < 0,05$ e $OR > 10$) envolvendo sítios de variação presentes no gene *BNC2* com (ADJ) correção para ancestralidade. Os quadrados representam os valores de OR na base logarítmica ($\log_{10} OR$), as barras horizontais representam os intervalos de confiança de 95%, a quarta coluna relaciona o valor da probabilidade do teste exato de Fisher bilateral. A linha vertical pontilhada em azul se localiza em 1, e a linha sólida preta se localiza em 0. As associações se encontram ordenadas em ordem decrescente de valores de OR.



A definição de haplótipos permitiu dividir o gene em 19 regiões, das quais apenas 5 apresentam-se associados a fenótipos de pigmentação, e por motivos de manter o texto mais conciso, serão apresentados aqui os haplótipos que mostraram alguma associação. A região promotora possui 4 haplótipos associados, que se encontram caracterizados na Tabela 8, a região do exon 2 e dos introns 3 e 6 se encontram caracterizados na Tabela 9, e a região 3'UTR se encontra caracterizada na Tabela 10.

Tabela 8 - Caracterização dos haplótipos da região promotora do gene *BNC2*, e associações identificadas. Os valores estatísticos são o valor de *p* de Fisher (*P*-Fisher), e *odds ratio* (OR) acompanhado do intervalo de confiança de 95% em parênteses (IC95%).

	rs71513271	rs62541923	rs111567891	rs200648906	rs11789875	rs7024013	rs7027849	rs10962649	rs10810650	rs7044899
BNC2-prom01	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-
BNC2-prom02	-	-	C	-	-	T	-	-	-	-
BNC2-prom03	-	A	-	CG	A	-	-	T	-	-
BNC2-prom04	G	-	-	-	-	-	G	-	-	C
Associação	Haplótipo				<i>P</i> -Fisher	OR (IC95%)				
Olhos Azuis vs. Cast. Escuro					3.10.10 ⁻⁰²	24.13 (1.13-513.83)				
Cabelos Cast. Escuro vs. Pretos					3.57.10 ⁻⁰³	10.56 (1.36-81.68)				
Cabelos Cast. Claro vs. Pretos	BNC2-prom01				1.01.10 ⁻⁰³	15.32 (1.91-122.7)				
Cabelos Ruivos vs. Pretos					1.51.10 ⁻⁰²	31.67 (2.5-400.83)				
Olhos Verdes vs. Cast. Escuro					9.51.10 ⁻⁰³	12.69 (1.45-110.73)				
Pele tipo VI vs. II	BNC2-prom02				3.40.10 ⁻⁰²	23.22 (1.08-500.42)				
Pele tipo IV vs. II	BNC2-prom03				4.66.10 ⁻⁰³	22.32 (1.21-411.47)				
Cabelos Loiro Escuro vs. Cast. Escuro	BNC2-prom04				6.70.10 ⁻⁰⁴	27.80 (3.11-248.11)				

Tabela 9 - Caracterização dos haplótipos das regiões: exon 2, íntron 3 e 6 do gene *BNC2*, e associações identificadas. Os valores estatísticos são o valor de *p* de Fisher (*P*-Fisher), e *odds ratio* (OR) acompanhado do intervalo de confiança de 95% em parênteses (IC95%).

BNC2-Exon2						
	rs7858914	rs7858709	rs7858712	rs35475650	rs4007684	rs1970284
BNC2- exon2-ref	G	A	A	GA	C	A
BNC2- exon2-01	T	C	G	GA	CTTTT	T
BNC2-Intron3						
	rs76148089			rs35822374		
Bnc2- intron3-ref	A			T-		
Bnc2- intron3-01	G			TG		
BNC2-Intron6						
	rs77558509	rs1484536486	rs77623845	rs9298764	rs41313973	
bnc2-intron06-01	G	GA	T	A	C	
bnc2-intron06-02	G	GA	T	G	G	
Associação	Haplótipo			P-Fisher	OR (IC95%)	
Sardas vs, Sem Sardas	BNC2-Exon2-01			7,04.10 ⁻⁰⁵	17,02 (1,53-189,46)	
Pele tipo VI vs, II	BNC2-Intron3-01			7,04.10 ⁻⁰⁵	11,52 (4,01-33,15)	
Pele tipo II vs, VI				2,90.10 ⁻⁰⁵	13,09 (3,07-55,86)	
Pele tipo V vs, I				0,0301	10,28 (1,24-85,18)	
Pele tipo IV vs, VI	BNC2-Intron6-01			0,0145	13,33 (3,09-57,58)	
Pele tipo III vs, VI				2,48.10 ⁻⁰³	12,79 (3,00-54,42)	
Pele tipo I vs, VI				2,42.10 ⁻⁰²	23,64 (5,46-102,27)	
Sardas vs, Sem Sardas	BNC2- Intron6-02			3,35.10 ⁻⁰⁶	41,36 (1,97-869)	

Tabela 10 - Caracterização dos haplótipos da região 3'UTR do gene *BNC2*, e associações identificadas. Os valores estatísticos são o valor de *p* de Fisher (*P*-Fisher), e *odds ratio* (OR) acompanhado do intervalo de confiança de 95% em parênteses (IC95%).

	rs1443828404	rs7853747	rs200079950	rs1057383	rs7035049	chr9:16414174	rs1927627
bnc2-3'UTR-01	-	-	-	-	-	-	G
bnc2-3'UTR-02	-	G	-	A	G	-	-
bnc2-3'UTR-03	G	G	AT	A	G	-	-
bnc2-3'UTR-04	G	G	AT	A	G	A	-
Associação	Haplótipo			<i>P</i> -Fisher	OR (IC95%)		
Cabelos ruivos vs. Cast. Escuro	BNC2-3'UTR 01			2,40.10 ⁻⁰³	108,53 (4,82-2441,24)		
Cabelos ruivos vs. Cabelos Pretos				1,33.10 ⁻⁰²	32,25 (2,64-394,63)		
Pele tipo VI vs. II	BNC2-3'UTR 02			2,41.10 ⁻⁰²	28,56 (1,33-614,66)		
Pele tipo VI vs. III				1,88.10 ⁻⁰²	33,00 (1,53-709,86)		
Olhos Azuis vs. Cast. Escuro	BNC2-3'UTR 03			3,15.10 ⁻⁰²	23,71 (1,12-502,04)		
Pele tipo VI vs. II	BNC2-3'UTR 04			2,41.10 ⁻⁰²	28,56 (1,33-614,66)		

Foram identificados 16 microRNAs cuja interação com o mRNA sofre influência significativa de SNPs. Destaca-se a interação do microRNA hsa-miR-3127-3p na região do SNP rs7021128. A substituição do alelo T pelo alelo C altera a afinidade desta interação da ordem $\Delta\Delta G = (-22,92) - (-20,21) = - 2,71$, o que demonstra o aumento desta interação na presença do alelo C(?). Além disso, como é possível ver na Figura 16, na presença do alelo C, formam-se três ligações C-G seguidas. Apesar deste SNP não se localizar na região de *seed* desta interação, esta mudança contribui significativamente para a interação considerada.

A análise do Regulome DB para variantes deste gene (Figura 17) não permitiu destacar uma variante específica, no entanto, destaca-se maiores probabilidades de envolvimento com fatores regulatórios a região 3'UTR (mais à direita no gráfico) do que as outras regiões deste gene.

Figura 16 – Ilustração do impacto dos alelos T e C do SNP rs7021128 do gene *BNC2* na interação com o microRNA hsa-miR-3127-3p

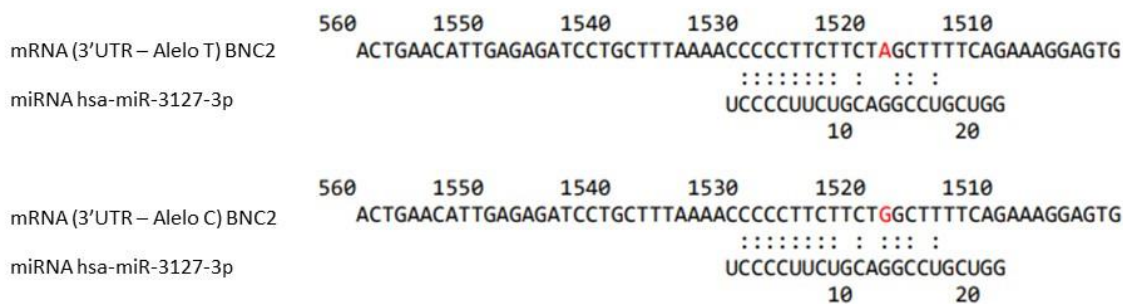
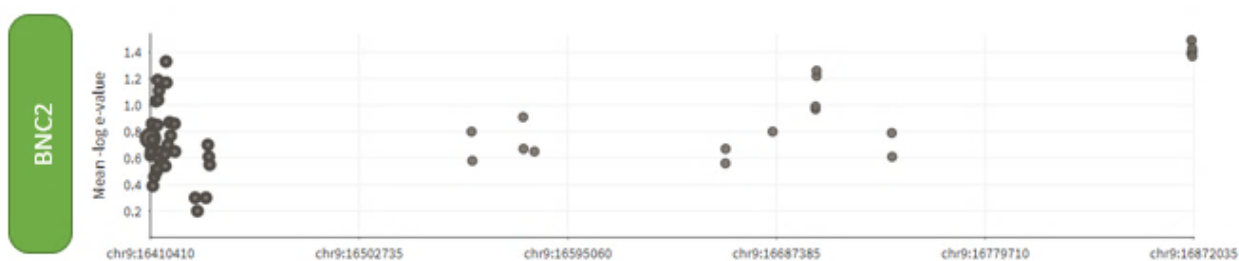


Figura 17 - Captura de tela das variantes do gene *BNC2* na ferramenta Regulome DB. No eixo x se encontram as coordenadas genômicas das variantes deste gene, e no eixo y o valor de $-\log e$, que reflete a probabilidade de afetar diversos fatores regulatórios.



5.2.4. Gene *KITLG*

Por sua vez, no gene *KITLG*, foram identificados 154 sítios de variação, dos quais 81 são singletons. Na Figura 18, se encontra ilustrada a análise de desequilíbrio de ligação do gene como um todo. Estes sítios de variação se distribuem na região do gene conforme indicado na Tabela 11, e permitiram identificar 28 associações a fenótipos de pigmentação, sendo que 13 são sem ancestralidade aplicada como covariável, e 15 após sua aplicação (Figura 19). Estatísticas populacionais de frequências alélicas, heterozigosidade e aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg se encontram listadas no Apêndice A.

Figura 18 - Análise de desequilíbrio de ligação do gene *KITLG*. O gradiente representa D' de desequilíbrio de ligação, sendo que quadrados brancos representam $D' = 0$ (equilíbrio), e quadrados vermelhos representam $D' = 1$ (desequilíbrio).

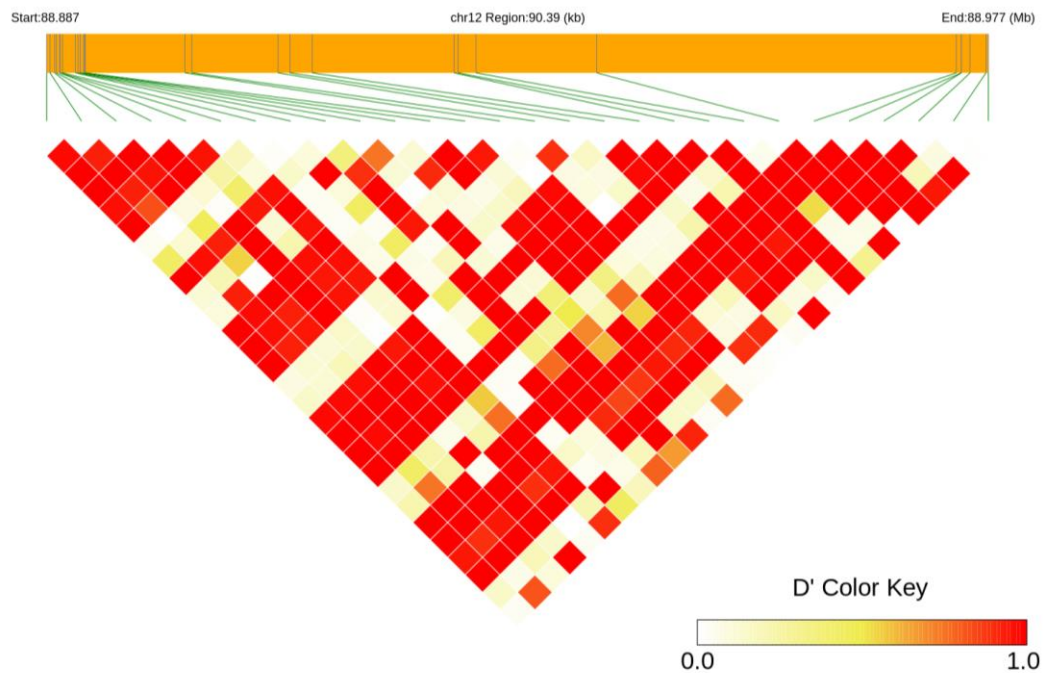
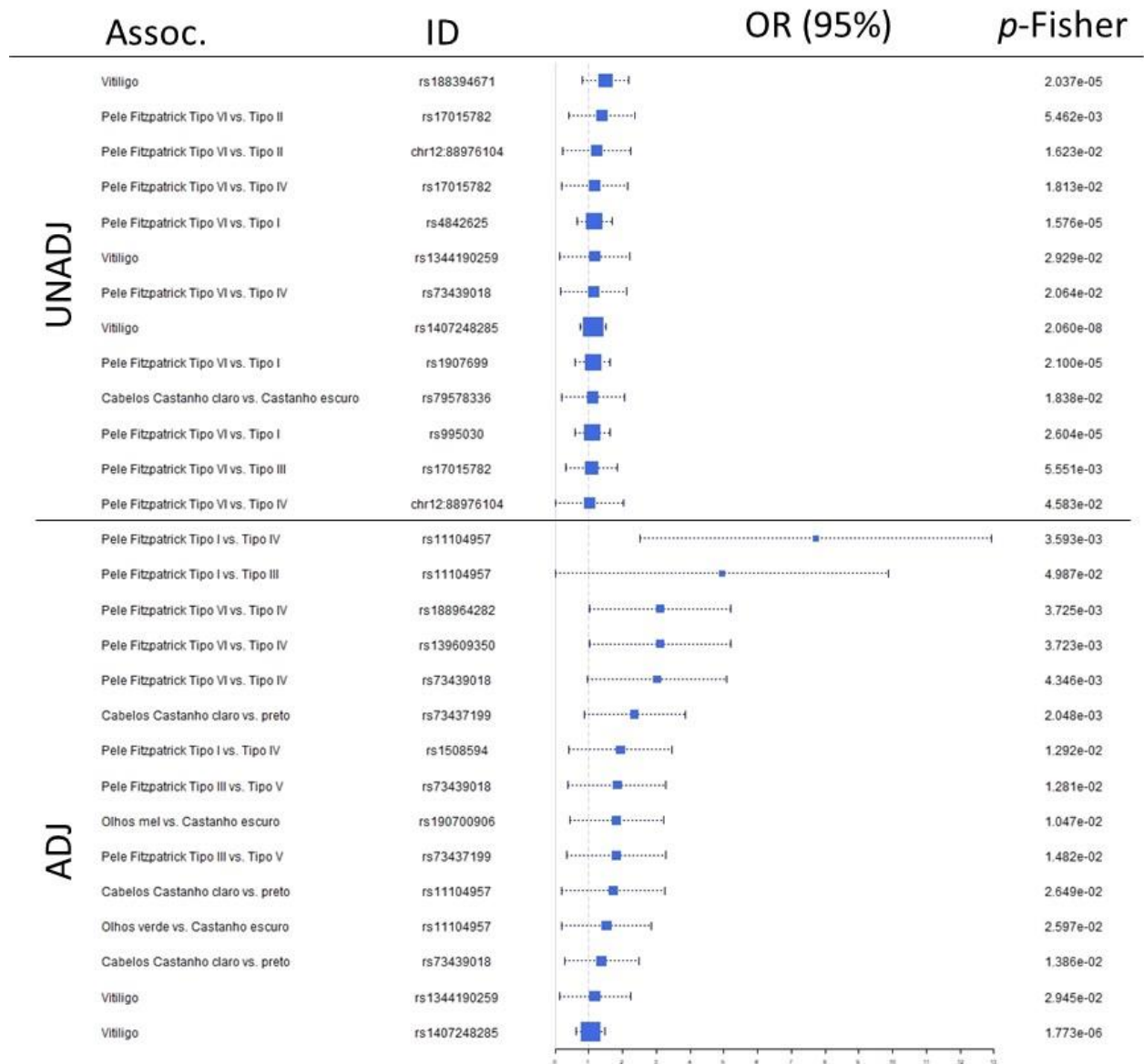


Tabela 11 - Caracterização da região de incidência de sítios de variação no gene *KITLG*. Associações e região em que os sítios se localizam. Os valores à esquerda da barra representam o número de associações identificadas sem aplicação da ancestralidade como covariável, enquanto que à direita é o número de associações com a ancestralidade como covariável.

Gene	Região	InDels	SNPs	Total
<i>KITLG</i>	Promotora	3	30	33
	5' UTR	-	2	2
	Íntron	1	67	68
	<i>Missense</i>	-	2	2
	Sinônima	-	2	2
	3' UTR	2	45	47
Associações de genótipos do gene <i>KITLG</i> (Sem/com ancestralidade aplicada como covariável)				
Vitiligo				
	Íntron		2/2	
	3' UTR		1/0	
Pele				
	Promotora		2/2	
	Íntron		1/3	
	Sinônima		3/0	
	3' UTR		3/3	
Cabelos				
	Promotora		0/1	
	Íntron		1/1	
	3' UTR		0/1	
Olhos				
	Promotora		0/1	
	3' UTR		0/1	
	Total		13/15	

Figura 19 - Associações significativas ($p < 0,05$ e $OR > 10$) envolvendo sítios de variação presentes no gene *KITLG* sem (UNADJ) e com (ADJ) correção para ancestralidade. Os quadrados representam os valores de OR na base logarítmica ($\log_{10} OR$), as barras horizontais representam os intervalos de confiança de 95%, a quarta coluna relaciona o valor da probabilidade do teste exato de Fisher bilateral. A linha vertical pontilhada em azul se localiza em 1, e a linha sólida preta se localiza em 0. As associações se encontram ordenadas em ordem decrescente de valores de OR.



Não foi possível determinar satisfatoriamente haplótipos para a região deste gene. No entanto, o estudo de microRNAs permitiu identificar treze miRNAs por ambos algoritmos

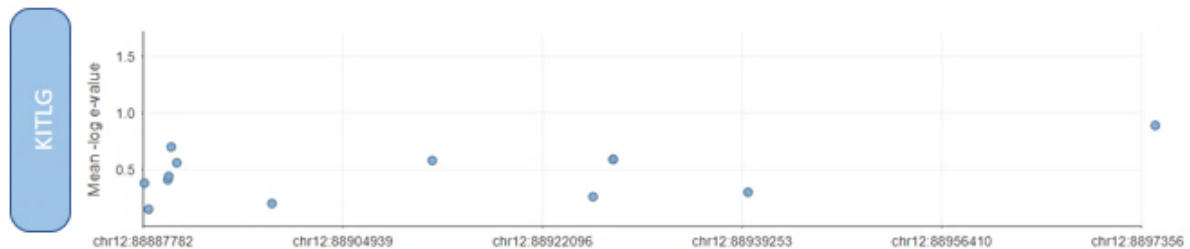
simultaneamente. Destes, doze interagem com região a qual se localiza o SNP rs1508594, onze dos quais representam quebras de interação do par mRNA-microRNA, como pode ser visto na Tabela 12.

Tabela 12 – Relação dos SNPs do gene *KITLG* e interações com microRNAs identificados. A coluna SNP ID relaciona o SNP estudado, a coluna REF/ALT identifica os alelos referência e alternativo de acordo com o genoma de referência hg19, miRNA se refere aos microRNAs identificados, a coluna efeito relaciona a alteração que a substituição do alelo referência pelo alternativo causa para aquele microRNA. A coluna ΔG_{ref} e ΔG_{alt} relacionam a energia livre da ligação do alelo referência e alternativo, respectivamente, com o microRNA. A coluna $\Delta\Delta G$ relaciona a alteração de energia observada pelos diferentes alelos.

SNP ID	REF/ALT	miRNA	Efeito	ΔG_{ref}	ΔG_{alt}	$\Delta\Delta G$
rs73437199	C/A	hsa-miR-3156-3p	Aumento	-18,08	-18,08	0,00
		hsa-miR-4329	Quebra	-18,41	-	-
		hsa-miR-4461	Cria	-	-18,63	-
		hsa-miR-548a-3p	Quebra	-7,27	-	-
		hsa-miR-548ae	Quebra	-7,02	-	-
		hsa-miR-548ah-3p	Quebra	-8,73	-	-
		hsa-miR-548aj-3p	Quebra	-7,92	-	-
rs1508594	G/A	hsa-miR-548am-3p	Quebra	-8,49	-	-
		hsa-miR-548aq-3p	Quebra	-7,02	-	-
		hsa-miR-548ar-3p	Quebra	-7,81	-	-
		hsa-miR-548e	Quebra	-17,84	-	-
		hsa-miR-548f	Quebra	-8,01	-	-
		hsa-miR-548x-3p	Quebra	-7,92	-	-

A análise do Regulome DB para o *KITLG* (Figura 20) mostra que não há uma região chave de regulação para este gene, sendo que o maior valor é atingido por variante na região 3'UTR.

Figura 20 - Captura de tela das variantes do gene *KITLG* na ferramenta Regulome DB. No eixo x se encontram as coordenadas genômicas das variantes deste gene, e no eixo y o valor de $-\log e$, que reflete a probabilidade de afetar diversos fatores regulatórios.



5.3. Interação gene-gene

As análises de interação gene-gene foram realizadas visando encontrar possíveis interações genotípicas que estejam associadas à incidência de vitiligo e que pudessem estar associadas ao índice de melanina tanto da região frontal do crânio (região mais exposta ao sol) quanto da região interna do braço (região menos exposta ao sol). Foram utilizados 94 sítios de variação distribuídos nos 4 genes, dos quais 92 se apresentaram algum modelo com regressão significativa para vitiligo, e todos os 94 se apresentaram em pelo menos um modelo significativo para o índice de melanina da região frontal do crânio e da região interna do antebraço. A ilustração da quantidade de modelos significativos entre os pares de genes se encontra ilustrado na Figura 21.

A relação dos 20 sítios de variação com maior número de modelos de regressão de segunda ordem significativos para vitiligo se encontra na Tabela 13. Os 20 modelos de pares de sítios de variação com regressão de segunda ordem mais significativos para vitiligo se encontram na Tabela 14.

Figura 21 – Gráfico circular que evidencia a frequência absoluta de interações significativas ($p < 0,05$) gene-gene no presente estudo. Relações redundantes não foram consideradas.

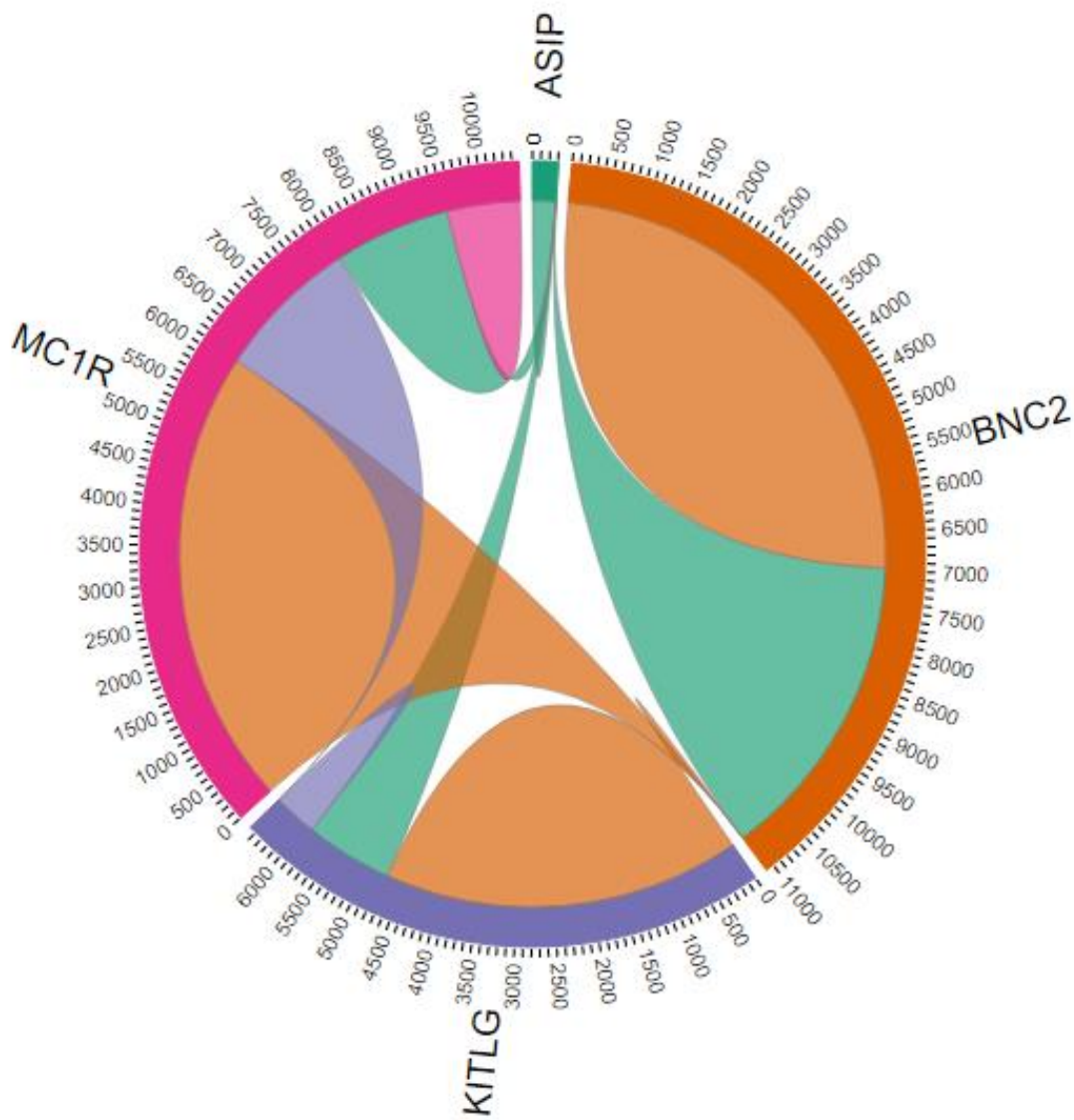


Tabela 13 – Relação dos 20 sítios de variação com maior número de modelos de interação de segunda ordem significativos de regressão logística para vitiligo. Estão listados os resultados sem a correção por ancestralidade (UNADJ) e com correção para ancestralidade (ADJ). Os sítios de variação estão divididos de acordo com a classificação dos modelos em alto risco (H) e baixo risco (L).

VITILIGO						
ID	Gene	UNADJ		ADJ		
		H	L	H	L	
rs1229083966	<i>BNC2</i>	206	152	211	146	
rs1970284	<i>BNC2</i>	143	57	29	11	
rs4007684	<i>BNC2</i>	125	55	14	11	
rs1360285	<i>BNC2</i>	105	52	26	15	
rs2424984	<i>ASIP</i>	99	9	32	4	
rs1388789	<i>KITLG</i>	61	7	66	5	
rs7046068	<i>BNC2</i>	96	31	7	4	
rs7858709	<i>BNC2</i>	72	17	33	11	
rs7858914	<i>BNC2</i>	72	26	18	11	
rs62052212	<i>MC1R</i>	97	25	3	1	
rs11641201	<i>MC1R</i>	98	12	14	2	
rs71513271	<i>BNC2</i>	100	11	9	5	
rs41268967	<i>BNC2</i>	94	17	8	2	
rs7024013	<i>BNC2</i>	90	18	11	2	
rs3212351	<i>MC1R</i>	84	9	23	1	
rs1805005	<i>MC1R</i>	35	19	47	14	
rs7962739	<i>KITLG</i>	91	16	6	1	
rs117470554	<i>BNC2</i>	92	16	3	1	
rs995029	<i>KITLG</i>	61	8	23	17	
rs1443828404	<i>BNC2</i>	67	8	28	5	

Tabela 14 - Vinte modelos de interação de segunda ordem mais significativos (com menores valores de probabilidade) para regressão logística de vitiligo. Os modelos se classificam em categorias (CAT.) de alto risco (H) e baixo risco (L).

	IDSN1	IDSNP2	GENE1-GENE2	GENÓTIPOS	BETA	<i>p</i>	CAT.
Sem correção para ancestralidade	rs1229083966	rs72714999	<i>BNC2-BNC2</i>	AC-CC	3,206	1,20.10 ⁻¹⁹	H
	rs1229083966	rs1927627	<i>BNC2-BNC2</i>	AC-AA	3,094	1,86.10 ⁻¹⁹	H
	rs1229083966	rs1927627	<i>BNC2-BNC2</i>	AA-AA	-3,045	3,23.10 ⁻¹⁹	L
	rs1229083966	rs77623845	<i>BNC2-BNC2</i>	AC-TT	3,293	1,19.10 ⁻¹⁸	H
	rs1229083966	rs1388789	<i>BNC2-KITLG</i>	AC-TT	3,386	1,55.10 ⁻¹⁸	H
	rs1229083966	rs62541923	<i>BNC2-BNC2</i>	AC-CC	3,383	1,70.10 ⁻¹⁸	H
	rs1229083966	rs4842477	<i>BNC2-KITLG</i>	AC-CC	3,360	2,08.10 ⁻¹⁸	H
	rs1229083966	rs12344	<i>BNC2-KITLG</i>	AC-TT	3,360	2,08.10 ⁻¹⁸	H
	rs1229083966	rs11104905	<i>BNC2-KITLG</i>	AC-CC	3,330	3,14.10 ⁻¹⁸	H
	rs1229083966	rs77623845	<i>BNC2-BNC2</i>	AC-AA	3,135	4,92.10 ⁻¹⁸	H
Com correção para ancestralidade	rs1229083966	rs77623845	<i>BNC2-BNC2</i>	AC-AA	2,924	2,34.10 ⁻¹⁵	H
	rs1229083966	rs77623845	<i>BNC2-BNC2</i>	AA-AA	-2,869	4,31.10 ⁻¹⁵	L
	rs1229083966	rs77623845	<i>BNC2-BNC2</i>	AC-CC	2,949	5,29.10 ⁻¹⁵	H
	rs1229083966	rs71513271	<i>BNC2-BNC2</i>	AC-AA	3,498	3,80.10 ⁻¹⁴	H
	rs1229083966	rs4842477	<i>BNC2-KITLG</i>	AC-CC	3,145	4,21.10 ⁻¹⁴	H
	rs1229083966	rs140598557	<i>BNC2-ASIP</i>	AC-CC	2,884	4,34.10 ⁻¹⁴	H
	rs1229083966	rs140598557	<i>BNC2-ASIP</i>	AC-CC	2,884	4,34.10 ⁻¹⁴	H
	rs1229083966	rs62052212	<i>BNC2-MC1R</i>	TT-GG	3,012	5,45.10 ⁻¹⁴	H
	rs1229083966	rs6058014	<i>BNC2-ASIP</i>	AC-TT	2,872	6,29.10 ⁻¹⁴	H
	rs1229083966	rs11104905	<i>BNC2-KITLG</i>	AC-CC	3,108	6,68.10 ⁻¹⁴	H

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1. Associações identificadas

6.1.1. Gene *BNC2*

Em relação ao fenótipo vitiligo, foram identificadas nove associações, apenas nos genes *BNC2* e *KITLG*. No entanto, quando ajustada para remoção de possível efeito de confundimento da ancestralidade, apenas cinco associações persistiram, das quais três foram de sítios de variação pertencentes ao gene *BNC2* e dois no gene *KITLG*. Para o gene *BNC2*, os sítios de variação que apresentaram associações foram rs1286352709 (Alelo C $\rightarrow p = 4,73 \cdot 10^{-08}$ e $3,23 \cdot 10^{-07}$, OR = 66,67 e 60,06; respectivamente para associação sem correção para ancestralidade e com correção), rs1229083966 (Alelo C $\rightarrow p = 1,73 \cdot 10^{-19}$ e $5,39 \cdot 10^{-15}$, OR = 22,12 e 23,04; respectivamente para associação sem correção para ancestralidade e com correção), ambos intrônicos, e rs1425090456 (Alelo G $\rightarrow p = 4,12 \cdot 10^{-06}$ e $3,23 \cdot 10^{-05}$, OR = 124,10 e 90,00; respectivamente para associação sem correção para ancestralidade e com correção), que se localiza na região promotora.

A variante da região promotora, rs1425090456, não foi associada a fenótipos de pigmentação em estudos anteriores. Sua frequência é baixa ao redor do mundo (0,48%), no entanto um pouco maior na região asiática (de 1% no leste a 4% no norte e oeste). Ela sobrepõe três sítios de ligação de fatores de transcrição: RNA polimerase II, EZH2 e TAF1, além de sítio de hipersensibilidade de DNase (*score* de 112). O fator EZH2 catalisa a metilação histonas H3 (H3K27), agindo de modo a reprimir a transcrição. O fator TAF1 é parte do maquinário recrutado para ação da RNA polimerase II, e interage diretamente com o motivo denominado TATA-box. Como o gene *BNC2* é bem associado à saturação da pigmentação (JACOBS et al., 2013), estes resultados apresentam evidências que a variante rs1425090456*G atua diretamente na expressão deste fator de transcrição, diminuindo-a. Como a correta expressão de *BNC2* garante ciclo celular saudável em queratinócitos, sua redução pode ser um fator de risco ao vitiligo, pois, com os queratinócitos desregulados, a distribuição de melanina será também comprometida.

Por sua vez, os sítios de variação intrônicos distam 6pb entre si no íntron 3 (entre os exons 3 e 4), e sobrepõe sítios de regulação extremamente complexos, o que é evidenciado pelo fato do rs1286352709 sobrepôr-se a 18 sítios de ligação de fatores de transcrição, entre eles, sítio de ligação de RNA polimerase II, além de *score* significativo para atividade de DNase (92).

Para o rs1229083966, a sobreposição ocorre para os mesmos os sítios de ligação de fatores de transcrição, com a inclusão de CEBPB, um *enhancer*. Apesar de serem caracterizados como intrônicos em relação à isoforma de referência, ambos se localizam em região promotora de uma isoforma alternativa (ENST00000468187.6_1), conforme observado na Figura 22. Em uma situação normal, esta isoforma é expressa em quantidades desprezíveis em todos os tecidos humanos. Portanto, a associação entre estes dois sítios de variação a vitiligo, pode ser intermediada pelo aumento da expressão desta isoforma alternativa, e como ela possui atividade inferior à isoforma referência, isso pode refletir na incidência do fenótipo estudado.

A frequência do rs1286352709 nesta amostra foi menor que 5%, dessa forma, a análise de interação gene-gene incluiu apenas o rs1229083966. Foi então observado um viés na análise de epistasia para vitiligo, pois por ser associado ao fenótipo estudado, esta variante esteve presente em 2,97 vezes mais modelos de regressão de segunda ordem significativos que o rs1970284 (segundo polimorfismo mais presente em modelos significativos) (Tabela 13). Além disso, é possível ver que os 10 modelos mais significativos tanto sem quanto com correção para ancestralidade envolvem esse polimorfismo (Tabela 14). De maneira geral, dos 20 sítios de variação com maiores números de modelos significativos, 12 pertencem ao BNC2. Esse fato destaca ainda mais a provável causalidade dos sítios de variação aqui apresentados na incidência do vitiligo.

De toda forma, futura análise de interação gene-gene deverá corrigir para o efeito do polimorfismo rs1229083966, e inclusive corrigir para possível efeito semelhante de outros que apresentem esse comportamento, pois dos 94 sítios de variação testados, 92 apresentaram pelo menos um modelo significativo. Esse fato pode ser explicado por um polimorfismo do banco ser fortemente associado à característica estudada, o qual vai apresentar em quase qualquer combinação possível de variantes, pelo menos um modelo estatisticamente significativo.

Em relação aos fenótipos cor dos cabelos e olhos, para todos os genes deste estudo foram observados mais associações após a correção por ancestralidade. Para o *BNC2*, o número aumentou de 5 para 17 associações sem e com a correção por ancestralidade, respectivamente. De maneira semelhante para os fenótipos cor de pele e presença de sarda, o gene *BNC2* foi o que apresentou mais associações tanto sem a correção quanto com a correção por ancestralidade.

Dentre as 14 associações de cabelos, destaca-se a variante rs147821667, a qual o alelo alternativo G se apresentou-se fortemente associado (após correção por ancestralidade) a cabelos ruivos quando comparados com cabelos pretos ($p = 0,0345$, OR = 268,6). O alelo G possui frequência global baixa (0,8%) (1kgen), sendo que a população com maior frequência é europeia (1,1%) segundo o banco de dados gnomAD. Este polimorfismo se encontra em região

do íntron 4 da isoforma referência, e na região do exon 1 de um transcrito alternativo (ENST00000471301.3_1), que traduz uma proteína de 43aa, apresentando apenas um domínio SWIM-*type*. Este domínio é caracterizado por protusões *finger-like* que fazem contato com molécula alvo, geralmente, íons Zinco, ou outros metais (LAITY; LEE; WRIGHT, 2001). Além disso, esta variante sobrepõe sítio de ligação de 21 fatores de transcrição, os quais são expressos na pele, com destaque aos fatores CTCF, apontado pela ferramenta Regulome DB e STAT, apontado pela ferramenta HaploReg. O fator de transcrição CTCF possui caráter ambíguo, ele pode atuar como *enhancer*, ou como repressor, o que dificulta a interpretação. No entanto, o fator de transcrição STAT funciona como um *enhancer*, e esta variante reduz a interação de 12,3 para 8,4, diminuindo a afinidade deste fator por esta região. Desta forma, estes resultados mostram evidências que esta alteração neste ponto vai reduzir a transcrição do *BNC2* referência, ou facilitar a transcrição de uma forma alternativa menos efetiva. E essa redução da atividade de *BNC2*, pode se implicar na redução da eumelanogênese.

6.1.2. Gene *KITLG*

O gene *KITLG* foi o outro gene que apresentou sítios de variação associados à incidência de vitiligo. A variante rs188394671 apresentou o alelo A associado a vitiligo com $p = 2,04 \cdot 10^{-05}$ e OR = 30,77. Possui frequência global baixa, de 0,5%; chegando ao máximo de 0,7% em população europeia. Esta variante se localiza na região 3' UTR, e incide em sítio de ligação de dois fatores de transcrição: RNA polimerase II, e GATA3, um *enhancer*, conforme indicado pelo navegador de genomas UCSC. Já pelo banco de dados HaploReg, oito outros fatores de transcrição foram indicados, sendo que esta variante causa maior impacto na interação com CHD2 um fator que estimula a transcrição (Redução de 13,8 para o alelo referência para 1,8 para o alelo alternativo) e E2F (Redução de 14 para 2), que pode atuar como ativador ou supressor. No entanto, esta associação não permaneceu significativa após aplicação da ancestralidade como covariável. Desta forma, os resultados mostram evidências de uma penetrância de menor grau desta variante na melanogênese, ao potencialmente diminuir a expressão de *KITLG*, comprometendo assim, a atividade de *KITLG* nesta via metabólica.

Por sua vez, os sítios de variação rs1344190259*T e rs1407248285*T se localizam lado-a-lado em coordenadas genômicas, e apresentaram associações tanto sem realizar-se ajuste para a ancestralidade (para rs1344190259*T, $p = 0,0293$, OR = 14,70, para rs1407248285*T, $p = 2,06 \cdot 10^{-08}$, OR = 13,41), quanto quando a correção por ancestralidade foi aplicada (para rs1344190259*T, $p = 0,0294$, OR = 14,93, para rs1407248285*T, $p = 1,77 \cdot 10^{-06}$, OR = 10,92) sem grandes alterações. E apesar de fortemente associados, estes dois sítios de variação

intrônicos não sobrepõem sítios de ligação de fatores de transcrição, nem poderiam estar envolvidos em criação de sítio de splicing alternativo (pois não criam *motifs*), e nem sobrepõe sítio de regulação. Dessa forma, os mecanismos moleculares responsáveis por estas associações devem ser investigados mais profundamente.

Apesar das associações encontradas a vitiligo, os testes de interação gene-gene não foram realizados para nenhuma destas três variantes, pois todas se apresentam em frequências inferiores a 5%.

Para os fenótipos de pele, destaca-se associação da variante rs17015782*A com peles mais escuras, mais especificamente pele Fitzpatrick tipo VI (vs. IV $\rightarrow p = 0,0181$, OR = 15,00; vs. II $\rightarrow p = 0,0054$, OR = 24,00; vs. III $\rightarrow p = 0,0555$, OR = 12,10). Esta variante se localiza em região codificante, e é responsável por uma mutação sinônima na serina 71, no exon 4 (agC \rightarrow agT), classificada como benigna em dois estudos independentes, segundo o ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/RCV000953465/>). Ao redor do mundo, o alelo A possui frequência baixa (1%), atingindo um máximo de 4% na população africana no banco de dados *1000genomes*. Além disso, se localiza em sítio de ligação de RNA polimerase II. No entanto, quando aplicada a ancestralidade como covariável, estas associações não se mostraram significativas, o que pode evidenciar que estas associações são um reflexo da ancestralidade, e não de alguma possível alteração molecular ou regulatória relacionada a essa variante.

As associações para os fenótipos da pigmentação dos cabelos e olhos permitiu identificar, após aplicação da correção por ancestralidade, cinco associações envolvendo quatro sítios de variação do *KITLG*, os quais se distribuem na região 3' UTR (2), intrônica (1) e promotora (1). Essas associações se destacam pois envolvem fenótipos de pigmentação intermediária contra fenótipos de pigmentação mais forte, como por exemplo, olhos verdes em relação a olhos castanho-escuro (rs11104957*A: $p = 0,0260$; OR = 33,19), ou cabelos castanho-claros em relação a cabelos pretos (rs73437199*G: $p=0,0020$; OR = 224,10). Essas associações são importantes pois a investigação de fenótipos em espectros distantes costuma resultar em associações mais significativas, mas normalmente são mais influenciadas pela covariável ancestralidade.

O alelo A da variante rs11104957 incide na região promotora (aprox. 500 pb 5') do transcrito ENST00000228280.9, possui frequência global de 2%, sendo que a frequência máxima se encontra na população japonesa, com 28%, e é responsável por forte alteração na interação com fator de transcrição MEF2 que participa da montagem da aparelhagem de RNA polimerase II (POLR2A), e conseqüente estímulo da transcrição (A interação com o MEF2 vai de 0,3 para alelo referência para 12,3 para alelo alternativo) (MILLIGAN; JOLLY, 2012).

Como na pele o transcrito que é mais expresso é o ENST00000378535.4, e esta variante ocorre a aproximadamente 40k bp *upstream* deste transcrito alternativo, estes resultados indicam evidências que o alelo A implica numa maior expressão da isoforma ENST00000228280.9, mediada por aumento da afinidade de MEF2, e o aumento desta isoforma favorece fenótipos intermediários em detrimento de fenótipos extremos por meio de mecanismos moleculares a serem elucidados.

6.1.3. Gene *ASIP*

Estudos anteriores em amostra coreana (envolvendo 114 pacientes de vitiligo e 111 controles saudáveis) e húngara (207 pacientes de vitiligo e 112 controles saudáveis) foram incapazes de detectar associação significativa do polimorfismo rs6058017*G a vitiligo. Em concordância com estes fatos, na amostra estudada, este polimorfismo não apresentou frequências significativamente diferentes entre os grupos caso e controle ($p = 0,3385$). No entanto, de acordo com associações já identificadas na literatura (DE ARAÚJO LIMA; DE TOLEDO GONÇALVES; FRIDMAN, 2015; PEREIRA, 2017; SOUZA et al., 2021), o alelo G deste polimorfismo foi associado a pele mais marcadamente pigmentada (tipo VI na escala Fitzpatrick) em contraste a pele menos pigmentada (tipo II na escala Fitzpatrick) ($p = 4,01 \cdot 10^{-07}$, OR = 15,56). Esta associação não foi detectada quando aplicada a correção por ancestralidade. De fato, a distribuição de rs6058017*G nas amostras do projeto 1000genomes foi de 79,1% e 10,3% para os grupos Africano e Europeu, respectivamente, evidenciando assim o aspecto ancestral envolvido nesta associação.

De maneira geral, este gene é altamente associado aos fenótipos de pigmentação de pele. No presente estudo, foram detectadas 24 associações sem a covariável ancestralidade, das quais apenas duas persistiram após correção. A alta penetrância das mutações neste gene nos fenótipos de pigmentação também se evidencia nas análises de interação gene-gene, principalmente em relação a variante rs140598557 e vitiligo.

Para o fenótipo presença de sardas, o polimorfismo rs2296151*C foi associado após correção por ancestralidade ($p = 0,0089$, OR = 1831,00). Este polimorfismo incide em região codificante do exon 1, e é responsável pela alteração valina \rightarrow alanina (gTc \rightarrow gCc). Apesar da alteração de aminoácido, a predição do impacto desta mutação pelo algoritmo SIFT o classificou como “tolerável” com score 1,0000; enquanto que pelo algoritmo PolyPhen-2 ele foi classificado “benigno” com score 0,008. Não é uma variante anotada pelo ClinVar. Além disso, este polimorfismo se sobrepõe a sítio de ligação de RNA polimerase II, sendo que o banco de dados Haploreg indica mudança da interação com o fator de transcrição VDR (de 2,0

para alelo referência para 12,9 para o alelo alternativo), que se liga a sítio específico e atua de modo a ativar a transcrição. Desta forma, estes resultados sugerem que o alelo alternativo desta variante e sua associação à presença de sardas pode ser mediada por aumento de transcrição de *ASIP*, que irá se refletir em fenótipos mais claros, que são sujeitos a maiores danos devido a radiação solar, e assim, uma maior incidência de sardas.

Para o fenótipo cor dos cabelos, a aplicação da correção por ancestralidade permitiu identificar três sítios de variação associados, dos quais entre eles, o rs118130379*T se destaca por estar associado a cabelos ruivos em contraste a cabelos pretos ($p = 0,0458$, OR = 765,00). Este polimorfismo se localiza em região intrônica e sobrepõe a sítio de ligação do fator de transcrição CTCF. Este fator liga-se a regiões distantes do DNA formando uma alça, na qual interações dentro dela são favorecidas, e interações com elementos exteriores são inibidas (GHIRLANDO; FELSENFELD, 2016)

Em relação aos haplótipos, foi possível identificar 19 haplótipos diferentes, dos quais 4 apresentaram associações a algum fenótipo de pigmentação. Fato que se destaca é que os haplótipos *ASIP-prom-1* e *ASIP-prom-4* se apresentaram associados a fenótipos mais claros, enquanto que os haplótipos *ASIP-prom-2* e *ASIP-prom-3* se apresentaram associados a fenótipos mais escuros. Estima-se que o conjunto de sítios de variação presentes estejam associados a uma significativa alteração na expressão deste gene visto que eles se encontram na região promotora deste gene.

6.1.4. Gene *MC1R*

O gene *MC1R* foi um dos primeiros genes a ser associado a fenótipos de pigmentação humana (VALVERDE et al., 1995). De fato, o polimorfismo rs1805007*T é classicamente associado a cabelos ruivos (NEUMANN et al., 2017; SIEWIERSKA-GÓRSKA et al., 2017; ZORINA-LICHTENWALTER et al., 2019), e no presente estudo também foi associado à cabelos ruivos quando comparados a cabelos pretos ($p = 8,51 \cdot 10^{-06}$, OR = 120,30), castanho claro ($p = 4,28 \cdot 10^{-07}$, OR = 121,10) e castanho escuro ($p = 1,32 \cdot 10^{-06}$, OR = 183,30). Esse polimorfismo é responsável pela alteração da arginina 151 para citosina, e pelo algoritmo SIFT e PolyPhen-2 foi classificada como deletéria em ambos. Além disso, é relatado na literatura que essa alteração anula a atividade da proteína produzida (FERNANDEZ et al., 2007), o que explica os fenótipos claros quando este polimorfismo está presente. No entanto, apenas a associação de cabelos ruivos em comparação a castanho escuro permaneceu significativo ($p = 1,28 \cdot 10^{-05}$, OR = 187,80) após a correção por ancestralidade.

Em relação ao vitiligo, o polimorfismo rs1805008*T, o qual também já foi muito associado à pigmentação (OLLMANN et al., 1998), apresentou diferentes frequências em amostra da Hungria, quando pacientes de pele clara com vitiligo foram comparados a controles de pele clara (SZÉLL et al., 2008). Este polimorfismo apresentou uma frequência significativamente menor em pacientes de vitiligo do que no grupo controle, o que poderia evidenciar um “efeito de proteção” para este fenótipo. Na amostra estudada, este polimorfismo especificamente não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos caso e controle ($p = 0.7569$). Apesar disso, este polimorfismo foi associado a cabelos ruivos quando comparados a cabelos loiro escuro ($p = 0,0110$, OR = 11,43), a qual persistiu após correção por ancestralidade ($p = 0,0113$, OR = 12,13).

Para o fenótipo de pigmentação de olhos, a associação que se destaca foi do polimorfismo rs1805006*A o qual foi associado a olhos mel em comparação a castanho claro, tanto sem a correção por ancestralidade ($p = 0,0128$, OR = 19,06) quanto com esta correção ($p = 0,0160$, OR = 18,28). Este polimorfismo se localiza na região codificante, e é responsável pela alteração ácido aspártico \rightarrow ácido glutâmico (gaC \rightarrow gaA). Diversos estudos reportaram a menor penetrância deste polimorfismo em comparação aos já citados (PASQUALI et al., 2014), e as associações encontradas corroboram com este fato. Além disso, o polimorfismo rs3212360*T foi associado a olhos azuis em comparação a olhos castanho escuro ($p = 0,001278$, OR = 136,80). Este polimorfismo se localiza na região 5' UTR, e sobrepõe 32 sítios de ligação de fator de transcrição.

Para o fenótipo de pigmentação da pele, o maior destaque rs62052212*A o qual foi associado a pele mais marcadamente pigmentada (pele tipo V na escala Fitzpatrick) em relação a pele mais clara (pele tipo II na escala Fitzpatrick) ($p = 0,0235$, OR = 11,80). Este polimorfismo se localiza na região promotora, e sobrepõe sítio de ligação de 10 fatores de transcrição. Além disso, o genótipo rs62052212*G/G foi o único polimorfismo do gene *MC1R* a se apresentar entre os 10 modelos mais significativos de regressão logística para vitiligo com correção por ancestralidade na Tabela 14.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Este foi o primeiro estudo de associação de pigmentação em uma população tão miscigenada quanto a brasileira envolvendo técnica de sequenciamento de nova geração para os genes *BNC2*, *KITLG*, *ASIP* e *MC1R* simultaneamente. Os dados gerados por este estudo permitiram uma caracterização sob uma perspectiva inédita ou pouco explorada dos genes de interesse. Foram descobertos um total de 788 sítios de variação distribuídos nestes quatro genes, os quais permitiram identificar 121 associações associados aos fenótipos de pigmentação estudados. Apenas nos genes *BNC2* e *KITLG* foi possível identificar variantes associadas ao fenótipo vitiligo.

No gene *BNC2*, duas variantes que se localizam em região intrônica do transcrito principal, mas na região promotora de um transcrito alternativo, se mostraram associadas ao vitiligo com o efeito de confundimento da ancestralidade e essa associação persistiu após aplicar-se a ancestralidade como covariável. Para a rs1286352709, o alelo C foi associado com valores de $p = 4,73.10^{-08}$ e $3,23.10^{-07}$, e OR = 66,67 e 60,06; respectivamente para associação sem correção para ancestralidade e com correção. Já para o rs1229083966, o alelo C foi associado com valores de $p = 1,73.10^{-19}$ e $5,39.10^{-15}$, OR = 22,12 e 23,04; respectivamente para associação sem correção para ancestralidade e com correção. Ambos sítios sobrepõe uma complexa região de regulação, evidenciada pela quantidade de fatores de transcrição com alta afinidade pela região. Estes resultados mostram evidências que a presença do alelo C pode favorecer a expressão da isoforma alternativa, que possui uma menor atividade, e pode desencadear o distúrbio de pigmentação.

Já para o gene *KITLG*, foi possível identificar que o alelo A da variante rs188394671 está associada ao desenvolvimento de vitiligo com $p = 2,04.10^{-05}$ e OR = 30,77. No entanto, essa associação não permaneceu significativa após aplicação da ancestralidade da amostra como covariável no teste. Dessa forma, evidencia-se a menor penetrância desta variante no desenvolvimento do fenótipo. Além disso, duas variantes (Por sua vez, os sítios de variação rs1344190259 e rs1407248285) foram fortemente associadas a vitiligo tanto sem quanto com a correção por ancestralidade. No entanto, não sobrepõem sítio regulatório algum, e o mecanismo molecular que dessa associação ainda há de ser elucidado.

Apesar de não apresentarem variantes com alelos associados a vitiligo, os genes *ASIP* e *MC1R* apresentaram várias associações significativas para fenótipos de pigmentação em geral. Associações clássicas, como a *MC1R*:rs1805007*T a cabelos ruivos, ou *ASIP*:rs6058017*G com fenótipos mais escuros também foram identificados no presente estudo.

Destaca-se que as associações envolvendo o gene *ASIP* foram as mais sensíveis a ancestralidade, pois, ao testar associações sem esta covariável, foi possível identificar 26 associações, enquanto que ao incorporar a covariável ancestralidade ao teste, apenas 9 associações foram identificadas. Já para o gene *MC1R* um comportamento curioso foi em relação as associações com cor dos olhos. Apenas uma foi identificada sem a aplicação da ancestralidade como covariável, mas oito foram identificadas após aplicação desta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMYERE, M. et al. KITLG Mutations Cause Familial Progressive Hyper- and Hypopigmentation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n. 6, p. 1234–1239, jun. 2011.
- ANDREWS, S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. . Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>, 2010.
- BARENBOIM, M. et al. MicroSNiPer: a web tool for prediction of SNP effects on putative microRNA targets. **Human Mutation**, v. 31, n. 11, p. 1223–1232, nov. 2010.
- BARSH, G. S. What Controls Variation in Human Skin Color? **PLoS Biology**, v. 1, n. 1, p. e27, 13 out. 2003.
- BONIFACE, K. et al. Vitiligo: Focus on Clinical Aspects, Immunopathogenesis, and Therapy. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 54, n. 1, p. 52–67, 6 fev. 2018.
- BOX, N. F. et al. Characterization of Melanocyte Stimulating Hormone Receptor Variant Alleles in Twins with Red Hair. **Human Molecular Genetics**, v. 6, n. 11, p. 1891–1897, 1 out. 1997.
- BOYLE, A. P. et al. Annotation of functional variation in personal genomes using Regulome DB. **Genome Research**, v. 22, n. 9, p. 1790–1797, 5 set. 2012.
- BRANICKI, W. et al. Model-based prediction of human hair color using DNA variants. **Human Genetics**, v. 129, n. 4, p. 443–454, 4 abr. 2011.
- CALLE, M. L. et al. mbmdr: an R package for exploring gene–gene interactions associated with binary or quantitative traits. **Bioinformatics**, v. 26, n. 17, p. 2198–2199, 1 set. 2010.
- CASTELLI, E. C. et al. HLA-E coding and 3' untranslated region variability determined by next-generation sequencing in two West-African population samples. **Human Immunology**, v. 76, n. 12, p. 945–953, dez. 2015.
- CHANG, C. C. et al. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. **GigaScience**, v. 4, n. 1, p. 7, 25 dez. 2015.
- CHEN, W. et al. A Functional p53 Responsive Polymorphism in KITLG, rs4590952, Does not Affect the Risk of Breast Cancer. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 6371, 15 maio 2015.
- DE ARAÚJO LIMA, F.; DE TOLEDO GONÇALVES, F.; FRIDMAN, C. SLC24A5 and ASIP as phenotypic predictors in Brazilian population for forensic purposes. **Legal Medicine**, v. 17, n. 4, p. 261–266, jul. 2015.
- D'MELLO, S. et al. Signaling Pathways in Melanogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 7, p. 1144, 15 jul. 2016.
- ERIKSSON, N. et al. Web-Based, Participant-Driven Studies Yield Novel Genetic Associations for Common Traits. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 6, p. e1000993, 24 jun. 2010.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564–567, 6 maio 2010.

- EZZEDINE, K. et al. Revised classification/nomenclature of vitiligo and related issues: the Vitiligo Global Issues Consensus Conference. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 25, n. 3, p. E1–E13, maio 2012.
- FERNANDEZ, L. et al. MC1R: three novel variants identified in a malignant melanoma association study in the Spanish population. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 8, p. 1659–1664, ago. 2007.
- FITZPATRICK, T. B. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. **Archives of Dermatology**, v. 124, n. 6, p. 869–871, 1 jun. 1988.
- GARCIA-BORRÓN, J. C.; SANCHEZ-LAORDEN, B. L.; JIMENEZ-CERVANTES, C. Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. **Pigment Cell Research**, v. 0, n. 0, p. 051103015727002, 3 nov. 2005.
- GAUTHIER, Y.; ANDRE, M. C.; TAÏEB, A. A Critical Appraisal of Vitiligo Etiologic Theories. Is Melanocyte Loss a Melanocytorrhagy? **Pigment Cell Research**, v. 16, n. 4, p. 322–332, ago. 2003.
- GHIRLANDO, R.; FELSENFELD, G. CTCF: making the right connections. **Genes & Development**, v. 30, n. 8, p. 881–891, 15 abr. 2016.
- HATTORI, M. et al. In-frame Val 216 -Ser 217 deletion of KIT in mild piebaldism causes aberrant secretion and SCF response. **Journal of Dermatological Science**, v. 91, n. 1, p. 35–42, jul. 2018.
- HUANG, X. et al. Dissecting dynamics and differences of selective pressures in the evolution of human pigmentation. **Biology Open**, v. 10, n. 2, 15 fev. 2021.
- IANNELLA, G. et al. Vitiligo: Pathogenesis, clinical variants and treatment approaches. **Autoimmunity Reviews**, v. 15, n. 4, p. 335–343, abr. 2016.
- JACOBS, L. C. et al. Comprehensive candidate gene study highlights UGT1A and BNC2 as new genes determining continuous skin color variation in Europeans. **Human Genetics**, v. 132, n. 2, p. 147–158, 11 fev. 2013.
- KHURRUM, H. et al. Multivariate Analysis of Factors Associated with the Koebner Phenomenon in Vitiligo: An Observational Study of 381 Patients. **Annals of Dermatology**, v. 29, n. 3, p. 302, 2017.
- KINGO, K. et al. Gene expression analysis of melanocortin system in vitiligo. **Journal of Dermatological Science**, v. 48, n. 2, p. 113–122, nov. 2007.
- KUNDU, R. V. et al. The convergence theory for vitiligo: A reappraisal. **Experimental Dermatology**, v. 28, n. 6, p. 647–655, 28 jun. 2019.
- LAITY, J. H.; LEE, B. M.; WRIGHT, P. E. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. **Current opinion in structural biology**, v. 11, n. 1, p. 39–46, fev. 2001.
- LAN, C.-C. E. et al. Association study between keratinocyte-derived growth factor gene polymorphisms and susceptibility to vitiligo vulgaris in a Taiwanese population: potential involvement of stem cell factor. **British Journal of Dermatology**, v. 160, n. 6, p. 1180–1187, jun. 2009.
- LI, H. et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. **Bioinformatics**, v. 25, n. 16, p. 2078–2079, 15 ago. 2009.
- LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics**, v. 25, n. 14, p. 1754–1760, 15 jul. 2009.

- LIU, C. et al. MirSNP, a database of polymorphisms altering miRNA target sites, identifies miRNA-related SNPs in GWAS SNPs and eQTLs. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 661, 23 dez. 2012.
- MANOLACHE, L.; BENEÀ, V. Stress in patients with alopecia areata and vitiligo. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 21, n. 7, p. 921–928, ago. 2007.
- MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet.journal**, v. 17, n. 1, p. 10, 2 maio 2011.
- MCKENNA, A. et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. **Genome Research**, v. 20, n. 9, p. 1297–1303, set. 2010.
- MCLAREN, W. et al. The Ensembl Variant Effect Predictor. **Genome Biology**, v. 17, n. 1, p. 122, 6 dez. 2016.
- MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215–1215, 1988.
- MILLIGAN, J. N.; JOLLY, E. R. Identification and Characterization of a Mef2 Transcriptional Activator in Schistosome Parasites. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 1, p. e1443, 3 jan. 2012.
- MORETTI, S. Vitiligo and Epidermal Microenvironment: Possible Involvement of Keratinocyte-Derived Cytokines. **Archives of Dermatology**, v. 138, n. 2, p. 273–274, 1 fev. 2002.
- NAGUI, N. A. et al. Assessment of gene expression levels of proopiomelanocortin (POMC) and melanocortin-1 receptor (MC1R) in vitiligo. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 58, n. 2, p. e36–e39, maio 2017.
- NEUMANN, A. et al. Predicting hair cortisol levels with hair pigmentation genes: a possible hair pigmentation bias. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 8529, 17 dez. 2017.
- OLLMANN, M. M. et al. Interaction of Agouti protein with the melanocortin 1 receptor in vitro and in vivo. **Genes & Development**, v. 12, n. 3, p. 316–330, 1 fev. 1998.
- PARRA, E. J. Human pigmentation variation: Evolution, genetic basis, and implications for public health. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 134, n. S45, p. 85–105, 2007.
- PASQUALI, E. et al. *MC1R* variants increased the risk of sporadic cutaneous melanoma in darker-pigmented Caucasians: A pooled-analysis from the M-SKIP project. **International Journal of Cancer**, p. n/a-n/a, jun. 2014.
- PEREIRA, A. L. E. **Diversidade das regiões regulatórias e exônicas dos genes ASIP, MC1R e TYRP1 determinada por sequenciamento de nova geração em amostra da população brasileira e seu envolvimento na biossíntese de melanina.** [s.l.: s.n.].
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945–59, jun. 2000.
- R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. <https://www.R-project.org>, 2020.
- SHIN, J.-G. et al. GWAS Analysis of 17,019 Korean Women Identifies the Variants Associated with Facial Pigmented Spots. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 141, n. 3, p. 555–562, mar. 2021.

- SIEWIERSKA-GÓRSKA, A. et al. Association of five SNPs with human hair colour in the Polish population. **HOMO**, v. 68, n. 2, p. 134–144, mar. 2017.
- SOUZA, J. M. DE et al. Forensic DNA Phenotyping: starting point to prediction model in Pernambuco population, Brazil. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 13, p. e262101320955, 11 out. 2021.
- STEPHENS, M.; SMITH, N. J.; DONNELLY, P. A New Statistical Method for Haplotype Reconstruction from Population Data. **The American Journal of Human Genetics**, v. 68, n. 4, p. 978–989, abr. 2001.
- SULEM, P. et al. Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. **Nature Genetics**, v. 39, n. 12, p. 1443–1452, 21 dez. 2007.
- SZÉLL, M. et al. The Arg160Trp Allele of Melanocortin-1 Receptor Gene Might Protect Against Vitiligo. **Photochemistry and Photobiology**, v. 84, n. 3, p. 565–571, maio 2008.
- THAPPA, D.; KAIMAL, S. Diet in dermatology: Revisited. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology**, v. 76, n. 2, p. 103, 2010.
- TOOSI, S.; ORLOW, S. J.; MANGA, P. Vitiligo-Inducing Phenols Activate the Unfolded Protein Response in Melanocytes Resulting in Upregulation of IL6 and IL8. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 11, p. 2601–2609, nov. 2012.
- VALVERDE, P. et al. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. **Nature Genetics**, v. 11, n. 3, p. 328–330, nov. 1995.
- VANHOUTTEGHEM, A. et al. Basonuclin 2 has a function in the multiplication of embryonic craniofacial mesenchymal cells and is orthologous to disco proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 34, p. 14432–14437, 25 ago. 2009.
- VISSER, M.; PALSTRA, R.-J.; KAYSER, M. Human skin color is influenced by an intergenic DNA polymorphism regulating transcription of the nearby BNC2 pigmentation gene. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. 21, p. 5750–5762, 1 nov. 2014.
- VOISEY, J.; KELLY, G.; VAN DAAL, A. Agouti Signal Protein Regulation in Human Melanoma Cells. **Pigment Cell Research**, v. 16, n. 1, p. 65–71, fev. 2003.
- WAŃKOWICZ-KALIŃSKA, A. et al. Immunopolarization of CD4+ and CD8+ T Cells to Type-1-Like is Associated with Melanocyte Loss in Human Vitiligo. **Laboratory Investigation**, v. 83, n. 5, p. 683–695, maio 2003.
- WARD, L. D.; KELLIS, M. HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. D930–D934, 1 jan. 2012.
- YU, Z.; DEMETRIOU, M.; GILLEN, D. L. Genome-Wide Analysis of Gene-Gene and Gene-Environment Interactions Using Closed-Form Wald Tests. **Genetic Epidemiology**, v. 39, n. 6, p. 446–455, set. 2015.
- ZORINA-LICHTENWALTER, K. et al. A study in scarlet: MC1R as the main predictor of red hair and exemplar of the flip-flop effect. **Human Molecular Genetics**, v. 28, n. 12, p. 2093–2106, 15 jun. 2019.

- AMYERE, M. et al. KITLG Mutations Cause Familial Progressive Hyper- and Hypopigmentation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n. 6, p. 1234–1239, jun. 2011.
- ANDREWS, S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. . Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>, 2010.
- BARENBOIM, M. et al. MicroSNiPer: a web tool for prediction of SNP effects on putative microRNA targets. **Human Mutation**, v. 31, n. 11, p. 1223–1232, nov. 2010.
- BARSH, G. S. What Controls Variation in Human Skin Color? **PLoS Biology**, v. 1, n. 1, p. e27, 13 out. 2003.
- BONIFACE, K. et al. Vitiligo: Focus on Clinical Aspects, Immunopathogenesis, and Therapy. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 54, n. 1, p. 52–67, 6 fev. 2018.
- BOX, N. F. et al. Characterization of Melanocyte Stimulating Hormone Receptor Variant Alleles in Twins with Red Hair. **Human Molecular Genetics**, v. 6, n. 11, p. 1891–1897, 1 out. 1997.
- BOYLE, A. P. et al. Annotation of functional variation in personal genomes using Regulome DB. **Genome Research**, v. 22, n. 9, p. 1790–1797, 5 set. 2012.
- BRANICKI, W. et al. Model-based prediction of human hair color using DNA variants. **Human Genetics**, v. 129, n. 4, p. 443–454, 4 abr. 2011.
- CALLE, M. L. et al. mbmdr: an R package for exploring gene–gene interactions associated with binary or quantitative traits. **Bioinformatics**, v. 26, n. 17, p. 2198–2199, 1 set. 2010.
- CASTELLI, E. C. et al. HLA-E coding and 3' untranslated region variability determined by next-generation sequencing in two West-African population samples. **Human Immunology**, v. 76, n. 12, p. 945–953, dez. 2015.
- CHANG, C. C. et al. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. **GigaScience**, v. 4, n. 1, p. 7, 25 dez. 2015.
- CHEN, W. et al. A Functional p53 Responsive Polymorphism in KITLG, rs4590952, Does not Affect the Risk of Breast Cancer. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 6371, 15 maio 2015.
- DE ARAÚJO LIMA, F.; DE TOLEDO GONÇALVES, F.; FRIDMAN, C. SLC24A5 and ASIP as phenotypic predictors in Brazilian population for forensic purposes. **Legal Medicine**, v. 17, n. 4, p. 261–266, jul. 2015.
- D'MELLO, S. et al. Signaling Pathways in Melanogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 7, p. 1144, 15 jul. 2016.
- ERIKSSON, N. et al. Web-Based, Participant-Driven Studies Yield Novel Genetic Associations for Common Traits. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 6, p. e1000993, 24 jun. 2010.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564–567, 6 maio 2010.

- EZZEDINE, K. et al. Revised classification/nomenclature of vitiligo and related issues: the Vitiligo Global Issues Consensus Conference. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 25, n. 3, p. E1–E13, maio 2012.
- FERNANDEZ, L. et al. MC1R: three novel variants identified in a malignant melanoma association study in the Spanish population. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 8, p. 1659–1664, ago. 2007.
- FITZPATRICK, T. B. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. **Archives of Dermatology**, v. 124, n. 6, p. 869–871, 1 jun. 1988.
- GARCIA-BORRÓN, J. C.; SANCHEZ-LAORDEN, B. L.; JIMENEZ-CERVANTES, C. Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. **Pigment Cell Research**, v. 0, n. 0, p. 051103015727002, 3 nov. 2005.
- GAUTHIER, Y.; ANDRE, M. C.; TAÏEB, A. A Critical Appraisal of Vitiligo Etiologic Theories. Is Melanocyte Loss a Melanocytorrhagy? **Pigment Cell Research**, v. 16, n. 4, p. 322–332, ago. 2003.
- GHIRLANDO, R.; FELSENFELD, G. CTCF: making the right connections. **Genes & Development**, v. 30, n. 8, p. 881–891, 15 abr. 2016.
- HATTORI, M. et al. In-frame Val 216 -Ser 217 deletion of KIT in mild piebaldism causes aberrant secretion and SCF response. **Journal of Dermatological Science**, v. 91, n. 1, p. 35–42, jul. 2018.
- HUANG, X. et al. Dissecting dynamics and differences of selective pressures in the evolution of human pigmentation. **Biology Open**, v. 10, n. 2, 15 fev. 2021.
- IANNELLA, G. et al. Vitiligo: Pathogenesis, clinical variants and treatment approaches. **Autoimmunity Reviews**, v. 15, n. 4, p. 335–343, abr. 2016.
- JACOBS, L. C. et al. Comprehensive candidate gene study highlights UGT1A and BNC2 as new genes determining continuous skin color variation in Europeans. **Human Genetics**, v. 132, n. 2, p. 147–158, 11 fev. 2013.
- KHURRUM, H. et al. Multivariate Analysis of Factors Associated with the Koebner Phenomenon in Vitiligo: An Observational Study of 381 Patients. **Annals of Dermatology**, v. 29, n. 3, p. 302, 2017.
- KINGO, K. et al. Gene expression analysis of melanocortin system in vitiligo. **Journal of Dermatological Science**, v. 48, n. 2, p. 113–122, nov. 2007.
- KUNDU, R. V. et al. The convergence theory for vitiligo: A reappraisal. **Experimental Dermatology**, v. 28, n. 6, p. 647–655, 28 jun. 2019.
- LAITY, J. H.; LEE, B. M.; WRIGHT, P. E. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. **Current opinion in structural biology**, v. 11, n. 1, p. 39–46, fev. 2001.
- LAN, C.-C. E. et al. Association study between keratinocyte-derived growth factor gene polymorphisms and susceptibility to vitiligo vulgaris in a Taiwanese population: potential involvement of stem cell factor. **British Journal of Dermatology**, v. 160, n. 6, p. 1180–1187, jun. 2009.
- LI, H. et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. **Bioinformatics**, v. 25, n. 16, p. 2078–2079, 15 ago. 2009.
- LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics**, v. 25, n. 14, p. 1754–1760, 15 jul. 2009.

- LIU, C. et al. MirSNP, a database of polymorphisms altering miRNA target sites, identifies miRNA-related SNPs in GWAS SNPs and eQTLs. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 661, 23 dez. 2012.
- MANOLACHE, L.; BENEÀ, V. Stress in patients with alopecia areata and vitiligo. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 21, n. 7, p. 921–928, ago. 2007.
- MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet.journal**, v. 17, n. 1, p. 10, 2 maio 2011.
- MCKENNA, A. et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. **Genome Research**, v. 20, n. 9, p. 1297–1303, set. 2010.
- MCLAREN, W. et al. The Ensembl Variant Effect Predictor. **Genome Biology**, v. 17, n. 1, p. 122, 6 dez. 2016.
- MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215–1215, 1988.
- MILLIGAN, J. N.; JOLLY, E. R. Identification and Characterization of a Mef2 Transcriptional Activator in Schistosome Parasites. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 1, p. e1443, 3 jan. 2012.
- MORETTI, S. Vitiligo and Epidermal Microenvironment: Possible Involvement of Keratinocyte-Derived Cytokines. **Archives of Dermatology**, v. 138, n. 2, p. 273–274, 1 fev. 2002.
- NAGUI, N. A. et al. Assessment of gene expression levels of proopiomelanocortin (POMC) and melanocortin-1 receptor (MC1R) in vitiligo. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 58, n. 2, p. e36–e39, maio 2017.
- NEUMANN, A. et al. Predicting hair cortisol levels with hair pigmentation genes: a possible hair pigmentation bias. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 8529, 17 dez. 2017.
- OLLMANN, M. M. et al. Interaction of Agouti protein with the melanocortin 1 receptor in vitro and in vivo. **Genes & Development**, v. 12, n. 3, p. 316–330, 1 fev. 1998.
- PARRA, E. J. Human pigmentation variation: Evolution, genetic basis, and implications for public health. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 134, n. S45, p. 85–105, 2007.
- PASQUALI, E. et al. *MC1R* variants increased the risk of sporadic cutaneous melanoma in darker-pigmented Caucasians: A pooled-analysis from the M-SKIP project. **International Journal of Cancer**, p. n/a-n/a, jun. 2014.
- PEREIRA, A. L. E. **Diversidade das regiões regulatórias e exônicas dos genes ASIP, MC1R e TYRP1 determinada por sequenciamento de nova geração em amostra da população brasileira e seu envolvimento na biossíntese de melanina.** [s.l.: s.n.].
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945–59, jun. 2000.
- R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. <https://www.R-project.org>, 2020.
- SHIN, J.-G. et al. GWAS Analysis of 17,019 Korean Women Identifies the Variants Associated with Facial Pigmented Spots. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 141, n. 3, p. 555–562, mar. 2021.

- SIEWIERSKA-GÓRSKA, A. et al. Association of five SNPs with human hair colour in the Polish population. **HOMO**, v. 68, n. 2, p. 134–144, mar. 2017.
- SOUZA, J. M. DE et al. Forensic DNA Phenotyping: starting point to prediction model in Pernambuco population, Brazil. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 13, p. e262101320955, 11 out. 2021.
- STEPHENS, M.; SMITH, N. J.; DONNELLY, P. A New Statistical Method for Haplotype Reconstruction from Population Data. **The American Journal of Human Genetics**, v. 68, n. 4, p. 978–989, abr. 2001.
- SULEM, P. et al. Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. **Nature Genetics**, v. 39, n. 12, p. 1443–1452, 21 dez. 2007.
- SZÉLL, M. et al. The Arg160Trp Allele of Melanocortin-1 Receptor Gene Might Protect Against Vitiligo. **Photochemistry and Photobiology**, v. 84, n. 3, p. 565–571, maio 2008.
- THAPPA, D.; KAIMAL, S. Diet in dermatology: Revisited. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology**, v. 76, n. 2, p. 103, 2010.
- TOOSI, S.; ORLOW, S. J.; MANGA, P. Vitiligo-Inducing Phenols Activate the Unfolded Protein Response in Melanocytes Resulting in Upregulation of IL6 and IL8. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 11, p. 2601–2609, nov. 2012.
- VALVERDE, P. et al. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. **Nature Genetics**, v. 11, n. 3, p. 328–330, nov. 1995.
- VANHOUTTEGHEM, A. et al. Basonuclin 2 has a function in the multiplication of embryonic craniofacial mesenchymal cells and is orthologous to disco proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 34, p. 14432–14437, 25 ago. 2009.
- VISSER, M.; PALSTRA, R.-J.; KAYSER, M. Human skin color is influenced by an intergenic DNA polymorphism regulating transcription of the nearby BNC2 pigmentation gene. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. 21, p. 5750–5762, 1 nov. 2014.
- VOISEY, J.; KELLY, G.; VAN DAAL, A. Agouti Signal Protein Regulation in Human Melanoma Cells. **Pigment Cell Research**, v. 16, n. 1, p. 65–71, fev. 2003.
- WAŃKOWICZ-KALIŃSKA, A. et al. Immunopolarization of CD4+ and CD8+ T Cells to Type-1-Like is Associated with Melanocyte Loss in Human Vitiligo. **Laboratory Investigation**, v. 83, n. 5, p. 683–695, maio 2003.
- WARD, L. D.; KELLIS, M. HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. D930–D934, 1 jan. 2012.
- YU, Z.; DEMETRIOU, M.; GILLEN, D. L. Genome-Wide Analysis of Gene-Gene and Gene-Environment Interactions Using Closed-Form Wald Tests. **Genetic Epidemiology**, v. 39, n. 6, p. 446–455, set. 2015.
- ZORINA-LICHTENWALTER, K. et al. A study in scarlet: MC1R as the main predictor of red hair and exemplar of the flip-flop effect. **Human Molecular Genetics**, v. 28, n. 12, p. 2093–2106, 15 jun. 2019.

APÊNDICE A

Tabela A – Relação dos sítios de variação identificados no presente estudo. Estão relacionados o gene, a posição segundo a referência hg19, o nome no dbSNP (quando existente), o alelo referência e o alternativo (R/A; no caso de inserções (Ins) ou deleções (Del) são identificadas a diferença de tamanho dos alelos), a frequência do alelo menos frequente (MAF), a heterozigose observada (O(HET)), a heterozigose esperada (E(HET)), e probabilidade de adesão ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (pHWE). Linhas destacadas em negrito são aquelas com desvios significativos do equilíbrio ($p < 0,05$)

Gene	CHR:POS (hg19)	SNP	R/A	MAF	O(HET)	E(HET)	pHWE
BNC2	9:16409536	-	A/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16409614	rs142148839	A/G	0.013	0.026	0.026	1.000
BNC2	9:16409636	rs75992648	C/T	0.005	0.011	0.011	1.000
BNC2	9:16409713	rs762481770	C/A	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16409717	rs576150288	G/C	0.003	0.007	0.007	1.000
BNC2	9:16409751	rs1393090859	G/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16409757	-	G/T	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16409800	-	Ins6pb	0.033	0.065	0.063	1.000
BNC2	9:16409923	rs552894998	Del4pb	0.058	0.107	0.110	0.653
BNC2	9:16409941	-	C/A	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16410007	rs78124423	T/C	0.058	0.108	0.110	0.662
BNC2	9:16410080	rs73645971	C/G	0.006	0.013	0.013	1.000
BNC2	9:16410150	rs182717121	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16410239	rs112364259	G/A	0.004	0.009	0.009	1.000
BNC2	9:16410409	rs16934607	A/G	0.030	0.056	0.059	0.344
BNC2	9:16410461	rs1409457304	C/T	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16410504	rs73413400	C/A	0.009	0.017	0.017	1.000
BNC2	9:16410676	rs73413401	C/G	0.025	0.050	0.048	1.000
BNC2	9:16410735	rs75274781	T/C	0.005	0.011	0.011	1.000
BNC2	9:16410860	rs201125982	Del1pb	0.008	0.015	0.015	1.000
BNC2	9:16410882	rs75389628	T/G	0.127	0.216	0.222	0.530
BNC2	9:16410956	rs1443828404	C/G	0.289	0.372	0.411	0.042
BNC2	9:16411097	rs752618531	G/C	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16411106	rs77211922	G/A	0.008	0.015	0.015	1.000
BNC2	9:16411123	rs79084139	G/A	0.012	0.024	0.024	1.000
BNC2	9:16411184	rs16934614	C/T	0.036	0.067	0.069	0.446
BNC2	9:16411188	rs140898981	T/A	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16411218	rs150162944	C/T	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16411423	rs1255608021	C/G	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16411463	rs7853747	G/T	0.485	0.464	0.500	0.135
BNC2	9:16411547	rs1188066374	G/A	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16411554	rs186084782	G/T	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16411685	rs543515234	G/A	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16411758	rs138548758	C/T	0.004	0.009	0.009	1.000
BNC2	9:16411773	rs780397869	C/T	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16411775	rs1181053701	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000

BNC2	9:16411797	rs189408752	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16411873	rs549795903	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16412159	rs145195024	C/T	0.012	0.024	0.023	1.000
BNC2	9:16412204	rs76971402	G/A	0.008	0.015	0.015	1.000
BNC2	9:16412326	-	Ins1pb	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16412327	rs879679236	Del1pb	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16412349	rs947198536	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16412398	rs76837432	C/T	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16412543	rs902998490	A/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16412769	-	Ins4pb	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16412779	rs962892670	Del2pb	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16412868	rs16934619	G/T	0.036	0.067	0.069	0.446
BNC2	9:16413045	rs1037192190	A/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16413158	rs74851347	A/C	0.089	0.156	0.161	0.387
BNC2	9:16413169	rs866658150	C/A	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16413173	-	A/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16413176	rs943743	G/A	0.014	0.028	0.028	1.000
BNC2	9:16413187	-	Ins1pb	0.364	0.462	0.463	1.000
BNC2	9:16413405	rs192464317	C/T	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16413411	-	Ins2pb	0.019	0.039	0.038	1.000
BNC2	9:16413430	rs148133806	C/T	0.011	0.017	0.021	0.058
BNC2	9:16413486	rs370093476	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16413491	rs116927221	G/A	0.019	0.039	0.038	1.000
BNC2	9:16413550	rs142025309	T/G	0.003	0.006	0.006	1.000
BNC2	9:16413577	rs938990886	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16413632	rs1057383	A/T	0.478	0.459	0.499	0.093
BNC2	9:16413650	-	G/A	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16413736	rs559270710	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16413779	rs7035049	G/A	0.484	0.465	0.500	0.138
BNC2	9:16413806	rs116248780	A/T	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16413986	rs115816832	T/C	0.005	0.011	0.011	1.000
BNC2	9:16414051	rs889773087	C/A	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16414088	rs79616593	C/T	0.005	0.011	0.011	1.000
BNC2	9:16414100	rs370930810	G/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16414142	rs114279612	C/T	0.008	0.015	0.015	1.000
BNC2	9:16414182	rs144620728	G/A	0.008	0.015	0.015	1.000
BNC2	9:16414202	rs776731417	C/T	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16414204	rs73415405	T/C	0.028	0.056	0.055	1.000
BNC2	9:16414321	-	A/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16414362	rs116095199	A/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16414429	rs896304406	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16414506	rs76780579	A/G	0.025	0.050	0.049	1.000
BNC2	9:16414613	-	T/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16414756	rs16934621	T/C	0.136	0.215	0.234	0.074
BNC2	9:16414824	rs919266870	G/A	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16414848	rs892118065	G/T	0.001	0.002	0.002	1.000

BNC2	9:16414920	-	G/T	0.008	0.015	0.015	1.000
BNC2	9:16414949	rs778121633	G/A	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16414979	-	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16415036	rs2296862	G/A	0.103	0.171	0.185	0.126
BNC2	9:16415051	rs58825773	C/T	0.004	0.009	0.009	1.000
BNC2	9:16415248	rs139996582	T/A	0.003	0.006	0.006	1.000
BNC2	9:16415302	rs16934624	A/G	0.032	0.065	0.063	1.000
BNC2	9:16415333	-	Ins2pb	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16415338	rs533273807	C/T	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16415348	rs190537140	A/T	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16415357	-	Ins2pb	0.132	0.220	0.229	0.416
BNC2	9:16415385	-	C/T	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16415411	rs2296863	G/A	0.102	0.170	0.184	0.125
BNC2	9:16415438	rs951702910	C/A	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16415459	rs2296864	T/C	0.135	0.213	0.233	0.073
BNC2	9:16415552	rs572453309	T/A	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16415775	rs72714999	T/C	0.064	0.128	0.120	0.243
BNC2	9:16415806	rs78537784	C/T	0.103	0.171	0.185	0.126
BNC2	9:16415920	rs966920465	C/T	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16415966	rs145022693	T/A	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16416179	rs76414034	T/A	0.005	0.011	0.011	1.000
BNC2	9:16416207	rs1467356543	T/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16416230	rs1360434780	Del1pb	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16416620	rs146757347	T/A	0.003	0.006	0.006	1.000
BNC2	9:16416704	rs1018821130	G/A	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16416705	rs562838441	C/T	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16416735	rs951754809	C/A	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16416800	rs116186646	G/A	0.012	0.024	0.024	1.000
BNC2	9:16416863	rs533875702	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16416973	rs76814594	A/G	0.017	0.035	0.034	1.000
BNC2	9:16416995	rs1999032	T/C	0.419	0.450	0.487	0.103
BNC2	9:16417103	rs946988603	C/T	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16417135	-	Ins1pb	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16417233	-	Ins3pb	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16417304	rs76817689	A/T	0.008	0.015	0.015	1.000
BNC2	9:16417319	rs191036549	G/A	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16417339	rs145262491	C/T	0.006	0.013	0.013	1.000
BNC2	9:16417368	rs75500294	A/T	0.013	0.026	0.026	1.000
BNC2	9:16417399	rs182977194	G/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16417431	rs1927627	G/A	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16417469	rs7021128	A/G	0.016	0.032	0.032	1.000
BNC2	9:16417565	rs191206526	A/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16417588	rs976111888	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16417700	rs77739492	C/T	0.005	0.011	0.011	1.000
BNC2	9:16417701	rs953365276	C/T	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16417729	rs112023389	C/G	0.001	0.002	0.002	1.000

BNC2	9:16417836	-	G/T	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16418079	rs115289744	A/T	0.026	0.052	0.051	1.000
BNC2	9:16418161	-	Ins1pb	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16418197	rs564492793	G/A	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16418215	-	G/A	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16418276	rs115935236	G/C	0.004	0.009	0.009	1.000
BNC2	9:16418300	rs192660990	A/T	0.006	0.013	0.012	1.000
BNC2	9:16418323	rs184595339	T/A	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16418440	-	Ins10pb	0.382	0.473	0.472	1.000
BNC2	9:16418645	rs72715001	G/C	0.003	0.006	0.006	1.000
BNC2	9:16418662	-	Del2pb	0.386	0.728	0.474	0.000
BNC2	9:16418670	-	Ins26pb	0.023	0.046	0.045	1.000
BNC2	9:16418672	-	Ins24pb	0.048	0.092	0.091	1.000
BNC2	9:16418867	rs182036145	T/A	0.033	0.061	0.063	0.375
BNC2	9:16418868	-	TAT/AAT	0.033	0.061	0.063	0.376
BNC2	9:16418871	-	Del8pb	0.333	0.458	0.444	0.851
BNC2	9:16418875	rs985235387	G/A	0.023	0.046	0.045	1.000
BNC2	9:16418897	rs554944980	C/A	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16418899	rs1402959970	A/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16418900	-	Ins5pb	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16419252	rs1447094048	T/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16419362	rs1490782071	G/A	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16419367	rs35005898	C/T	0.012	0.024	0.024	1.000
BNC2	9:16419498	rs41268965	C/T	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16419519	rs117452684	A/G	0.019	0.039	0.038	1.000
BNC2	9:16419549	rs142906838	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16419554	rs144217211	T/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16419578	rs376399982	A/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16419666	rs144257997	Del1pb	0.048	0.091	0.091	1.000
BNC2	9:16419743	rs187988729	C/G	0.005	0.011	0.011	1.000
BNC2	9:16419813	rs114965377	T/C	0.003	0.007	0.007	1.000
BNC2	9:16421037	rs76144741	T/C	0.008	0.016	0.016	1.000
BNC2	9:16421086	rs74384417	A/G	0.026	0.051	0.050	1.000
BNC2	9:16421261	-	G/T	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16421269	rs1427891734	G/A	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16421347	-	Ins4pb	0.003	0.006	0.006	1.000
BNC2	9:16421413	rs115750970	C/A	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16421569	-	G/A	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16421575	-	G/A	0.250	0.500	0.375	1.000
BNC2	9:16429157	rs1052595213	Del1pb	0.005	0.009	0.009	1.000
BNC2	9:16429201	rs115040568	G/C	0.016	0.027	0.031	0.100
BNC2	9:16429234	rs535134040	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16429235	rs143993412	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16429264	rs559328793	G/A	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16429574	rs897747546	A/G	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16429762	rs190494323	A/G	0.002	0.004	0.004	1.000

BNC2	9:16429907	rs142204012	G/A	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16429920	rs114187113	A/G	0.004	0.009	0.009	1.000
BNC2	9:16429985	rs1030576218	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16430010	rs74602641	T/C	0.009	0.017	0.017	1.000
BNC2	9:16430162	rs77558509	C/G	0.088	0.159	0.161	0.769
BNC2	9:16430265	rs77623845	A/T	0.072	0.088	0.133	0.000
BNC2	9:16431230	rs9298764	A/G	0.431	0.432	0.490	0.012
BNC2	9:16431243	rs41313973	G/C	0.084	0.142	0.154	0.115
BNC2	9:16431336	rs112863482	G/T	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16431433	-	G/A	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16434790	rs141040384	A/G	0.004	0.009	0.009	1.000
BNC2	9:16434962	rs115234102	C/T	0.013	0.026	0.026	1.000
BNC2	9:16435053	rs199973613	T/C	0.003	0.007	0.007	1.000
BNC2	9:16435073	rs901777105	C/T	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16435227	rs373435498	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16435263	rs114381872	A/C	0.005	0.009	0.009	1.000
BNC2	9:16435383	rs897589295	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16435714	rs3739715	C/T	0.098	0.171	0.177	0.427
BNC2	9:16435843	rs371557826	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16435848	rs3739714	C/T	0.015	0.030	0.030	1.000
BNC2	9:16436004	-	G/C	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16436033	rs147575972	T/C	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16436212	rs141360036	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16436245	rs62540608	A/G	0.008	0.015	0.015	1.000
BNC2	9:16436260	rs755222798	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16436324	rs114596065	T/G	0.008	0.015	0.015	1.000
BNC2	9:16436375	rs116528562	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16436526	-	C/T	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16436544	rs4961490	C/A	0.005	0.011	0.011	1.000
BNC2	9:16436577	rs747837768	C/T	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16436601	-	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16436647	rs117470554	C/T	0.067	0.130	0.125	0.711
BNC2	9:16436905	rs116000575	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16436952	rs148873573	C/G	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16437256	rs77464990	A/G	0.008	0.015	0.015	1.000
BNC2	9:16437605	rs41268967	T/C	0.077	0.149	0.142	0.504
BNC2	9:16552375	rs79129468	G/C	0.020	0.039	0.039	1.000
BNC2	9:16552391	rs761731320	Del2pb	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16552392	rs1021014960	A/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16552481	rs114343899	T/C	0.016	0.033	0.032	1.000
BNC2	9:16552556	rs1040504644	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16552606	rs375045887	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16552678	rs149019822	A/G	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16552754	-	C/T	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16552829	rs115383098	A/G	0.005	0.011	0.011	1.000
BNC2	9:16552921	rs996685469	C/G	0.001	0.002	0.002	1.000

BNC2	9:16555029	rs141205501	Ins10pb	0.000	0.000	0.000	1.000
BNC2	9:16555036	rs575340057	A/G	0.000	0.000	0.000	1.000
BNC2	9:16575281	rs559834933	G/A	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16575320	rs147821667	G/A	0.008	0.015	0.015	1.000
BNC2	9:16575363	rs189269905	C/G	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16575428	rs141489723	A/G	0.004	0.009	0.009	1.000
BNC2	9:16575478	rs10733311	C/T	0.121	0.157	0.212	0.000
BNC2	9:16575479	rs180791808	T/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16575511	-	C/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16579633	rs1001240024	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16579645	rs547756959	A/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16579882	rs567132984	A/T	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16580185	rs975065412	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16580229	-	G/A	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16580300	rs532820621	C/G	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16580302	rs12003082	A/G	0.022	0.039	0.043	0.191
BNC2	9:16580311	rs115661311	C/T	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16582829	-	C/T	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16583070	rs766731850	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16583135	-	G/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16583275	rs141999744	Del2pb	0.002	0.005	0.005	1.000
BNC2	9:16664801	rs772196099	C/T	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16664817	rs185749197	G/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16664823	rs76148089	G/A	0.067	0.103	0.126	0.002
BNC2	9:16664852	-	C/G	0.009	0.019	0.019	1.000
BNC2	9:16664899	rs144897379	T/C	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16664970	rs372899272	G/C	0.006	0.011	0.011	1.000
BNC2	9:16664989	-	A/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16664993	rs181807888	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16664996	rs1334935530	A/G	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16665105	rs563306899	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16665121	rs575109329	G/C	0.003	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16665226	rs1166771221	T/G	0.500	1.000	0.500	1.000
BNC2	9:16685473	rs1038976448	G/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16685539	rs7046068	T/C	0.090	0.171	0.163	0.564
BNC2	9:16685594	rs958540505	A/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16685622	-	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16685678	rs1311002542	A/G	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16685685	rs964783418	T/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16685724	rs113805969	T/C	0.012	0.024	0.024	1.000
BNC2	9:16685890	rs148667562	G/C	0.002	0.003	0.003	1.000
BNC2	9:16699008	rs10810593	G/A	0.113	0.057	0.201	0.000
BNC2	9:16699036	rs140446724	C/A	0.004	0.008	0.008	1.000
BNC2	9:16699226	rs77077832	G/A	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16699241	-	Ins1pb	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16699251	-	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000

BNC2	9:16699287	rs10738447	C/T	0.427	0.344	0.489	0.000
BNC2	9:16699292	rs10738448	C/T	0.440	0.334	0.493	0.000
BNC2	9:16700514	rs10756782	C/A	0.000	0.000	0.000	1.000
BNC2	9:16700651	rs10756783	A/G	0.000	0.000	0.000	1.000
BNC2	9:16704677	-	Ins3pb	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16704678	rs1237856260	Del5pb	0.274	0.395	0.398	0.888
BNC2	9:16704687	rs79700988	A/T	0.015	0.031	0.030	1.000
BNC2	9:16704688	rs77632490	A/T	0.094	0.189	0.171	0.057
BNC2	9:16704689	rs75947462	Ins5pb	0.444	0.441	0.494	0.619
BNC2	9:16704690	rs1364205961	T/A	0.037	0.074	0.071	1.000
BNC2	9:16704750	rs1218545981	A/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16704756	rs1246736321	T/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16704824	rs554788336	Del2pb	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16705033	rs1012217689	T/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16705073	rs145740915	C/G	0.004	0.009	0.009	1.000
BNC2	9:16705131	rs931349954	A/T	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16705139	rs1286352709	C/A	0.018	0.037	0.036	1.000
BNC2	9:16705145	rs1229083966	C/A	0.059	0.117	0.110	0.389
BNC2	9:16705332	rs531246399	T/C	0.375	0.750	0.469	1.000
BNC2	9:16727698	rs1360285	G/A	0.067	0.130	0.125	0.711
BNC2	9:16727763	-	Del1pb	0.005	0.011	0.011	1.000
BNC2	9:16727791	rs200133531	C/T	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16727958	rs146566771	C/G	0.003	0.006	0.006	1.000
BNC2	9:16736776	rs1461146947	Del1pb	0.091	0.000	0.165	0.048
BNC2	9:16736879	rs4961739	A/T	0.000	0.000	0.000	1.000
BNC2	9:16736886	rs4961740	T/C	0.000	0.000	0.000	1.000
BNC2	9:16738269	rs7858914	G/T	0.140	0.249	0.241	0.561
BNC2	9:16738307	rs7858709	A/C	0.100	0.182	0.179	1.000
BNC2	9:16738312	rs7858712	A/G	0.105	0.184	0.188	0.617
BNC2	9:16738333	rs200906561	C/A	0.009	0.019	0.019	1.000
BNC2	9:16738338	-	Del1pb	0.100	0.192	0.180	0.295
BNC2	9:16738389	rs114612810	A/G	0.006	0.013	0.013	1.000
BNC2	9:16738403	rs76485966	A/T	0.028	0.052	0.054	0.302
BNC2	9:16738541	rs141004058	C/T	0.014	0.028	0.027	1.000
BNC2	9:16738556	rs4007684	Ins4pb	0.107	0.193	0.192	1.000
BNC2	9:16738566	rs372218804	C/T	0.015	0.031	0.030	1.000
BNC2	9:16738795	rs1970284	A/T	0.103	0.189	0.185	1.000
BNC2	9:16746626	rs62541545	G/C	0.000	0.000	0.000	1.000
BNC2	9:16746643	rs62541546	G/A	0.000	0.000	0.000	1.000
BNC2	9:16746647	rs62541547	A/G	0.000	0.000	0.000	1.000
BNC2	9:16746829	rs7043797	G/A	0.000	0.000	0.000	1.000
BNC2	9:16750932	rs13285058	C/T	0.000	0.000	0.000	1.000
BNC2	9:16761255	rs1449047834	C/A	0.000	0.000	0.000	1.000
BNC2	9:16780344	rs12344799	T/G	0.500	0.000	0.500	0.333
BNC2	9:16832059	rs114643297	T/A	0.009	0.018	0.017	1.000
BNC2	9:16832073	rs529746574	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000

BNC2	9:16832245	rs553492815	C/T	0.004	0.009	0.009	1.000
BNC2	9:16832366	rs149361633	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16832440	-	C/T	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16832502	rs148068273	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16832507	rs143601991	A/G	0.500	1.000	0.500	1.000
BNC2	9:16841841	-	Del2pb	0.000	0.000	0.000	1.000
BNC2	9:16855921	rs4327939	C/T	0.000	0.000	0.000	1.000
BNC2	9:16869397	-	C/G	0.000	0.000	0.000	1.000
BNC2	9:16870421	rs10810649	A/G	0.135	0.231	0.234	0.864
BNC2	9:16870442	rs887529762	T/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16870443	rs745911391	T/G	0.002	0.005	0.005	1.000
BNC2	9:16870472	rs71513271	G/A	0.151	0.199	0.257	0.000
BNC2	9:16870501	rs62541923	A/C	0.111	0.188	0.197	0.334
BNC2	9:16870531	rs577290942	T/C	0.003	0.007	0.007	1.000
BNC2	9:16870541	rs541195819	C/G	0.007	0.014	0.014	1.000
BNC2	9:16870573	rs542896533	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16870767	rs537221052	G/T	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16870773	rs1416731722	G/T	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16870781	rs1416460145	C/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16870810	-	Ins1pb	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16870880	rs759466747	T/C	0.004	0.009	0.009	1.000
BNC2	9:16870929	-	T/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16870933	-	Del1pb	0.127	0.224	0.222	0.783
BNC2	9:16870939	rs111567891	C/A	0.149	0.246	0.254	0.466
BNC2	9:16870964	-	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16870968	rs935738325	G/A	0.044	0.087	0.083	1.000
BNC2	9:16870987	rs542258394	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16871042	-	Ins1pb	0.016	0.032	0.032	1.000
BNC2	9:16871048	-	Ins2pb	0.009	0.017	0.017	1.000
BNC2	9:16871072	rs117810664	T/C	0.003	0.007	0.007	1.000
BNC2	9:16871086	rs79614794	T/C	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16871136	-	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16871206	rs1042959974	C/T	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16871227	-	Ins2pb	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16871241	rs1049853829	T/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16871275	-	Ins1pb	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16871296	rs1018464592	G/C	0.005	0.011	0.011	1.000
BNC2	9:16871297	rs867860260	G/C	0.003	0.007	0.007	1.000
BNC2	9:16871312	rs537333952	A/G	0.004	0.009	0.009	1.000
BNC2	9:16871321	rs552493221	C/G	0.004	0.009	0.009	1.000
BNC2	9:16871323	rs182046936	C/T	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16871352	rs570977061	A/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16871360	rs200648906	Del1pb	0.100	0.192	0.181	0.295
BNC2	9:16871362	rs534914567	C/A	0.009	0.013	0.017	0.230
BNC2	9:16871384	rs1425090456	G/T	0.016	0.033	0.032	1.000
BNC2	9:16871402	rs959757768	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000

BNC2	9:16871566	rs189946867	G/C	0.011	0.022	0.021	1.000
BNC2	9:16871580	rs540886815	G/A	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16871592	rs111583942	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16871838	rs941384594	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16872025	-	Del1pb	0.009	0.017	0.017	1.000
BNC2	9:16872026	rs1045829071	T/G	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16872042	rs148366931	T/C	0.004	0.009	0.009	1.000
BNC2	9:16872065	rs535847511	G/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16872225	rs7023739	C/A	0.006	0.013	0.013	1.000
BNC2	9:16872230	-	A/T	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16872291	rs1316461085	C/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16872323	rs11789875	A/G	0.098	0.187	0.177	0.291
BNC2	9:16872348	rs150496078	G/A	0.004	0.009	0.009	1.000
BNC2	9:16872408	rs138462149	G/A	0.010	0.020	0.019	1.000
BNC2	9:16872433	rs192427362	A/T	0.003	0.006	0.006	1.000
BNC2	9:16872434	rs7024013	T/A	0.149	0.242	0.254	0.357
BNC2	9:16872511	rs144030974	T/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16872667	rs57609240	G/T	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16872683	rs186559290	A/G	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16872689	-	C/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16872791	rs566892744	G/A	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16872921	rs116670921	A/C	0.009	0.017	0.017	1.000
BNC2	9:16872946	rs75090921	A/G	0.003	0.006	0.006	1.000
BNC2	9:16873045	rs7027849	G/A	0.150	0.253	0.255	0.855
BNC2	9:16873058	rs973100244	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16873073	-	Ins1pb	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16873078	-	Ins1pb	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16873080	rs1481199484	Del3pb	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16873087	rs951532885	C/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16873090	rs147263329	T/C	0.003	0.006	0.006	1.000
BNC2	9:16873104	rs1218715730	Del2pb	0.005	0.011	0.011	1.000
BNC2	9:16873159	-	Ins4pb	0.004	0.009	0.009	1.000
BNC2	9:16873175	rs189845990	C/A	0.011	0.022	0.021	1.000
BNC2	9:16873237	-	G/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16873318	rs1042826509	A/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16873359	rs1027919733	C/G	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16873521	rs184491375	G/C	0.002	0.004	0.004	1.000
BNC2	9:16873535	rs10962649	T/C	0.100	0.192	0.181	0.297
BNC2	9:16873551	rs10810650	T/C	0.431	0.460	0.490	0.185
BNC2	9:16873586	rs7044899	C/T	0.149	0.241	0.253	0.357
BNC2	9:16873738	-	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
BNC2	9:16873746	rs76783306	C/T	0.005	0.011	0.011	1.000
KITLG	12:88886577	-	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88886640	-	G/C	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88886763	rs188964282	C/T	0.003	0.006	0.006	1.000
KITLG	12:88886899	-	Ins2pb	0.001	0.002	0.002	1.000

KITLG	12:88886924	rs116301201	G/A	0.003	0.007	0.007	1.000
KITLG	12:88886953	rs139742659	A/T	0.002	0.004	0.004	1.000
KITLG	12:88886963	rs12344	C/T	0.099	0.176	0.178	0.792
KITLG	12:88887286	rs545485468	T/A	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88887289	rs1061981	T/C	0.362	0.447	0.462	0.543
KITLG	12:88887371	rs73437199	G/T	0.005	0.011	0.011	1.000
KITLG	12:88887724	rs11104904	T/G	0.103	0.184	0.185	1.000
KITLG	12:88887891	rs1508594	C/T	0.031	0.050	0.051	0.097
KITLG	12:88888005	rs569842723	G/A	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88888157	rs149899251	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88888159	-	Ins1pb	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88888215	rs1388789	C/T	0.101	0.166	0.181	0.113
KITLG	12:88888238	-	C/T	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88888247	rs4842625	T/C	0.347	0.437	0.453	0.471
KITLG	12:88888463	rs550090876	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88888470	rs147601058	C/A	0.004	0.009	0.009	1.000
KITLG	12:88888491	rs73199405	C/T	0.057	0.097	0.108	0.053
KITLG	12:88888753	rs148895236	C/T	0.003	0.007	0.006	1.000
KITLG	12:88888848	rs143610447	G/C	0.005	0.011	0.011	1.000
KITLG	12:88888961	rs140843522	C/T	0.008	0.015	0.015	1.000
KITLG	12:88889023	rs76482775	G/A	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88889082	rs892438794	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88889527	rs1294299905	G/A	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88889737	rs145624607	T/C	0.019	0.039	0.038	1.000
KITLG	12:88889746	-	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88889826	-	C/A	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88889898	rs190700906	C/A	0.005	0.011	0.011	1.000
KITLG	12:88889925	-	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88889977	rs1907699	A/T	0.313	0.393	0.430	0.066
KITLG	12:88889990	rs544081609	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88890138	rs963705828	G/A	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88890149	rs890148601	C/T	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88890158	rs73437200	A/G	0.003	0.006	0.006	1.000
KITLG	12:88890193	rs188394671	A/G	0.011	0.022	0.021	1.000
KITLG	12:88890361	rs536092412	T/G	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88890441	rs74316843	C/T	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88890501	-	G/T	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88890521	rs995029	C/T	0.198	0.309	0.317	0.559
KITLG	12:88890581	rs11104905	G/C	0.098	0.175	0.177	0.791
KITLG	12:88890671	rs995030	A/G	0.307	0.397	0.425	0.157
KITLG	12:88890701	-	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88890807	rs893433192	G/T	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88891074	rs117375629	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88891089	rs147512667	T/C	0.007	0.009	0.013	0.057
KITLG	12:88898641	rs11104909	T/G	0.003	0.006	0.006	1.000
KITLG	12:88898847	rs139609350	A/G	0.003	0.007	0.007	1.000

KITLG	12:88898943	rs529502672	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88899027	rs764155170	Del1pb	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88899053	rs377048625	T/A	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88899099	rs751697412	G/T	0.002	0.004	0.004	1.000
KITLG	12:88900192	rs1323216655	A/C	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88900246	rs10506953	T/G	0.105	0.173	0.188	0.124
KITLG	12:88900247	rs563040585	A/C	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88900487	rs548049377	T/A	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88900553	rs538096125	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88900746	rs41283110	G/A	0.008	0.015	0.015	1.000
KITLG	12:88900781	rs183924903	T/A	0.002	0.004	0.004	1.000
KITLG	12:88900820	rs779013839	C/T	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88900891	rs41283112	A/C	0.012	0.024	0.023	1.000
KITLG	12:88901017	rs1028586373	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88901274	rs144039437	T/C	0.002	0.004	0.004	1.000
KITLG	12:88909140	-	C/T	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88909178	rs190711063	C/A	0.013	0.022	0.026	0.070
KITLG	12:88909226	rs748222990	C/T	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88909400	rs142685415	C/T	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88909583	rs569581812	A/T	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88909600	rs971821121	C/T	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88910307	rs2291557	T/C	0.100	0.178	0.180	0.795
KITLG	12:88910321	rs182948635	T/G	0.006	0.013	0.013	1.000
KITLG	12:88912340	-	A/C	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88912366	rs145802831	A/C	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88912369	-	C/T	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88912370	-	A/C	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88912458	rs12721561	T/A	0.011	0.022	0.021	1.000
KITLG	12:88912624	rs17015782	A/G	0.009	0.017	0.017	1.000
KITLG	12:88913041	-	G/A	0.001	0.003	0.003	1.000
KITLG	12:88920839	-	G/A	0.000	0.000	0.000	1.000
KITLG	12:88926072	rs4842477	T/C	0.099	0.176	0.178	0.792
KITLG	12:88926250	rs3741457	C/T	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88926290	-	Del1pb	0.091	0.168	0.165	1.000
KITLG	12:88926302	rs201969446	A/T	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88926314	rs751944420	G/A	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88926374	-	T/G	0.002	0.005	0.004	1.000
KITLG	12:88926440	rs73439018	A/C	0.011	0.022	0.022	1.000
KITLG	12:88926465	rs140124201	T/A	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88928091	rs149372813	G/T	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88928151	rs763194236	Del1pb	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88928169	rs1344190259	T/G	0.003	0.007	0.007	1.000
KITLG	12:88928170	rs1407248285	T/G	0.024	0.048	0.047	1.000
KITLG	12:88928382	rs111418605	A/G	0.004	0.009	0.009	1.000
KITLG	12:88928486	rs534880565	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88928761	rs11835671	T/C	0.004	0.009	0.009	1.000

KITLG	12:88928786	rs139374370	A/G	0.002	0.004	0.004	1.000
KITLG	12:88928889	-	G/A	0.250	0.500	0.375	1.000
KITLG	12:88933657	-	G/A	0.000	0.000	0.000	1.000
KITLG	12:88933744	rs1447823095	G/T	0.000	0.000	0.000	1.000
KITLG	12:88939211	-	A/C	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88939222	rs189649365	G/A	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88939241	rs1046494704	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88939347	rs11834623	G/A	0.002	0.004	0.004	1.000
KITLG	12:88939421	rs1222987226	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88939459	rs373824501	C/T	0.002	0.004	0.004	1.000
KITLG	12:88939476	rs541700430	C/A	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88939491	rs150719576	C/T	0.004	0.009	0.009	1.000
KITLG	12:88939508	rs139183425	A/G	0.005	0.011	0.011	1.000
KITLG	12:88939735	rs149960723	C/A	0.003	0.007	0.007	1.000
KITLG	12:88939761	rs79578336	T/A	0.014	0.028	0.028	1.000
KITLG	12:88939779	rs369504551	T/C	0.002	0.004	0.004	1.000
KITLG	12:88939800	rs760649450	C/A	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88939860	rs191666932	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88939929	rs60641911	A/T	0.003	0.007	0.007	1.000
KITLG	12:88939986	rs890227114	C/T	0.002	0.005	0.005	1.000
KITLG	12:88940157	rs35618688	A/G	0.003	0.005	0.005	1.000
KITLG	12:88973951	rs72558018	A/C	0.003	0.007	0.007	1.000
KITLG	12:88973961	rs564788765	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88974210	rs1261137107	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88974212	rs17015901	G/A	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88974265	rs12721560	A/C	0.014	0.024	0.028	0.082
KITLG	12:88974357	rs1026371041	C/A	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88974524	rs185956035	A/G	0.002	0.004	0.004	1.000
KITLG	12:88974585	rs1241631137	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88974689	rs992995158	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88974746	rs541661857	Dellpb	0.003	0.006	0.006	1.000
KITLG	12:88974748	rs1362474567	Dellpb	0.002	0.004	0.004	1.000
KITLG	12:88974754	rs11104957	A/T	0.011	0.013	0.021	0.001
KITLG	12:88974755	rs869408	A/T	0.311	0.409	0.428	0.330
KITLG	12:88974800	rs944756197	G/A	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88974953	rs534927858	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88975347	rs1159721813	T/G	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88975592	rs1703073	A/G	0.011	0.022	0.021	1.000
KITLG	12:88975730	-	Dellpb	0.003	0.007	0.007	1.000
KITLG	12:88975838	rs952267075	G/C	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88975849	rs143076464	G/T	0.003	0.007	0.007	1.000
KITLG	12:88975945	rs867880324	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88976095	-	T/A	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88976099	rs565696039	G/T	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88976104	-	T/C	0.010	0.020	0.020	1.000
KITLG	12:88976106	-	T/C	0.002	0.004	0.004	1.000

KITLG	12:88976107	-	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88976111	rs188939661	C/T	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88976125	rs548532374	A/T	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88976153	rs114429626	T/G	0.004	0.009	0.009	1.000
KITLG	12:88976409	rs533890191	Del6pb	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88976546	rs1158517652	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88976576	-	Ins4pb	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88977027	rs865849477	G/C	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88977118	rs148639959	T/C	0.013	0.026	0.026	1.000
KITLG	12:88977170	rs1235494967	G/T	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88977263	rs147776132	C/G	0.001	0.002	0.002	1.000
KITLG	12:88977348	rs7962739	T/G	0.068	0.123	0.127	0.459
MC1R	16:89981386	rs573221057	G/T	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89981396	rs62636532	C/T	0.047	0.090	0.089	1.000
MC1R	16:89981539	rs560220034	C/G	0.002	0.004	0.004	1.000
MC1R	16:89981580	rs527263876	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89981583	rs552485583	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89981598	rs564221089	C/T	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89981885	rs747154815	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89981892	rs138460402	C/G	0.008	0.015	0.015	1.000
MC1R	16:89981920	rs117991811	A/G	0.018	0.037	0.036	1.000
MC1R	16:89981960	rs62052212	A/G	0.051	0.097	0.096	1.000
MC1R	16:89981964	rs953179496	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89981977	rs142993411	C/G	0.002	0.004	0.004	1.000
MC1R	16:89982079	rs143512305	Del1pb	0.036	0.067	0.069	0.448
MC1R	16:89982267	rs185977658	T/C	0.004	0.009	0.009	1.000
MC1R	16:89982272	rs3212345	T/C	0.428	0.471	0.490	0.447
MC1R	16:89982280	rs561637902	G/C	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89982294	rs80309081	A/G	0.004	0.009	0.009	1.000
MC1R	16:89982358	rs3212346	A/G	0.157	0.253	0.265	0.378
MC1R	16:89982437	rs113769342	T/C	0.008	0.015	0.015	1.000
MC1R	16:89982463	rs969309607	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89982507	rs903049259	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89982545	rs114725530	T/C	0.015	0.026	0.030	0.095
MC1R	16:89982561	-	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89982647	rs369393898	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89982737	rs190787677	G/A	0.002	0.004	0.004	1.000
MC1R	16:89982773	rs3212347	A/G	0.009	0.017	0.017	1.000
MC1R	16:89982882	-	Ins1pb	0.002	0.004	0.004	1.000
MC1R	16:89982913	rs183340372	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89982920	rs3212348	T/C	0.011	0.017	0.022	0.048
MC1R	16:89983045	-	Del1pb	0.038	0.019	0.074	0.000
MC1R	16:89983095	rs1425799231	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89983115	rs140585935	A/G	0.009	0.017	0.017	1.000
MC1R	16:89983149	rs144459979	A/G	0.002	0.005	0.005	1.000
MC1R	16:89983231	rs72813445	A/G	0.177	0.188	0.291	0.000

MC1R	16:89983240	rs1282224159	A/G	0.002	0.005	0.005	1.000
MC1R	16:89983274	-	T/A	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89983276	rs11641201	C/T	0.163	0.243	0.273	0.069
MC1R	16:89983317	-	Ins5pb	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89983330	rs112573335	T/C	0.010	0.015	0.019	0.034
MC1R	16:89983538	rs551908029	A/G	0.010	0.004	0.019	0.000
MC1R	16:89983630	rs3212378	A/G	0.008	0.015	0.015	1.000
MC1R	16:89983634	rs928484921	C/G	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89983696	-	A/T	0.042	0.085	0.081	1.000
MC1R	16:89983778	-	A/C	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89983809	rs534315973	T/G	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89983837	rs182927424	G/C	0.008	0.015	0.015	1.000
MC1R	16:89983868	rs868041698	A/G	0.002	0.004	0.004	1.000
MC1R	16:89983880	-	C/T	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89983899	rs557090489	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89984087	-	Ins2pb	0.401	0.470	0.480	0.630
MC1R	16:89984143	rs3212353	A/G	0.011	0.022	0.021	1.000
MC1R	16:89984177	-	Ins1pb	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89984296	rs546542914	G/C	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89984321	rs373998976	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89984370	rs3212354	T/C	0.432	0.469	0.491	0.343
MC1R	16:89984378	rs3212355	T/C	0.008	0.015	0.015	1.000
MC1R	16:89984404	rs569735993	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89984408	rs946936966	T/G	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89984416	rs536447537	T/C	0.003	0.006	0.006	1.000
MC1R	16:89984497	rs3212356	G/C	0.003	0.006	0.006	1.000
MC1R	16:89984520	rs185562793	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89984544	-	Ins1pb	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89984575	rs58664942	A/G	0.009	0.017	0.017	1.000
MC1R	16:89984604	rs3212357	T/C	0.420	0.449	0.487	0.104
MC1R	16:89984620	rs1029465450	A/G	0.002	0.004	0.004	1.000
MC1R	16:89984739	rs3212358	A/G	0.425	0.466	0.489	0.342
MC1R	16:89984908	rs961265758	G/T	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89985131	rs3212379	T/C	0.002	0.004	0.004	1.000
MC1R	16:89985163	rs553184868	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89985177	rs3212359	T/C	0.461	0.500	0.497	0.926
MC1R	16:89985217	rs3212360	T/C	0.007	0.013	0.013	1.000
MC1R	16:89985218	-	G/C	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89985222	rs3212361	A/G	0.300	0.421	0.420	1.000
MC1R	16:89985311	rs1323815134	G/A	0.011	0.022	0.021	1.000
MC1R	16:89985329	rs540650422	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89985344	rs3212362	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89985441	rs3212363	T/A	0.333	0.448	0.444	0.917
MC1R	16:89985557	rs577907985	C/A	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89985692	-	Ins17pb	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89985750	rs796296176	Del1pb	0.002	0.004	0.004	1.000

MC1R	16:89985799	rs61996344	C/T	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89985806	rs371156858	T/G	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89985832	rs756191158	T/A	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89985844	rs1805005	T/G	0.095	0.163	0.172	0.278
MC1R	16:89985918	rs1805006	A/C	0.010	0.020	0.019	1.000
MC1R	16:89985940	rs2228479	A/G	0.040	0.081	0.077	1.000
MC1R	16:89985954	rs780284801	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89985984	rs3212364	A/G	0.011	0.022	0.022	1.000
MC1R	16:89986030	rs201192930	A/G	0.004	0.009	0.009	1.000
MC1R	16:89986065	rs201429598	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89986091	rs11547464	A/G	0.005	0.011	0.011	1.000
MC1R	16:89986111	rs374423188	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89986117	rs1805007	T/C	0.022	0.030	0.043	0.001
MC1R	16:89986119	rs201827012	G/C	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89986130	rs1110400	C/T	0.003	0.007	0.007	1.000
MC1R	16:89986144	rs1805008	T/C	0.025	0.050	0.049	1.000
MC1R	16:89986154	rs885479	A/G	0.074	0.113	0.137	0.002
MC1R	16:89986165	-	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89986178	rs373224783	G/C	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89986197	rs145781072	A/G	0.002	0.004	0.004	1.000
MC1R	16:89986202	rs555179612	Dellpb	0.003	0.007	0.007	1.000
MC1R	16:89986206	rs371055548	T/C	0.003	0.007	0.007	1.000
MC1R	16:89986243	rs527673999	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89986252	rs3212366	C/T	0.007	0.013	0.013	1.000
MC1R	16:89986303	rs200000734	T/C	0.002	0.004	0.004	1.000
MC1R	16:89986333	rs372152373	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89986365	rs146544450	A/G	0.005	0.011	0.011	1.000
MC1R	16:89986458	rs181269865	T/C	0.003	0.006	0.006	1.000
MC1R	16:89986481	rs12102534	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89986508	rs141177570	G/A	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89986527	rs1291175436	G/C	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89986546	rs1805009	C/G	0.018	0.037	0.036	1.000
MC1R	16:89986566	rs3212367	T/C	0.010	0.015	0.019	0.059
MC1R	16:89986608	rs2228478	G/A	0.161	0.257	0.270	0.302
MC1R	16:89986614	rs151318945	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89986632	rs3212368	A/G	0.030	0.060	0.059	1.000
MC1R	16:89986731	-	Ins2pb	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89986760	rs3212369	G/A	0.240	0.360	0.365	0.799
MC1R	16:89986777	rs3212370	A/C	0.030	0.060	0.059	1.000
MC1R	16:89986926	rs973514189	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89986954	rs577746924	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89986957	rs143513600	G/A	0.004	0.009	0.009	1.000
MC1R	16:89987000	rs764002798	G/C	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89987053	rs1429568335	C/T	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89987165	rs558280878	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
MC1R	16:89987201	rs3212371	G/A	0.131	0.223	0.228	0.681

MC1R	16:89987381	rs559928561	A/C	0.001	0.002	0.002	1.000
ASIP	20:32845249	rs6058014	C/T	0.117	0.194	0.206	0.254
ASIP	20:32845299	-	A/C	0.003	0.007	0.007	1.000
ASIP	20:32845307	-	T/C	0.002	0.005	0.005	1.000
ASIP	20:32845321	-	A/C	0.002	0.005	0.005	1.000
ASIP	20:32845373	-	Ins3pb	0.001	0.002	0.002	1.000
ASIP	20:32845388	-	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
ASIP	20:32845412	rs1051864632	G/A	0.001	0.002	0.002	1.000
ASIP	20:32845470	rs1007582721	G/A	0.001	0.002	0.002	1.000
ASIP	20:32845487	rs567038929	T/A	0.002	0.004	0.004	1.000
ASIP	20:32845597	-	G/A	0.001	0.002	0.002	1.000
ASIP	20:32845624	rs73610827	T/C	0.010	0.020	0.019	1.000
ASIP	20:32845949	-	Ins1pb	0.065	0.129	0.121	0.242
ASIP	20:32846036	rs2378132	G/A	0.218	0.342	0.340	0.644
ASIP	20:32846152	-	Del1pb	0.093	0.181	0.169	0.347
ASIP	20:32846415	rs564046521	C/T	0.001	0.002	0.002	1.000
ASIP	20:32846491	rs1336922136	Del12pb	0.007	0.008	0.014	0.014
ASIP	20:32846496	rs1250992566	Del24pb	0.009	0.018	0.017	1.000
ASIP	20:32846498	rs55669357	T/C	0.074	0.118	0.137	0.023
ASIP	20:32846501	-	Ins1pb	0.056	0.087	0.105	0.012
ASIP	20:32846506	rs56017072	Del27pb	0.022	0.045	0.044	1.000
ASIP	20:32846508	rs1230708003	G/A	0.003	0.000	0.005	0.001
ASIP	20:32846559	-	Ins2pb	0.004	0.003	0.008	0.004
ASIP	20:32846566	rs1468055782	T/G	0.009	0.011	0.017	0.021
ASIP	20:32846584	-	Ins1pb	0.003	0.006	0.006	1.000
ASIP	20:32846585	rs1339759187	Ins2pb	0.086	0.130	0.158	0.005
ASIP	20:32846594	rs1373430519	C/T	0.001	0.003	0.003	1.000
ASIP	20:32846619	-	Ins3pb	0.004	0.008	0.008	1.000
ASIP	20:32846654	-	Ins5pb	0.008	0.016	0.016	1.000
ASIP	20:32846676	-	Ins1pb	0.015	0.030	0.029	1.000
ASIP	20:32846679	-	Ins2pb	0.001	0.003	0.003	1.000
ASIP	20:32846833	rs183932635	A/C	0.001	0.002	0.002	1.000
ASIP	20:32846855	rs1395681529	A/T	0.004	0.009	0.009	1.000
ASIP	20:32846997	rs35455305	Del2pb	0.219	0.292	0.342	0.003
ASIP	20:32847135	rs148577906	G/A	0.029	0.053	0.056	0.884
ASIP	20:32847327	-	Ins2pb	0.001	0.002	0.002	1.000
ASIP	20:32847445	rs6058015	A/G	0.217	0.291	0.340	0.002
ASIP	20:32847555	-	Ins1pb	0.048	0.096	0.092	0.615
ASIP	20:32847710	rs577252907	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
ASIP	20:32847711	rs6059743	G/A	0.434	0.465	0.491	0.257
ASIP	20:32847767	rs819135	A/G	0.443	0.483	0.493	0.638
ASIP	20:32847803	rs118130379	T/C	0.015	0.030	0.030	1.000
ASIP	20:32848108	rs563086197	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
ASIP	20:32848120	rs4987044	C/T	0.001	0.002	0.002	1.000
ASIP	20:32848218	rs2296151	C/T	0.002	0.004	0.004	1.000
ASIP	20:32848294	rs146541846	T/C	0.008	0.015	0.015	1.000

ASIP	20:32848357	rs184672797	G/C	0.001	0.002	0.002	1.000
ASIP	20:32848447	rs147910525	C/T	0.003	0.007	0.007	1.000
ASIP	20:32848453	rs1488313938	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
ASIP	20:32849416	rs1205312	A/G	0.000	0.000	0.000	1.000
ASIP	20:32850375	rs2424984	C/T	0.220	0.264	0.344	0.000
ASIP	20:32850376	rs150864747	A/G	0.001	0.002	0.002	1.000
ASIP	20:32850403	rs61409894	A/G	0.025	0.051	0.049	1.000
ASIP	20:32850809	rs77106176	G/A	0.018	0.037	0.036	1.000
ASIP	20:32856531	rs1430634377	A/C	0.001	0.002	0.002	1.000
ASIP	20:32856538	-	Ins1pb	0.021	0.042	0.041	1.000
ASIP	20:32856564	rs140598557	Del1pb	0.098	0.170	0.177	0.420
ASIP	20:32856585	-	G/A	0.003	0.007	0.007	1.000
ASIP	20:32856620	-	G/T	0.017	0.033	0.033	1.000
ASIP	20:32856622	-	G/T	0.006	0.011	0.011	1.000
ASIP	20:32856625	-	G/A	0.002	0.004	0.004	1.000
ASIP	20:32856626	-	G/T	0.009	0.018	0.017	1.000
ASIP	20:32856638	-	G/T	0.010	0.020	0.020	1.000
ASIP	20:32856836	rs780888249	T/C	0.001	0.002	0.002	1.000
ASIP	20:32856838	rs36093428	A/C	0.015	0.026	0.030	0.096
ASIP	20:32856841	rs1218863460	G/A	0.001	0.002	0.002	1.000
ASIP	20:32856998	rs6058017	G/A	0.209	0.293	0.331	0.016

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da pesquisa: Sequenciamento de nova geração de genes envolvidos na biossíntese de melanina em amostra da população brasileira

Pesquisador responsável: Prof. Dr. Celso Teixeira Mendes Junior

Endereço para contato: Av. Bandeirantes, 3900; CEP: 14040-901, Ribeirão Preto - SP
Departamento de Química, FFCLRP-USP Telefone: (16) 3602-0417

Prezado (a) doador (a),

A pigmentação humana é determinada pela presença de um pigmento denominado melanina. Proteínas produzidas por mais de 120 genes estão envolvidas na produção de melanina em células específicas e na distribuição desta melanina para outras células de nosso organismo. Variações normais nos genes envolvidos nestes processos levam aos diferentes tons de cor de cabelos, olhos e pele que vemos nas pessoas.

Nesse estudo, faremos a análise da sequência de algumas regiões do DNA que podem estar relacionadas à determinação das características físicas dos brasileiros, como a cor de olhos, pele e cabelos, tipo de cabelos e presença de sardas. Com isso buscamos identificar as variações (polimorfismos do DNA) e os mecanismos responsáveis pela determinação da cor das pessoas. Embora o conhecimento a ser produzido neste estudo não lhe trará benefícios diretos, os resultados desta pesquisa podem trazer grande contribuição para o desenvolvimento de terapias para tratar problemas de pele.

Para a realização desta pesquisa não haverá a necessidade de procedimentos que possam comprometer sua saúde. Caso concorde em participar da pesquisa, serão coletados cerca de 10 mL de seu sangue (aproximadamente uma colher de sopa). A coleta será feita por um profissional habilitado e altamente capacitado nessa atividade. Serão ainda obtidas imagens fotográficas de regiões pequenas e bem delimitadas de seu corpo (olho, raiz dos cabelos e regiões do braço não-expostas ao sol), as quais não permitirão sua identificação, mantendo, assim, o caráter confidencial da informação. Adicionalmente, um colorímetro portátil, equipamento frequentemente usado em pesquisas dermatológicas, será usado para definir a cor de sua pele e dos seus cabelos com maior precisão, em um procedimento rápido indolor e livre de qualquer desconforto. Em todo este procedimento não existem riscos previsíveis além de um pequeno desconforto durante a coleta de sangue.

Os seguintes aspectos lhe são esclarecidos para que você decida sobre sua participação voluntária:

- a) Esta pesquisa não lhe trará qualquer custo. Visando lhe proporcionar maior conforto e comodidade, a coleta será realizada uma única vez em data e local a combinar.
- b) Não haverá nenhuma forma de reembolso em dinheiro, uma vez que sua participação na pesquisa não proporcionará nenhum gasto.
- c) Você terá a garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa. Isso poderá ser feito a qualquer momento. Nós temos o compromisso de proporcionar informações atualizadas durante o estudo, ainda que esta possa influenciar a sua vontade de continuar autorizando a sua participação.
- d) Você terá a liberdade de retirar o seu consentimento a qualquer momento sem que isso lhe traga prejuízo algum ou qualquer tipo de constrangimento.

- e) Você terá garantida a segurança de que não será identificado e que será mantida a sua privacidade e o caráter confidencial das informações concedidas.
- f) A amostra biológica será coletada com total responsabilidade e custo dos pesquisadores. A coleta de seu sangue será única e feita com material descartável, sendo necessário apenas um pequeno furo com agulha em veia do seu braço, o que pode, de fato, ser um procedimento desconfortável, mas apenas pela “picada” com a agulha.
- g) O sangue doado por você não será empregado na realização de pesquisas de outra natureza sem sua autorização.
- h) Será aplicado um questionário visando uma melhor compreensão de sua origem e características físicas. Toda informação obtida será mantida em sigilo.
- i) Os resultados da pesquisa serão apresentados em reuniões científicas (simpósios e congressos) e serão publicados em revistas científicas especializadas.

Assinatura do pesquisador responsável

Eu, _____, RG n o _____, residente na _____ n° _____, cidade de _____, telefone _____ abaixo assinado, tendo recebido as informações acima e ciente dos meus direitos, concordo em participar da pesquisa por livre e espontânea vontade. Declaro ainda que recebi uma cópia deste termo de consentimento assinada pelo pesquisador responsável.

Tendo ciência do exposto acima, assino abaixo.

Ribeirão Preto, ___ de _____ de 20 ___.

Assinatura do doador

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA ARMAZENAMENTO DE MATERIAL BIOLÓGICO

Nome da pesquisa: Sequenciamento de nova geração de genes envolvidos na biossíntese de melanina em amostra da população brasileira.

Pesquisador responsável: Prof. Dr. Celso Teixeira Mendes Junior

Endereço para contato: Av. Bandeirantes, 3900; CEP: 14040-901, Ribeirão Preto - SP
Departamento de Química, FFCLRP-USP Telefone: (16) 3602-0417

Prezado (a) doador (a),

Como você concordou em participar da pesquisa “Sequenciamento de nova geração das regiões regulatórias de dez genes envolvidos na biossíntese de melanina em amostra da população brasileira”, solicito agora uma nova autorização para que possamos armazenar parte do material biológico processado, para uso em pesquisas futuras desta mesma natureza, isto é, envolvendo a análise de outros genes e marcadores genéticos (polimorfismos do DNA).

Caso concorde, seu material biológico será armazenado sob minha responsabilidade em um freezer localizado em meu laboratório, compondo Biorrepositório devidamente registrado junto ao Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição. Este Biorrepositório será futuramente transformado em Biobanco, conforme determinação do Conselho Nacional em Saúde. Os seguintes aspectos lhe serão esclarecidos para que você decida sobre esta autorização voluntária:

- a) Você tem a liberdade de decidir se seu material será armazenado.
- b) Você terá a liberdade de retirar o seu consentimento a qualquer momento sem que isso lhe traga prejuízo algum ou qualquer tipo de constrangimento.
- c) O armazenamento não lhe trará qualquer custo. A amostra biológica será armazenada com total responsabilidade e custo dos pesquisadores.
- d) Toda nova pesquisa a ser realizada com o material armazenado será submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).
- e) Caso deseje, você tem o direito de ser consultado sempre que houver intenção de uso de seu material biológico em pesquisas futuras, para que eu autorize ou não autorize sua nova utilização.
- f) Você terá a garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca do seu material biológico, condições de armazenamento e sua utilização em outros projetos de pesquisa. Isso poderá ser feito a qualquer momento. Nós temos o compromisso de proporcionar informações atualizadas durante o estudo, ainda que esta possa influenciar a sua vontade de continuar autorizando a sua participação.
- g) Você terá garantida a segurança de que não será identificado e que será mantida a sua privacidade e o caráter confidencial das informações concedidas. Toda informação obtida será mantida em sigilo.
- h) Você tem o direito de ser informado sobre eventual perda ou destruição de suas amostras biológicas, bem como sobre eventual encerramento do Biorrepositório.

142

- i) Os resultados de novas pesquisas serão apresentados em reuniões científicas (simpósios e congressos) e serão publicados em revistas científicas especializadas.

Assinatura do pesquisador responsável

Eu, _____, RG no _____,
residente na _____ nº _____,
cidade de _____, telefone _____
abaixo assinado, tendo recebido as informações acima e ciente dos meus direitos, concordo com o armazenamento de meu material biológico por livre e espontânea vontade.

Declaro ainda que:

- desejo exercer o direito de ser consultado sempre que houver intenção de uso de meu material biológico em pesquisas futuras.
- dispenso o direito de ser consultado quando houver intenção de uso de meu material biológico em pesquisas futuras, autorizando automaticamente seu uso em estudos desta mesma natureza, isto é, envolvendo a análise de outros genes e marcadores genéticos (polimorfismos do DNA).

Atesto que recebi uma cópia deste termo de consentimento assinada pelo pesquisador responsável. Tendo ciência do exposto acima, assino abaixo.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 20__.

Assinatura do doador

ANEXO C - PROTOCOLO DE ANÁLISE LABORATORIAL (HALOPLEX) PARA SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO



Laboratório de Pesquisas Forenses e Genômicas
Departamento de Química – FFCLRP/USP

Protocolo de análise laboratorial (HaloPlex) para sequenciamento de nova geração

Oliveira MLG, Marcorin L, Pereira ALE, Debortoli G,

Fracasso NCA, Silva GV, Mendes-Junior CT

Versa o 1 – Outubro de 2016

Adaptado de: Oliveira MLG. Sequenciamento de nova geração do gene IRF4: identificação da variação associada a fenótipos de pigmentação na população brasileira. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2016. 151p.

1. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	2
2. QUANTIFICAÇÃO E VERIFICAÇÃO DA QUALIDADE DO DNA	2
3. PREPARO DOS REAGENTES PARA ENRIQUECIMENTO DE ALVO	3
4. ENRIQUECIMENTO DO ALVO E PREPARO DA BIBLIOTECA	3
4.1. Digestão e hibridação do DNA	4
4.2. Captura, ligação, eluição e PCR	5
4.3. Purificação da biblioteca	6
5. CONTROLE DE QUALIDADE E QUANTIFICAÇÃO DA BIBLIOTECA	6
6. SEQUENCIAMENTO	7
7. REFERÊNCIAS	8

1. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

Após a coleta, a extração do DNA deve ser realizada a partir das amostras de sangue total utilizando o protocolo de *salting-out* (MILLER; DYKES; POLESKY, 1988a) com modificações.

O sangue coletado e mantido em tubo *Vacutainer*® com EDTA é transferido para um tubo *falcon* graduado de 50mL, ao qual é adicionado tampão de Lise I gelado (Tris-HCl 0,01M pH 7,5; Sacarose 0,3M; MgCl₂ 0,005M; Triton 1%; H₂O qsp) até completar o volume de 45mL. De forma a lisar as hemácias, o conteúdo é delicadamente misturado por inversão e centrifugado durante 15 minutos a 5000rpm em centrífuga 5430 R (Eppendorf AG). A extração prossegue com o botão de células obtido, o qual deve ser ressuspenso em 4,5mL de tampão de Lise II (NaCl 0,075M, EDTA 0,024M, H₂O qsp, pH 8), 125µL de SDS 10% e 1,1mL de perclorato de sódio (5M) e vortexado a temperatura ambiente por 10 segundos para rompimento dos glóbulos brancos. Para lisar as proteínas, são adicionados 2mL de NaCl 6M (saturado) ao tubo *falcon*, que é vortexado a temperatura ambiente por 15 segundos. A seguir, o conteúdo é centrifugado por 15 minutos a 5000rpm em centrífuga 5430 R (Eppendorf AG). O sobrenadante é transferido para um novo tubo *falcon* de 50mL, ao qual é adicionado 5mL de isopropanol absoluto a temperatura ambiente (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) e homogeneizado por inversão até que o DNA se separe e fique suspenso na solução.

Finalmente, o DNA é retirado com o auxílio de uma pipeta estéril e transferido para um microtubo de 1,5mL contendo 1mL de etanol (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) 70% gelado. O microtubo é então centrifugado por 5 minutos a 5000rpm em centrífuga MiniSpin Plus (Eppendorf AG), e o sobrenadante descartado a seguir. O microtubo é deixado em centrífuga a vácuo (Concentrator plus, Eppendorf AG) durante 5min para remoção completa do etanol. Por fim, o DNA aderido ao microtubo é dissolvido em 200µL de água MilliQ, mantido na geladeira por 1 semana e posteriormente armazenado a -20°C no banco de amostras do laboratório.

2. QUANTIFICAÇÃO E VERIFICAÇÃO DA QUALIDADE DO DNA

O *NanoDrop*® ND-1000 (*Thermo Fisher Scientific Inc.*) é utilizado para avaliar o grau de contaminação do material genômico por proteínas e para estimativa inicial da concentração de DNA. É importante que as amostras possuam uma razão OD 260/280

variando de 1,8 a 2,0. Além disso, é realizada a eletroforese em gel de agarose, a fim de verificar o grau de degradação do material, considerando como indicativo de degradação qualquer banda abaixo de 2,5kb (*Agilent Technologies*).

Na sequência, as amostras são quantificadas através de fluorescência por meio do *Qubit™ dsDNA BR Assay (Life Technologies)*. Para isso, o DNA genômico é diluído em água MilliQ em uma proporção de 1:10. Inicialmente, é preciso fornecer ao instrumento uma curva padrão. Para tanto, o corante (fluoróforo) para dsDNA é diluído no *buffer* do Qubit (1:200) e 10µL dos padrões (1 e 2) são diluídos em 200µL da solução anterior. Realizada a leitura dos padrões, uma curva padrão é estabelecida, a partir da qual é calculada a concentração da amostra original, com base no volume adicionado para leitura.

Conhecendo agora a concentração das amostras, essas são diluídas à concentração de 5ng/µL, no intuito de normalizar as amostras a uma concentração compatível para a montagem das bibliotecas de fragmentos.

3. PREPARO DOS REAGENTES PARA ENRIQUECIMENTO DE ALVO

Regiões alvo, incluindo a sequência promotora, CDS (*Coding DNA Sequence*), 5'UTR e 3'UTR de genes humanos, além de outras regiões de interesse, foram submetidas ao ensaio *in silico* de desenho de sondas para captura de DNA alvo utilizando o aplicativo *SureDesign* da *Agilent Technologies* (<https://earray.chem.agilent.com/suredesign/home.htm>). Para desenho das sondas, o *SureDesign* tomou como referência as coordenadas dos genes em questão junto ao *release* hg19/GRCh37 do genoma humano. Visando a cobertura de 284.367pb, um total de 12.131 sondas foi desenhado, abrangendo 99,63% de tal extensão. Devido à distribuição dos sítios de restrição utilizados posteriormente no preparo das bibliotecas, as sondas desenhadas capturam uma região de 488.658pb, que garante o sequenciamento parcial dos introns flanqueadores dos exons alvo.

4. ENRIQUECIMENTO DO ALVO E PREPARO DA BIBLIOTECA

Após a quantificação, cada amostra de DNA é processada individualmente, gerando uma biblioteca contendo todos os amplicons. A captura das regiões-alvo utiliza reagentes do kit de enriquecimento de alvo customizado *HaloPlex (Agilent Technologies)* e segue o protocolo sugerido pelo fabricante. Resumidamente, o protocolo consiste dos seguintes

passos: 1) digestão do DNA genômico com enzimas de restrição; 2) hibridação dos fragmentos de DNA a sondas biotinizadas cujos finais são complementares a esses fragmentos-alvo (durante esse passo os fragmentos são circularizados e índices, que irão identificar cada indivíduo durante o sequenciamento, são adicionados); 3) captura dos fragmentos-alvo utilizando *beads* magnéticas recobertas por estreptavidina; 4) ligação dos fragmentos circularizados; 5) amplificação por PCR dos fragmentos-alvo capturados para montagem da biblioteca.

4.1. Digestão e hibridação do DNA

A digestão das amostras é feita conforme indicações do fabricante, com algumas modificações (*HaloPlex Target Enrichment System For Illumina Sequencing, Agilent Technologies, 2013*). Um total de 225ng (45µL de uma solução 5ng/µL) de DNA genômico de cada amostra e do *Enrichment Control DNA* (ECD), no volume total de 45µL, é separado e reservado em gelo.

Digestão: Para o mix de restrição, preparado para lotes de 12 amostras (11 amostras de DNA genômico e outra de ECD), são misturados 476µL de *RE buffer* e 11,9µL de BSA e esse conteúdo é distribuído em 8 tubos. Em cada um dos 8 tubos é adicionado um par de enzimas de restrição (7µL de cada). Cada amostra é digerida pelos 8 pares de enzima separadamente. Para isso, cada amostra é distribuída em 8 tubos (5µL por tubo) onde são adicionados 5µL dos mixes contendo as enzimas de restrição resultando, para um total de 12 amostras, em 96 tubos de digestão que são incubados no termociclador (*SureCycler 8800 Thermal Cycler, Agilent Technologies*) a 37°C por 30 minutos.

Hibridação: Para o mix de hibridação são misturados 650µL da *Hybridization Solution* e 260µL das sondas *Haloplex* em um tubo e 70µL dessa solução é distribuída por amostra. Adicionalmente, são diluídos nessa solução 10µL de um dos índices disponíveis em cada um dos doze tubos (índices diferentes são utilizados para cada amostra, permitindo sua identificação após a mistura das amostras para o sequenciamento).

O DNA digerido de cada amostra (80µL somando todos os 8 tubos de digestão) é então transferido para os microtubos contendo o mix de hibridação (70µL) e seus índices correspondentes (10µL). Essas soluções são incubadas a 54°C durante 16 horas. O tempo de duração da hibridação é determinado de acordo com a densidade de sondas do ensaio. Segundo instruções do fabricante (*Haloplex, Agilent Technologies*), ensaios que atingem

cobertura de entre 500kb - 5Mb exigem 16 horas de hibridação, enquanto que ensaios com cobertura de entre 1-500kb exigem apenas 3 horas de hibridação. Apesar de o presente ensaio estar voltado para a cobertura de apenas 488,7kb, os ensaios iniciais demonstraram a necessidade de um tempo de hibridação de 16 horas.

4.2. Captura, ligação, eluição e PCR

Captura: A captura dos fragmentos hibridados é feita com o uso de 520 μ L de *beads* magnéticas recobertas por estreptavidina. Com o auxílio de uma placa magnética (*DynaMag™-2 Magnet, Life Technologies*), o sobrenadante da solução de *beads* é removido e substituído por 520 μ L de *Capture Solution*. Deste conteúdo, 40 μ L é adicionado a cada solução de DNA hibridizado (160 μ L) e após 15min de incubação em temperatura ambiente, os tubos contendo as soluções são colocados junto a uma placa magnética de 96 poços (*Agencourt SPRIPlate 96R, Beckman Coulter*) para a remoção do sobrenadante. A seguir, adiciona-se 100 μ L de *Wash Solution* por amostra, e essa solução é incubada no termociclador a 46°C por 10min. Após esse período, o sobrenadante é novamente removido.

Ligação: Procedendo com a ligação e circularização dos fragmentos alvo, adiciona-se 617,5 μ L de *Ligation Solution* e 32,5 μ L de DNA ligase e distribuí-se 50 μ L dessa solução a cada amostra hibridada e capturada. A solução é então incubada a 55°C por 10min.

Eluição: A seguir, lavamos o conteúdo de DNA ligado com 100 μ L de *SSC buffer*, retirando o sobrenadante ao final da etapa com o auxílio da placa magnética. Para eluir o DNA das *beads* adicionamos 25 μ L de NaOH (50mM) e encubamos em temperatura ambiente por 1min..

PCR: Com o auxílio da placa magnética, coletamos o DNA eluído num total de 20 μ L por amostra e o transferimos para tubos contendo mix de PCR. Tal mix para a reação de PCR é preparado com 209,3 μ L de água MilliQ, 130 μ L de *5X Herculase II Reaction Buffer*, 5,2 μ L de dNTPs (100mM, 25mM para cada dNTP), 13 μ L de cada um dos *primers forward* e *reverse* (25 μ M), 6,5 μ L de ácido acético (2M) e 13 μ L da polimerase *Herculase II Fusion*, somando um total de 30 μ L por amostra. O volume final da reação é de 50 μ L por amostra. As condições de ciclagem da PCR seguem uma etapa inicial de desnaturação por 10 minutos a 98°C, seguida por 20 ciclos de 98°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, e um passo final a 72°C por 10 minutos. Após o término da reação de PCR o produto é mantido a 8°C.

4.3. Purificação da biblioteca

Os produtos de PCR são então purificados utilizando *AMPure XP beads* (*Beckman Coulter*) de acordo com as instruções da *Agilent Technologies*. Um total de 40µL do produto de PCR é misturado a 100µL de *AMPure XP beads* mais 40µL de água MilliQ por amostra. A seguir, essa solução é colocada junto à placa magnética para remoção do sobrenadante e é lavada duas vezes com álcool 70%, que é completamente removido ao final. Então, adicionamos 40µL de Tris-HCl (pH = 8,0) para eluir o DNA capturado pelas *AMPure XP beads*. O produto final de 40µL é armazenado a -20°C.

5. CONTROLE DE QUALIDADE E QUANTIFICAÇÃO DA BIBLIOTECA

A qualidade das bibliotecas é um dos principais determinantes para o sucesso da corrida de sequenciamento. Bibliotecas de fragmentos que não correspondem à distribuição de tamanho recomendada podem levar a uma baixa cobertura ou à falha de cobertura em determinadas porções das sequências alvo (CHER, 2011).

O controle de qualidade das bibliotecas é feito através do sistema de eletroforese capilar *2100 Bioanalyzer* (*Agilent Technologies*) utilizando um chip de alta-sensibilidade. A eletroforese é capaz de separar os fragmentos com base no tamanho, permitindo dessa forma avaliar a qualidade das bibliotecas geradas. É esperado para este ensaio que as bibliotecas apresentem um perfil de picos variando de 175 a 625pb, conforme previsto por um eletroferograma padrão (Figura 1). A partir da seleção manual da faixa de fragmentos gerados (175 a 625pb) é possível obter a concentração (em pg/µL e pmol/L) referente a este intervalo, sendo a molaridade utilizada para a quantificação de cada uma das bibliotecas para composição adequada do *pool* de bibliotecas para o sequenciamento. Adicionalmente, as bibliotecas individuais podem ser quantificadas por fluorescência (*Qubit™ dsDNA BR Assay*, *Life Technologies*) para composição adequada do *pool* de bibliotecas para o sequenciamento.

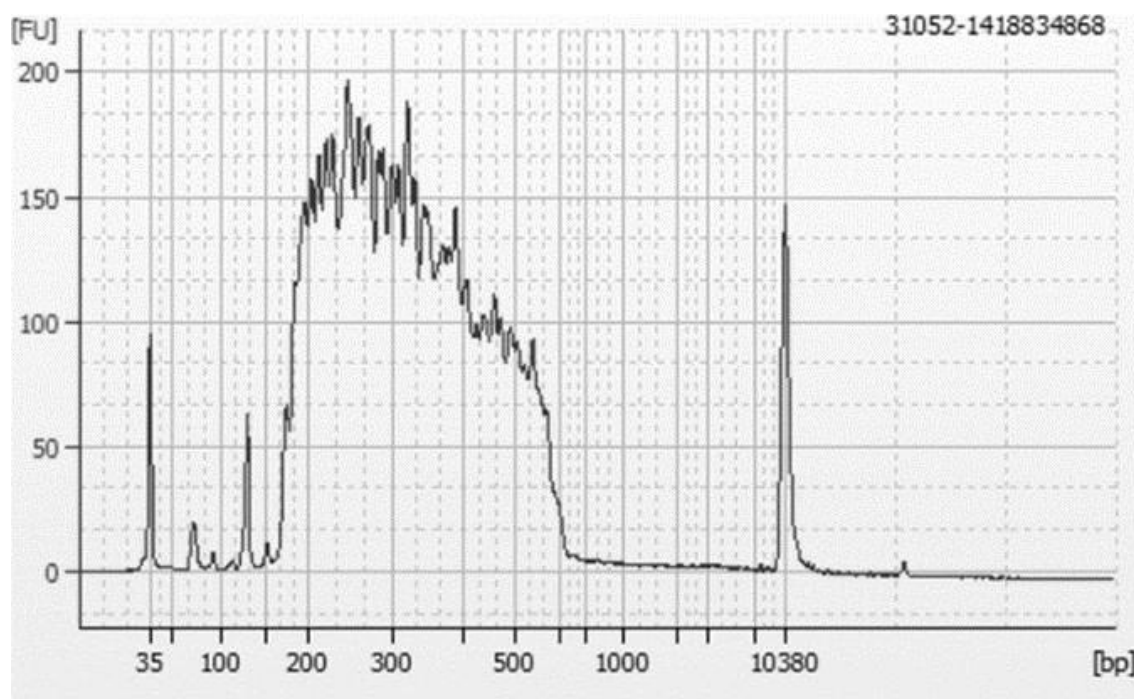


Figura 1: Perfil de picos esperado no eletroferograma para as bibliotecas de fragmento deste ensaio. Tal eletroferograma é produzido pela *Agilent Technologies* durante a avaliação do kit *Haloplex* customizado por meio de ensaio *in silico* de desenho de sondas para captura de DNA alvo utilizando o aplicativo *SureDesign*. Para leitura correta no *2100 Bioanalyzer* é crítico que os 13 picos previstos no *ladder* sejam identificados, que os picos do menor (35pb) e do maior (10380pb) marcador apresentem um tempo de corrida correspondente entre as amostras analisadas e o *ladder* e que as linhas de base sejam planas (CHER, 2011).

6. SEQUENCIAMENTO

Como descrito no item anterior, a partir das concentrações obtidas no *2100 Bioanalyzer* e *Qubit*, prepara-se soluções a 4nM de biblioteca, de maneira que cada biblioteca tenha a mesma representatividade. O *2100 Bioanalyzer* é utilizado também para quantificação deste *pool* final de bibliotecas. O *pool* final de bibliotecas pode ser adicionalmente quantificado por fluorescência (*Qubit™ dsDNA BR Assay*, *Life Technologies*) ou PCR em tempo real (*ViiA™ 7 Real-Time PCR System*, *Applied Biosystems*). Na PCR quantitativa em tempo real (qPCR), através da construção de uma curva padrão, é possível determinar a quantidade absoluta de DNA nas amostras a serem sequenciadas (*Applied Biosystems ViiA™ 7 Real-Time PCR System. User Guide. Life Technologies*, 2010, 262p).

A seguir, 5 μ L do *pool* de bibliotecas a 4nM são desnaturados pela adição de 5 μ L de NaOH (0,2M) e 990 μ L de *Hybridization Buffer* (HT1) para obtenção de uma biblioteca a 20pM, que é diluída com HT1 para que se chegasse à 600 μ L de uma solução de concentração

16pM. Essa solução é inserida no cartucho de sequenciamento do *MiSeq Personal Sequencer* (*Preparing Libraries for Sequencing on the MiSeq*, California, USA, *Illumina*, Inc, 2013, 14p).

Antes de iniciar o sequenciamento é preciso carregar uma *SampleSheet* ou planilha de amostras (*.csv) contendo as informações necessárias para configurar a corrida, as quais correspondem à lista de amostras a serem sequenciadas e às sequências dos índices utilizados em cada amostra.

Durante o sequenciamento, as moléculas de DNA fita simples se ligam à superfície da *flow cell* por meio dos adaptadores presentes em suas extremidades. O sequenciamento ocorre a partir da síntese da fita complementar ao fragmento ligado na *flow cell* utilizando didesoxinucleotídeos marcados com fluoróforos específicos para cada base (A, T, C e G). O *software* Bustard relaciona então a fluorescência emitida após cada incorporação ao didesoxinucleotídeo correspondente com o *cluster* de fragmentos fixados à região que emitiu o sinal. No caso do sequenciamento usando reagentes *MiSeq Reagent Kit V3 (600 cycle)*, são realizados 301 ciclos em leituras do tipo *paired-end* (cada fragmento é sequenciado tanto na fita *forward* quanto na *reverse*) perfazendo um total de 2x301 ciclos de leitura, além de 8 ciclos referentes à leitura do índice incorporado em cada fragmento capturado, o que relaciona de maneira unívoca o fragmento a uma determinada amostra.

7. REFERÊNCIAS

ABDEL-MALEK, Z. A. et al. The enigma and challenges of vitiligo pathophysiology and treatment. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 33, n. 6, p. 778–787, 2020.

ABEGAZ, F. et al. Performance of model-based multifactor dimensionality reduction methods for epistasis detection by controlling population structure. **BioData Mining**, v. 14, n. 1, p. 16, 2021.

ADAMEYKO, I. et al. Sox2 and Mitf cross-regulatory interactions consolidate progenitor and melanocyte lineages in the cranial neural crest. **Development**, v. 139, n. 2, p. 397–410, 2012.

AGRAWAL, S. et al. Comparison of Oxidant-Antioxidant Status in Patients with Vitiligo and Healthy Population. **Kathmandu University Medical Journal**, v. 12, n. 2, p. 132–136, 2015.

- AL-SHOBAILI, H. A. Update on the genetics characterization of vitiligo. **International journal of health sciences**, v. 5, n. 2, p. 167–79, 2011.
- ALENIZI, D. Consanguinity pattern and heritability of Vitiligo in Arar, Saudi Arabia. **Journal of Family and Community Medicine**, v. 21, n. 1, p. 13, 2014.
- ALEXANDER, D. H.; LANGE, K. Enhancements to the ADMIXTURE algorithm for individual ancestry estimation. **BMC Bioinformatics**, v. 12, n. 1, p. 246, 2011.
- ALEXANDER, D. H.; NOVEMBRE, J.; LANGE, K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. **Genome Research**, v. 19, n. 9, p. 1655–1664, 2009.
- ALIKHAN, A. et al. Vitiligo: A comprehensive overview. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 65, n. 3, p. 473–491, 2011.
- ALKHATEEB, A. et al. Epidemiology of Vitiligo and Associated Autoimmune Diseases in Caucasian Probands and Their Families. **Pigment Cell Research**, v. 16, n. 3, p. 208–214, 2003.
- ALZOLIBANI, A. Genetic epidemiology and heritability of vitiligo in the Qassim region of Saudi Arabia. **Acta dermatovenerologica Alpina, Pannonica, et Adriatica**, v. 18, n. 3, p. 119–25, 2009.
- ANDERSON, A. E. et al. Tgif1 and Tgif2 Repress Expression of the RabGAP Evi5l. **Molecular and Cellular Biology**, v. 37, n. 5, 2017.
- ANDRADE, R. B. et al. Estimating Asian Contribution to the Brazilian Population: A New Application of a Validated Set of 61 Ancestry Informative Markers. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 8, n. 11, p. 3577–3582, 2018.
- ANDREWS S. **FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.**, 2010.
- ARCOS-BURGOS, M. et al. Vitiligo: complex segregation and linkage disequilibrium analyses with respect to microsatellite loci spanning the HLA. **Human Genetics**, v. 110, n. 4, p. 334–342, 2002.
- ARONOFF, S. Catalase: Kinetics of Photooxidation. **Science**, v. 150, n. 3692, p. 72–73, 1965.
- ARORA, N.; SIDDIQUI, E. M.; MEHAN, S. Involvement of adenylate cyclase/cAMP/CREB and SOX9/MITF in melanogenesis to prevent vitiligo. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 476, n. 3, p. 1401–1409, 2021.

- AUDE-GARCIA, C. et al. Dual roles for MEF2A and MEF2D during human macrophage terminal differentiation and c-Jun expression. **Biochemical Journal**, v. 430, n. 2, p. 237–244, 2010.
- BAHARAV, E. et al. Tyrosinase as an autoantigen in patients with vitiligo. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 105, n. 1, p. 84–88, 1996.
- BATCIOGLU, K. et al. Comparison of plasma malondialdehyde, glutathione, glutathione peroxidase, hydroxyproline and selenium levels in patients with vitiligo and healthy controls. **Indian Journal of Dermatology**, v. 53, n. 3, p. 106, 2008.
- BERGQVIST, C.; EZZEDINE, K. Vitiligo: A Review. **Dermatology**, v. 236, n. 6, p. 571–592, 2020.
- BERGSTRÖM, A. et al. Insights into human genetic variation and population history from 929 diverse genomes. **Science**, v. 367, n. 6484, p. eaay5012, 2020.
- BERSON, J. F. et al. Pmel17 Initiates Premelanosome Morphogenesis within Multivesicular Bodies. **Molecular Biology of the Cell**, v. 12, n. 11, p. 3451–3464, 2001.
- BERTOLOTTI, A. et al. Type I interferon signature in the initiation of the immune response in vitiligo. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 27, n. 3, p. 398–407, 2014.
- BIN, B.-H. et al. Membrane-Associated Transporter Protein (MATP) Regulates Melanosomal pH and Influences Tyrosinase Activity. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0129273, 2015.
- BOULON, S. et al. Oct-1 Potentiates CREB-Driven Cyclin D1 Promoter Activation via a Phospho-CREB- and CREB Binding Protein-Independent Mechanism. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 22, p. 7769–7779, 2002.
- BOYLE, A. P. et al. Annotation of functional variation in personal genomes using Regulome DB. **Genome Research**, v. 22, n. 9, p. 1790–1797, 2012.
- BRUSERUD, Ø. et al. AIRE-mutations and autoimmune disease. **Current Opinion in Immunology**, v. 43, p. 8–15, 2016.
- BUSCH, A.; RICHTER, A. S.; BACKOFEN, R. IntaRNA: efficient prediction of bacterial sRNA targets incorporating target site accessibility and seed regions. **Bioinformatics**, v. 24, n. 24, p. 2849–2856, 2008.
- CASTELLI, E. C. et al. HLA-E coding and 3' untranslated region variability determined by

next-generation sequencing in two West-African population samples. **Human Immunology**, v. 76, n. 12, p. 945–953, 2015.

CASTRO, C. C. S. DE; MIOT, H. A. Prevalence of vitiligo in Brazil-A population survey. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 31, n. 3, p. 448–450, 2018.

CHAI, J.; TARNAWSKI, A. S. Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 53, n. 2, p. 147–57, 2002.

CHAITANYA, L. et al. The HRisPlex-S system for eye, hair and skin colour prediction from DNA: Introduction and forensic developmental validation. **Forensic Science International: Genetics**, v. 35, n. April, p. 123–135, 2018.

CHER, C. (FIELD A. S. Bioanalyzer Applications for Next Gen Sequencing : Updates and Tips. p. 1–49, 2011.

CHOI, H. et al. Primary Cilia Negatively Regulate Melanogenesis in Melanocytes and Pigmentation in a Human Skin Model. **PLOS ONE**, v. 11, n. 12, p. e0168025, 2016.

CUI, T.-T. et al. miR-196a-2 rs11614913 polymorphism is associated with vitiligo by affecting heterodimeric molecular complexes of Tyr and Tyrp1. **Archives of Dermatological Research**, v. 307, n. 8, p. 683–692, 2015.

D’ORAZIO, J. et al. UV radiation and the skin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 6, p. 12222–12248, 2013.

DAMMAK, I. et al. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation at the tissue level in patients with stable and active vitiligo. **International Journal of Dermatology**, v. 48, n. 5, p. 476–480, 2009.

DAS, S. K. et al. Studies on vitiligo. II. Familial aggregation and genetics. **Genetic Epidemiology**, v. 2, n. 3, p. 255–262, 1985.

DELL’ANNA, M. L. et al. Alterations of Mitochondria in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Vitiligo Patients. **Pigment Cell Research**, v. 16, n. 5, p. 553–559, 2003.

DEMIROVIC, D. et al. Differential translocation of heat shock factor-1 after mild and severe stress to human skin fibroblasts undergoing aging in vitro. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 8, n. 4, p. 333–339, 2014.

DENAT, L. et al. Melanocytes as Instigators and Victims of Oxidative Stress. **Journal of**

Investigative Dermatology, v. 134, n. 6, p. 1512–1518, 2014.

DEPRISTO, M. A. et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. **Nature Genetics**, v. 43, n. 5, p. 491–498, 2011.

DI LEVA, G.; CROCE, C. M. MiRNA profiling of cancer. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 23, n. 1, p. 3–11, 2013.

DONG, D. et al. Comparison of responses of melanocyte lineages from p75(+) and p75(–) human scalp-derived neural crest stem cells under phototherapy. **Lasers in Medical Science**, v. 36, n. 1, p. 139–146, 2021.

EWING, B. et al. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 175–185, 1998.

FERRAGINA, P. et al. An Alphabet-Friendly FM-Index. p. 150–160, 2004.

FLESHER, J. L. et al. Delineating the role of MITF isoforms in pigmentation and tissue homeostasis. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 33, n. 2, p. 279–292, 2020.

FREZZATO, F. et al. HSP70/HSF1 axis, regulated via a PI3K/AKT pathway, is a druggable target in chronic lymphocytic leukemia. **International Journal of Cancer**, v. 145, n. 11, p. 3089–3100, 2019.

FRIEDMAN, J. R.; KAESTNER, K. H. The Foxa family of transcription factors in development and metabolism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 19–20, p. 2317–2328, 2006.

GALLANT, S.; GILKESON, G. ETS transcription factors and regulation of immunity. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 54, n. 3, p. 149–163, 2006.

GIOVANNELLI, L. et al. Increased oxidative DNA damage in mononuclear leukocytes in vitiligo. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 556, n. 1–2, p. 101–106, 2004.

GIRAUD, M. et al. Aire unleashes stalled RNA polymerase to induce ectopic gene expression in thymic epithelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 2, p. 535–540, 2012.

GODING, C. R.; ARNHEITER, H. MITF—the first 25 years. **Genes & Development**, v. 33, n. 15–16, p. 983–1007, 2019.

GÓTH, L.; NAGY, T. Inherited catalase deficiency: Is it benign or a factor in various age

related disorders? **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 753, n. 2, p. 147–154, 2013.

GRIFFITHS-JONES, S. et al. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. **Nucleic acids research**, v. 34, n. Database issue, p. D140-4, 2006.

HAFEZ, M.; SHARAF, L.; ABD EL-NABI, S. M. The genetics of vitiligo. **Acta dermatovenerologica**, v. 63, n. 3, p. 249–51, 1983.

HARRIS, J. E. et al. A Mouse Model of Vitiligo with Focused Epidermal Depigmentation Requires IFN- γ for Autoreactive CD8⁺ T-Cell Accumulation in the Skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 7, p. 1869–1876, 2012.

HARRIS, M. L. et al. Sox proteins in melanocyte development and melanoma. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 23, n. 4, p. 496–513, 2010.

HELLWEGE, J. N. et al. Population Stratification in Genetic Association Studies. **Current Protocols in Human Genetics**, v. 95, n. 1, p. 1.22.1-1.22.23, 2017.

HERSHEY, C. L.; FISHER, D. E. Genomic analysis of the Microphthalmia locus and identification of the MITF-J/Mitf-J isoform. **Gene**, v. 347, n. 1, p. 73–82, 2005.

HOASHI, T. et al. MART-1 Is Required for the Function of the Melanosomal Matrix Protein PMEL17/GP100 and the Maturation of Melanosomes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 14, p. 14006–14016, 2005.

HORNYAK, T. J. et al. Mitf dosage as a primary determinant of melanocyte survival after ultraviolet irradiation. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 22, n. 3, p. 307–318, 2009.

HUNTZINGER, E.; IZAURRALDE, E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. **Nature reviews. Genetics**, v. 12, n. 2, p. 99–110, 2011.

JACOB, C. et al. HDAC1 and HDAC2 Control the Specification of Neural Crest Cells into Peripheral Glia. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 17, p. 6112–6122, 2014.

JIMBOW, K. et al. Increased sensitivity of melanocytes to oxidative stress and abnormal expression of tyrosinase-related protein in vitiligo. **British Journal of Dermatology**, v. 144, n. 1, p. 55–65, 2001.

JIN, Y. et al. NALP1 in Vitiligo-Associated Multiple Autoimmune Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 12, p. 1216–1225, 2007.

JIN, Y. et al. Variant of TYR and Autoimmunity Susceptibility Loci in Generalized Vitiligo. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 18, p. 1686–1697, 2010a.

JIN, Y. et al. Common variants in FOXP1 are associated with generalized vitiligo. **Nature Genetics**, v. 42, n. 7, p. 576–578, 2010b.

JIN, Y. et al. Common variants in FOXP1 are associated with generalized vitiligo. **Nature Genetics**, v. 42, n. 7, p. 576–578, 2010c.

JIN, Y. et al. Genome-wide association analyses identify 13 new susceptibility loci for generalized vitiligo. **Nature Genetics**, v. 44, n. 6, p. 676–680, 2012.

JIN, Y. et al. Genome-wide association studies of autoimmune vitiligo identify 23 new risk loci and highlight key pathways and regulatory variants. **Nature Genetics**, v. 48, n. 11, p. 1418–1424, 2016.

JOHN, B. et al. Human MicroRNA targets. **PLoS biology**, v. 2, n. 11, p. e363, 2004a.

JOHN, B. et al. Human MicroRNA Targets. **PLoS Biology**, v. 2, n. 11, p. e363, 2004b.

JOYCE, C. E. et al. Deep sequencing of small RNAs from human skin reveals major alterations in the psoriasis miRNAome. **Human Molecular Genetics**, v. 20, n. 20, p. 4025–4040, 2011.

KANG, J. et al. A general mechanism for transcription regulation by Oct1 and Oct4 in response to genotoxic and oxidative stress. **Genes & Development**, v. 23, n. 2, p. 208–222, 2009.

KANG, M. C. et al. UP256 Inhibits Hyperpigmentation by Tyrosinase  Expression/Dendrite Formation via Rho-Dependent  Signaling and by Primary Cilium Formation  in Melanocytes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 15, p. 5341, 2020.

KEMP, E. H. et al. Immunoprecipitation of melanogenic enzyme autoantigens with vitiligo sera: evidence for cross-reactive autoantibodies to tyrosinase and tyrosinase-related protein-2 (TRP-2). **Clinical & Experimental Immunology**, v. 109, n. 3, p. 495–500, 1997.

KIM, E. et al. MITF Expression Predicts Therapeutic Vulnerability to p300 Inhibition in Human Melanoma. **Cancer Research**, v. 79, n. 10, p. 2649–2661, 2019.

KINGO, K. et al. Gene expression analysis of melanocortin system in vitiligo. **Journal of Dermatological Science**, v. 48, n. 2, p. 113–122, 2007.

KITAMURA, R. et al. Mechanisms underlying the dysfunction of melanocytes in vitiligo epidermis: role of SCF/KIT protein interactions and the downstream effector, MITF-M. **The Journal of Pathology**, v. 202, n. 4, p. 463–475, 2004.

KOCA, R. et al. Oxidant-antioxidant enzymes and lipid peroxidation in generalized vitiligo. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 29, n. 4, p. 406–409, 2004.

KOSTYUK, V. A. et al. Dysfunction of Glutathione S-Transferase Leads to Excess 4-Hydroxy-2-Nonenal and H₂O₂ and Impaired Cytokine Pattern in Cultured Keratinocytes and Blood of Vitiligo Patients. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 13, n. 5, p. 607–620, 2010.

KRÜGER, C.; SCHALLREUTER, K. U. A review of the worldwide prevalence of vitiligo in children/adolescents and adults. **International Journal of Dermatology**, v. 51, n. 10, p. 1206–1212, 2012.

LAMBERT, M. W. et al. The physiology of melanin deposition in health and disease. **Clinics in Dermatology**, v. 37, n. 5, p. 402–417, 2019.

LE GAL, F.-A. et al. Direct Evidence to Support the Role of Antigen-Specific CD8⁺ T Cells in Melanoma-Associated Vitiligo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 117, n. 6, p. 1464–1470, 2001.

LEE, N.; KIM, D.; KIM, W.-U. Role of NFAT5 in the Immune System and Pathogenesis of Autoimmune Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 2019.

LEWIS, B. P. et al. 33-Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. **Cell**, v. 115, n. 7, p. 787–798, 2003.

LI, H. et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. **Bioinformatics**, v. 25, n. 16, p. 2078–2079, 2009.

LI, H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. 2013.

LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics**, v. 25, n. 14, p. 1754–1760, 2009.

LISHOUT, F. VAN et al. An efficient algorithm to perform multiple testing in epistasis screening. **BMC Bioinformatics**, v. 14, n. 1, p. 138, 2013.

LISHOUT, F. VAN et al. gammaMAXT: a fast multiple-testing correction algorithm.

BioData Mining, v. 8, n. 1, p. 36, 2015.

LIU, X.-M. et al. Maintenance of immune hyporesponsiveness to melanosomal proteins by DHICA-mediated antioxidation: Possible implications for autoimmune vitiligo. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, n. 9, p. 1177–1185, 2011.

LOH, P.-R. et al. Reference-based phasing using the Haplotype Reference Consortium panel. **Nature Genetics**, v. 48, n. 11, p. 1443–1448, 2016.

MA, W. et al. Reprogramming Retinal Pigment Epithelium to Differentiate Toward Retinal Neurons with Sox2. **Stem Cells**, v. 27, n. 6, p. 1376–1387, 2009.

MACHADO FILHO, C. D. DOS S. et al. Vitiligo: analysis of grafting versus curettage alone, using melanocyte morphology and reverse transcriptase polymerase chain reaction for tyrosinase mRNA. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 123, n. 4, p. 187–191, 2005.

MALCOV-BROG, H. et al. UV-Protection Timer Controls Linkage between Stress and Pigmentation Skin Protection Systems. **Molecular Cell**, v. 72, n. 3, p. 444- 456.e7, 2018.

MAPLES, B. K. et al. RFMix: A Discriminative Modeling Approach for Rapid and Robust Local-Ancestry Inference. **The American Journal of Human Genetics**, v. 93, n. 2, p. 278–288, 2013.

MARATHE, H. G. et al. BRG1 interacts with SOX10 to establish the melanocyte lineage and to promote differentiation. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 11, p. 6442–6458, 2017.

MARESCA, V. et al. Increased Sensitivity to Peroxidative Agents as a Possible Pathogenic Factor of Melanocyte Damage in Vitiligo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 109, n. 3, p. 310–313, 1997.

MARÍN, R. M.; VANÍEK, J. Efficient use of accessibility in microRNA target prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 1, p. 19–29, 2011.

MAROÑAS, O. et al. Development of a forensic skin colour predictive test. **Forensic Science International: Genetics**, v. 13, p. 34–44, 2014.

MARTIN, A. R. et al. Human Demographic History Impacts Genetic Risk Prediction across Diverse Populations. **The American Journal of Human Genetics**, v. 100, n. 4, p. 635–649, 2017.

MARTIN, K. A. et al. A Competitive Mechanism of CArG Element Regulation by YY1 and SRF: Implications for Assessment of Phox1/MHox Transcription Factor Interactions at

CAR-G Elements. **DNA and Cell Biology**, v. 16, n. 5, p. 653–661, 1997.

MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet.journal**, v. 17, n. 1, p. 10, 2011.

MARUOTTI, J. et al. MITF-M, a ‘melanocyte-specific’ isoform, is expressed in the adult retinal pigment epithelium. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 25, n. 5, p. 641–644, 2012.

MAURUS, K. et al. The AP-1 transcription factor FOSL1 causes melanocyte reprogramming and transformation. **Oncogene**, v. 36, n. 36, p. 5110–5121, 2017.

MCEVOY, B.; BELEZA, S.; SHRIVER, M. D. The genetic architecture of normal variation in human pigmentation: an evolutionary perspective and model. **Human Molecular Genetics**, v. 15, n. suppl_2, p. R176–R181, 2006.

MCKENNA, A. et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. **Genome Research**, v. 20, n. 9, p. 1297–1303, 2010a.

MCKENNA, A. et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. **Genome Research**, v. 20, n. 9, p. 1297–1303, 2010b.

MCLAREN, W. et al. Deriving the consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor. **Bioinformatics**, v. 26, n. 16, p. 2069–2070, 2010.

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

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

MIONE, M.; BOSSERHOFF, A. MicroRNAs in melanocyte and melanoma biology. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 28, n. 3, p. 340–354, 2015.

MORRIS, B. J. et al. FOXO3: A Major Gene for Human Longevity - A Mini-Review. **Gerontology**, v. 61, n. 6, p. 515–525, 2015.

MORRONE, A. et al. Catecholamines and Vitiligo. **Pigment Cell Research**, v. 5, n. 2, p.

65–69, 1992.

MOSENSON, J. A. et al. A central role for inducible heat-shock protein 70 in autoimmune vitiligo. **Experimental Dermatology**, v. 22, n. 9, p. 566–569, 2013.

NASLAVSKY, M. S. et al. Whole-genome sequencing of 1,171 elderly admixed individuals from the largest Latin American metropolis (São Paulo, Brazil). **bioRxiv**, p. 1–29, 2020.

NGUYEN, N. T.; FISHER, D. E. MITF and UV responses in skin: From pigmentation to addiction. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 32, n. 2, p. 224–236, 2019.

NING, S.; PAGANO, J. S.; BARBER, G. N. IRF7: activation, regulation, modification and function. **Genes & Immunity**, v. 12, n. 6, p. 399–414, 2011.

PALERMO, B. et al. Specific Cytotoxic T Lymphocyte Responses Against Melan-A/MART1, Tyrosinase and Gp100 in Vitiligo by the Use of Major Histocompatibility Complex/Peptide Tetramers: the Role of Cellular Immunity in the Etiopathogenesis of Vitiligo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 117, n. 2, p. 326–332, 2001.

PALMERO, E. I. et al. Mechanisms and role of microRNA deregulation in cancer onset and progression. **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, n. 3, p. 363–370, 2011.

PASSERON, T. et al. SOX9 is a key player in ultraviolet B-induced melanocyte differentiation and pigmentation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 35, p. 13984–13989, 2007.

PASSOS, G. A. et al. Update on Aire and thymic negative selection. **Immunology**, v. 153, n. 1, p. 10–20, 2018.

PATEL, A. B.; GREBER, B. J.; NOGALES, E. Recent insights into the structure of TFIID, its assembly, and its binding to core promoter. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 61, p. 17–24, 2020.

PAVAN, W. J.; STURM, R. A. The Genetics of Human Skin and Hair Pigmentation. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 20, n. 1, p. 41–72, 2019.

PENA, S. D. J. J. et al. The Genomic Ancestry of Individuals from Different Geographical Regions of Brazil Is More Uniform Than Expected. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e17063, 2011a.

PENA, S. D. J. J. et al. The Genomic Ancestry of Individuals from Different Geographical Regions of Brazil Is More Uniform Than Expected. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e17063, 2011b.

PERNIOLA, R. Twenty Years of AIRE. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018.

PORTO, I. O. P. et al. microRNAs targeting the immunomodulatory HLA-G gene: A new survey searching for microRNAs with potential to regulate HLA-G. **Molecular Immunology**, v. 65, n. 2, p. 230–241, 2015.

PRAETORIUS, C. et al. A Polymorphism in IRF4 Affects Human Pigmentation through a Tyrosinase-Dependent MITF/TFAP2A Pathway. **Cell**, v. 155, n. 5, p. 1022–1033, 2013.

PRUIM, R. J. et al. LocusZoom: regional visualization of genome-wide association scan results. **Bioinformatics**, v. 26, n. 18, p. 2336–2337, 2010.

QUILLEN, E. E. et al. Shades of complexity: New perspectives on the evolution and genetic architecture of human skin. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 168, n. S67, p. 4–26, 2019.

RAMA RAO, GR. et al. Determination of oxidative stress in vitiligo by measuring superoxide dismutase and catalase levels in vitiliginous and non-vitiliginous skin. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 75, n. 3, p. 268, 2009.

RAPOSO, G. et al. Distinct Protein Sorting and Localization to Premelanosomes, Melanosomes, and Lysosomes in Pigmented Melanocytic Cells. **Journal of Cell Biology**, v. 152, n. 4, p. 809–824, 2001.

RASHIGHI, M. et al. CXCL10 Is Critical for the Progression and Maintenance of Depigmentation in a Mouse Model of Vitiligo. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 223, p. 223ra23–223ra23, 2014.

REGAZZETTI, C. et al. Endothelial Cells Promote Pigmentation through Endothelin Receptor B Activation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 12, p. 3096–3104, 2015.

REHMSMEIER, M. et al. Fast and effective prediction of microRNA / target duplexes. **Spring**, n. 2003, p. 1507–1517, 2004.

REHMSMEIER, M. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. **RNA**, v. 10, n. 10, p. 1507–1517, 2004.

REZAEI, N. et al. Autoimmunity as an aetiological factor in vitiligo. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 21, n. 7, p. 865–876, 2007.

RIDING, R. L. et al. Type I interferon signaling limits viral vector priming of CD8 + T cells during initiation of vitiligo and melanoma immunotherapy. **Pigment Cell & Melanoma**

Research, p. pcmr.12935, 2020.

RIDING, R. L.; HARRIS, J. E. The Role of Memory CD8 + T Cells in Vitiligo. **The Journal of Immunology**, v. 203, n. 1, p. 11–19, 2019.

ROBERTS, G. H. L.; SANTORICO, S. A.; SPRITZ, R. A. The genetic architecture of vitiligo. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 33, n. 1, p. 8–15, 2020a.

ROBERTS, G. H. L.; SANTORICO, S. A.; SPRITZ, R. A. Deep genotype imputation captures virtually all heritability of autoimmune vitiligo. **Human Molecular Genetics**, v. 29, n. 5, p. 859–863, 2020b.

ROBINSON, J. T. et al. Integrative genomics viewer. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 1, p. 24–26, 2011.

SALZANO, F. M.; SANS, M. Interethnic admixture and the evolution of Latin American populations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 1 suppl 1, p. 151–170, 2014.

SATO, S. et al. CBP/p300 as a co-factor for the Microphthalmia transcription factor. **Oncogene**, v. 14, n. 25, p. 3083–3092, 1997.

SCHALLREUTER, K. U. et al. In Vivo and In Vitro Evidence for Hydrogen Peroxide (H₂O₂) Accumulation in the Epidermis of Patients with Vitiligo and its Successful Removal by a UVB-Activated Pseudocatalase. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 4, n. 1, p. 91–96, 1999.

SCHALLREUTER, K. U. et al. Estrogens Can Contribute to Hydrogen Peroxide Generation and Quinone-Mediated DNA Damage in Peripheral Blood Lymphocytes from Patients with Vitiligo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 5, p. 1036–1042, 2006.

SCHALLREUTER, K. U. et al. Basic evidence for epidermal H₂O₂/ONOO⁻-mediated oxidation/nitration in segmental vitiligo is supported by repigmentation of skin and eyelashes after reduction of epidermal H₂O₂ with topical NB-UVB-activated pseudocatalase PC-KUS. **The FASEB Journal**, v. 27, n. 8, p. 3113–3122, 2013.

SCHALLREUTER, K. U.; WOOD, J. M.; BERGER, J. Low Catalase Levels in the Epidermis of Patients with Vitiligo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 97, n. 6, p. 1081–1085, 1991.

SCHUNTER, J. A. et al. A novel FoxD3 Variant Is Associated With Vitiligo and Elevated Thyroid Auto-Antibodies. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 100,

n. 10, p. E1335–E1342, 2015.

SECOLIN, R. et al. Distribution of local ancestry and evidence of adaptation in admixed populations. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 13900, 2019.

SEHGAL, V.; SRIVASTAVA, G. Vitiligo: Compendium of clinico-epidemiological features. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 73, n. 3, p. 149, 2007.

SERRE, C.; BUSUTTIL, V.; BOTTO, J.-M. Intrinsic and extrinsic regulation of human skin melanogenesis and pigmentation. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 40, n. 4, p. 328–347, 2018.

SHAKYA, A. et al. Oct1 Is a Switchable, Bipotential Stabilizer of Repressed and Inducible Transcriptional States. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 1, p. 450–459, 2011.

SHEINBOIM, D. et al. OCT4 impedes cell fate redirection by the melanocyte lineage master regulator MITF in mouse ESCs. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1022, 2017.

SHIMAZU, T. et al. Suppression of Oxidative Stress by γ -Hydroxybutyrate, an Endogenous Histone Deacetylase Inhibitor. **Science**, v. 339, n. 6116, p. 211–214, 2013.

SIRUGO, G.; WILLIAMS, S. M.; TISHKOFF, S. A. The Missing Diversity in Human Genetic Studies. **Cell**, v. 177, n. 1, p. 26–31, 2019.

SPEECKAERT, R. et al. Critical appraisal of the oxidative stress pathway in vitiligo: a systematic review and meta-analysis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 32, n. 7, p. 1089–1098, 2018a.

SPEECKAERT, R. et al. Critical appraisal of the oxidative stress pathway in vitiligo: a systematic review and meta-analysis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 32, n. 7, p. 1089–1098, 2018b.

SPRITZ, R. A. Six Decades of Vitiligo Genetics: Genome-Wide Studies Provide Insights into Autoimmune Pathogenesis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 2, p. 268–273, 2012.

SPRITZ, R. A.; SANTORICO, S. A. The Genetic Basis of Vitiligo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 141, n. 2, p. 265–273, 2021.

SRIVASTAVA, N. et al. Dendritic cells sub-sets are associated with inflammatory cytokine production in progressive vitiligo disease. **Archives of Dermatological Research**, 2021.

STURM, R. A. Molecular genetics of human pigmentation diversity. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n. R1, p. R9–R17, 2009.

SUMITOMO, A. et al. LPA Induces Keratinocyte Differentiation and Promotes Skin Barrier Function through the LPAR1/LPAR5-RHO-ROCK-SRF Axis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 139, n. 5, p. 1010–1022, 2019.

SUN, X. et al. Study on genetic epidemiology on 815 patients with vitiligo in Zhejiang area. **Zhonghua liu xing bing xue za zhi = Zhonghua liuxingbingxue zazhi**, v. 26, n. 11, p. 911–4, 2005.

SUN, X. et al. Genetic epidemiology of vitiligo: a study of 815 probands and their families from south China. **International Journal of Dermatology**, v. 45, n. 10, p. 1176–1181, 2006.

TACHIBANA, M. MITF: A Stream Flowing for Pigment Cells. **Pigment Cell Research**, v. 13, n. 4, p. 230–240, 2000.

TAKAHASHI, K. et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861–872, 2007.

TANG, L. et al. Vitamin D protects human melanocytes against oxidative damage by activation of Wnt/ β -catenin signaling. **Laboratory Investigation**, v. 98, n. 12, p. 1527–1537, 2018.

TAZI-AHNINI, R. et al. The autoimmune regulator gene (AIRE) is strongly associated with vitiligo. **British Journal of Dermatology**, p. ???-???, 2008.

THE 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM. A global reference for human genetic variation. **Nature**, v. 526, n. 7571, p. 68–74, 2015.

THOMAS, A. J.; ERICKSON, C. A. FOXD3 regulates the lineage switch between neural crest-derived glial cells and pigment cells by repressing MITF through a non-canonical mechanism. **Development**, v. 136, n. 11, p. 1849–1858, 2009.

THORVALDSDOTTIR, H.; ROBINSON, J. T.; MESIROV, J. P. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. **Briefings in Bioinformatics**, v. 14, n. 2, p. 178–192, 2013.

TOOSI, S.; ORLOW, S. J.; MANGA, P. Vitiligo-Inducing Phenols Activate the Unfolded Protein Response in Melanocytes Resulting in Upregulation of IL6 and IL8. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 11, p. 2601–2609, 2012.

UHLEN, M. et al. Tissue-based map of the human proteome. **Science**, v. 347, n. 6220, p. 1260419–1260419, 2015.

VACHTENHEIM, J.; BOROVSANSKÝ, J. “Transcription physiology” of pigment formation in melanocytes: central role of MITF. **Experimental Dermatology**, v. 19, n. 7, p. 617–627, 2010.

VACHTENHEIM, J.; ŠESTÁKOVÁ, B.; TUHÁČKOVÁ, Z. Inhibition of MITF transcriptional activity independent of targeting p300/CBP coactivators. **Pigment Cell Research**, v. 20, n. 1, p. 41–51, 2007.

VAISH, U. et al. Micro RNAs upregulated in Vitiligo skin play an important role in its aetiopathogenesis by altering TRP1 expression and keratinocyte-melanocytes cross-talk. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 10079, 2019.

VAN DEN BOORN, J. G. et al. Autoimmune Destruction of Skin Melanocytes by Perilesional T Cells from Vitiligo Patients. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 129, n. 9, p. 2220–2232, 2009.

VAN DEN WIJNGAARD, R. et al. Local Immune Response in Skin of Generalized Vitiligo Patients. **Laboratory Investigation**, v. 80, n. 8, p. 1299–1309, 2000.

VAN DER AUWERA, G. A. et al. From FastQ Data to High-Confidence Variant Calls: The Genome Analysis Toolkit Best Practices Pipeline. In: **Current Protocols in Bioinformatics**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2013. v. 11p. 11.10.1-11.10.33.

VERDONI, A. M.; IKEDA, S.; IKEDA, A. Serum response factor is essential for the proper development of skin epithelium. **Mammalian Genome**, v. 21, n. 1–2, p. 64–76, 2010.

WAGNER, R. Y. et al. Altered E-Cadherin Levels and Distribution in Melanocytes Precede Clinical Manifestations of Vitiligo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 7, p. 1810–1819, 2015.

WAKAMATSU, K. et al. Characterization of melanin in human iridal and choroidal melanocytes from eyes with various colored irides. **Pigment cell & melanoma research**, v. 21, n. 1, p. 97–105, 2008.

WAN, P.; HU, Y.; HE, L. Regulation of melanocyte pivotal transcription factor MITF by some other transcription factors. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 354, n. 1–2, p. 241–246, 2011.

WAŃKOWICZ-KALIŃSKA, A. et al. Immunopolarization of CD4⁺ and CD8⁺ T Cells to Type-1–Like is Associated with Melanocyte Loss in Human Vitiligo. **Laboratory Investigation**, v. 83, n. 5, p. 683–695, 2003.

WARD, L. D.; KELLIS, M. HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. D930–D934, 2012.

WIRIYASERMKUL, P.; MORIYAMA, S.; NAGAMORI, S. Membrane transport proteins in melanosomes: Regulation of ions for pigmentation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1862, n. 12, p. 183318, 2020.

XIE, H. et al. Vitiligo: How do oxidative stress-induced autoantigens trigger autoimmunity? **Journal of Dermatological Science**, v. 81, n. 1, p. 3–9, 2016.

YAN, S. et al. Current insight into the roles of microRNA in vitiligo. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 4, p. 3211–3219, 2020.

YU, J. et al. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. **Science**, v. 318, n. 5858, p. 1917–1920, 2007.

ZERLANKO, B. J. et al. Premature Senescence and Increased TGF β Signaling in the Absence of Tgif1. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35460, 2012.

ZHANG, X.-J. et al. Characteristics of genetic epidemiology and genetic models for vitiligo. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 51, n. 3, p. 383–390, 2004.

ZHANG, Y. et al. The Prevalence of Vitiligo: A Meta-Analysis. **PLOS ONE**, v. 11, n. 9, p. e0163806, 2016.

ZHANG, Z. et al. Differentially expressed microRNAs in peripheral blood mononuclear cells of non-segmental vitiligo and their clinical significance. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 35, n. 2, p. 1–10, 2021.

ANEXO D - PROTOCOLO DE PROCESSAMENTO COMPUTACIONAL DE DADOS DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO



Laboratório de Pesquisas Forenses e Genômicas
Departamento de Química – FFCLRP/USP

Protocolo de processamento computacional de dados de sequenciamento de nova geração

Oliveira MLG, Marcorin L, Pereira ALE, Debortoli G,

Fracasso NCA, Silva GV, Castelli EC, Mendes-Junior CT

Versão 2 – abril de 2018

Adaptado de: Oliveira MLG. Sequenciamento de nova geração do gene IRF4: identificação da variação associada a fenótipos de pigmentação na população brasileira. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2016. 151p.

1. ANÁLISE DE DADOS DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO	2
1.1. Análise primária	2
1.2. Análise secundária	3
1.2.1. Avaliação da qualidade	3
1.2.2. Trimagem	3
1.2.3. Alinhamento ao genoma de referência	5
1.2.3.1. SAM	7
1.2.3.2. BAM	8
1.3. Análise terciária	9
1.3.1. Determinação de variantes	9
1.3.1.1. VCF	12
1.3.2. Remoção de genótipos de baixa qualidade	14
2. REFERÊNCIAS	16

1. ANÁLISE DE DADOS DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

O fluxograma de análises no NGS pode ser resumido em três fases principais: a fase primária, que consiste na geração dos dados no formato FastQ, a fase secundária, que compreende a aplicação de filtros de qualidade e o alinhamento a um genoma de referência e a fase terciária, que compreende o processo de determinação das variantes através de comparação das sequências alvo a um genoma de referência.

1.1. Análise primária

O processamento dos dados segue passos gerais pré-estabelecidos, de acordo com o objetivo pretendido, e tem início no *base calling* (ou a interpretação da imagem obtida a partir do sequenciador), quando são gerados os dados brutos do sequenciamento no formato *base call* (*.bcl). Estes dados são então disponibilizados através do ambiente de computação em nuvem da *Illumina*, *BaseSpace* (<https://basespace.illumina.com>), no formato FastQ (*.fastq.gz), o qual possui uma pontuação de qualidade associada (*Q-score*) a cada base sequenciada.

Essa pontuação de qualidade, também denominada *Phred-score* por ter sido introduzida como convenção pelo programa Phred (EWING et al., 1998), se relaciona à probabilidade de erro na determinação de uma base. A medida se baseia na fórmula a seguir, onde dado a determinação de uma base X, a probabilidade de que X não seja verdadeira ($P(X)$) é expressa pela relação $Q(X) = -10 \log_{10}(P(X))$ ou $P(X) = 10^{-Q(X)/10}$. Assim, um Q30 indica probabilidade de ocorrência de um erro a cada 1.000 bases determinadas.

Cada arquivo FastQ é nomeado como no exemplo a seguir, onde PIG0001 representa o nome da amostra, S1 representa o número da amostra e indica neste exemplo que esta é a primeira amostra listada na *SampleSheet*, L001 indica o número da linha que a amostra ocupa na *flow cell*, sendo sempre o mesmo, já que a *flow cell* utilizada possui apenas uma linha, R1 e R2 indicam que o arquivo é composto por *reads forward* e *reverse*, respectivamente, enquanto o último segmento 001 sempre recebe essa denominação:

PIG0001_S1_L001_R1_001.fastq.gz

PIG0001_S1_L001_R2_001.fastq.gz

1.2. Análise secundária

Essa segunda etapa consiste na aplicação de filtros de qualidade e posterior alinhamento dos fragmentos sequenciados a um genoma de referência.

1.2.1. Avaliação da qualidade

Em um primeiro momento, é importante verificar a qualidade das *reads* sequenciadas, a fim de garantir que os dados não apresentem problemas que poderiam afetar o passo seguinte de mapeamento. Para tanto, pode ser empregado o *software* FastQC (ANDREWS S., 2010), o qual utiliza um arquivo FastQ para gerar um relatório completo da qualidade das sequências (Figura 1a). A partir dos resultados apresentados é possível decidir por estratégias que melhorem a qualidade dos dados gerados.

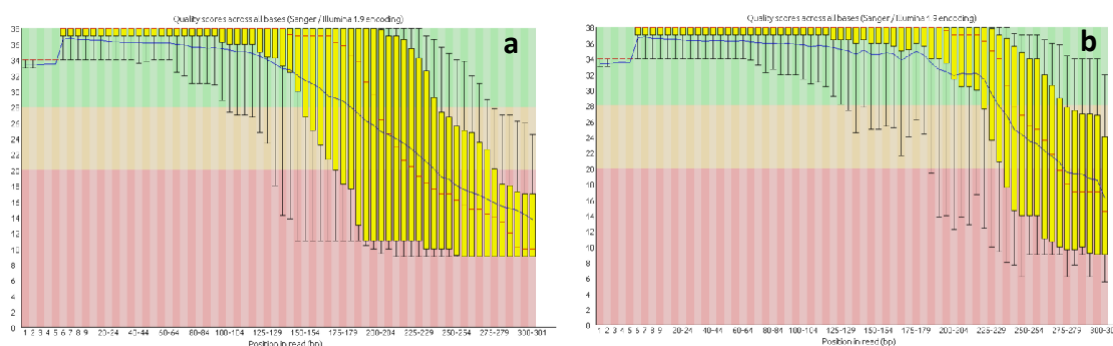


Figura 1: Gráfico de distribuição da qualidade por base no programa FastQC. Cada coluna apresenta um *boxplot* com os valores de qualidade média das bases incorporadas em todas as *reads* em um determinado ciclo. Como pode ser observado em (a) ocorre uma diminuição da qualidade ($Q < 30$) das *reads* não-processadas a partir dos ciclos 150-154. O eixo Y apresenta os *scores* de qualidade, sendo dividido conforme cores que indicam: verde (boa qualidade), laranja (qualidade razoável) e vermelho (baixa qualidade). (b) Após processadas pelo *cutadapt*, foi obtida uma maior proporção das *reads* com qualidade desejável, ainda que a partir dos ciclos 225-229 tenha ocorrido uma diminuição da qualidade, o que, no entanto, é comum para ensaios da *Illumina*.

1.2.2. Trimagem

Sequências de adaptadores, bem como bases diagnosticadas com baixo *Q-score* devem ser retiradas das extremidades das *reads*, em um processo referido como trimagem. As sequências obtidas podem ser trimadas de diversas maneiras: por tamanho, qualidade ou a partir de sequências conhecidas.

A trimagem por qualidade parte do princípio de que é preferível trabalhar com sequências menores de maior qualidade, removendo sequências de bases na extremidade da *read* que tenham uma qualidade abaixo do limite estabelecido como adequado. A partir do que pôde ser observado no relatório gerado pelo FastQC optou-se por realizar a trimagem apenas pelos adaptadores *paired-end TruSeq da Illumina* utilizados no sequenciamento.

No processo de sequenciamento *Illumina*, todos os *clusters* são sequenciados seguindo o número de ciclos previstos pelo kit de reagentes utilizado (no caso, 2x301 ciclos). Mesmo que um *cluster* inclua um pequeno fragmento a ser sequenciado, os ciclos de

sequenciamento não são interrompidos, continuando até alcançar o número total de ciclos. Como consequência, as *reads* geradas como *output* podem conter, além das sequências alvo (caso essas sejam menores que o número de ciclos), as sequências dos adaptadores do outro extremo do fragmento. Caso ainda restem ciclos após o sequenciamento dos adaptadores, leituras adicionais continuam sendo feitas, embora com qualidade extremamente baixa, uma vez que nucleotídeos inexistentes são aleatoriamente identificados (possivelmente devido à fluorescência de diferentes nucleotídeos não incorporados e não retirados durante a lavagem). Logo, é preciso encontrar e remover esses adaptadores, o que resultará, consequentemente, na remoção das bases incorporadas aleatoriamente.

Em função da construção realizada pelo *Haloplex* (*PCR primer --- Illumina adaptor --- TARGET --- Illumina adaptor --- Barcode --- PCR primer*), ao remover as sequências dos adaptadores de uma *read* podemos remover tudo o que existe depois dessas sequências, neste caso os *primers* da PCR e o *barcode*, quando presente.

A trimagem pelos adaptadores pode ser realizada com uso do *cutadapt* (MARTIN, 2011) utilizando a seguinte linha de comando (Tabela 1):

```
cutadapt -e 0.2 -a AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC -A
AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGTAGATCTCGGTGGTCGCCGTATCATT
-o
sample.trimmed.r1.fastq -p sample.trimmed.r2.fastq input.raw.r1.fastq input.raw.r2.fastq
```

Tabela 1: Descrição dos componentes da linha de comando executada no *cutadapt*

Comandos utilizados no <i>cutadapt</i>	Função do comando executado
-e 0.2	indica o nível máximo de tolerância de erros (<i>mismatches</i> , inserções e deleções) entre as sequências dos adaptadores e sequências presentes nas <i>reads</i> , para que uma sequência adaptadora seja efetivamente trimada.
-a	indica que o parâmetro a seguir se refere à sequência do adaptador <i>forward</i> .
-A	indica que o parâmetro a seguir se refere à sequência do adaptador <i>reverse</i> .
-o	indica o arquivo <i>output</i> da primeira <i>read</i> do par.
-p	indica o arquivo <i>output</i> da segunda <i>read</i> do par.

Tal procedimento resultou em melhorias significativas na qualidade média das *reads* processadas (Figura 1b).

1.2.3. Alinhamento ao genoma de referência

Estando as *reads* processadas, o próximo passo é mapeá-las contra um genoma de referência. A maior parte dos programas de alinhamento disponíveis usam um dentre os seguintes algoritmos de mapeamento: baseado em *hash* ou na transformação de Burrows-Wheeler (BWT). Estes algoritmos irão construir um arquivo de alinhamento com base nos dados de *single-end* e em uma análise seguinte utilizarão os dados de *paired-end* para refinar os alinhamentos gerados.

Para fazer o alinhamento pode ser utilizado o BWA (LI; DURBIN, 2009), o qual utiliza um algoritmo do tipo BWT, que tem como principal vantagem o menor consumo de memória. O BWA é um pacote de softwares, que consiste em três algoritmos, que são chamados por diferentes comandos: `aln/samse/sampe` para o BWA-backtrack, `bwasw` para o BWA-SW e `men` para o BWA-MEM.

Antes de realizar o alinhamento, porém, é preciso indexar o genoma de referência por meio do índice FM (FERRAGINA et al., 2004). Neste caso, utilizamos um genoma já indexado (*Homo sapiens*, UCSC, hg19), disponibilizado pela *Illumina* através do *iGenomes* em: https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/igenome.html. Pode-se também indexar localmente o genoma de interesse por meio de ferramentas específicas. Para tanto, é necessário gerar três diferentes arquivos, arquivo índice, arquivo fasta índice e um dicionário de sequência, os quais podem ser obtidos por meio dos programas BWA, Samtools e Picard, respectivamente.

O algoritmo utilizado para realizar o alinhamento é o BWA-MEM em função da sua especificidade para sequências com tamanho entre 70 e 1Mb e por ser mais rápido e acurado que o BWA-SW. A seguinte linha de comando deve ser utilizada (Tabela 2):

```
bwa mem -t 6 -R '@\R\G\tID:sampleID\tLB:sampleLB\tSM:tag\tPL:illumina\tPU:sample P'
/path/to/reference/hg19.fa
sample.trimmed.r1.fastq sample.trimmed.r2.fastq
> mapped.sample.sam
```

Tabela 2: Descrição dos componentes da linha de comando executada no BWA.

Comandos utilizados no BWA	Função do comando executado
-t	<i>number of threads</i> (número de processos com um endereço/espaco compartilhado no <i>Linux</i>).
-R	indica que o parâmetro a seguir se refere à linha do cabeçalho de determinado grupo de <i>reads</i> .
t	comando convertido em TAB no output SAM, a fim de separar adequadamente os campos.
\@ R G	identifica o cabeçalho de cada grupo de <i>reads</i> . Permite ainda que o arquivo BAM possa ser lido pelo GATK.
ID	identifica a qual grupo de <i>reads</i> cada <i>read</i> pertence. O ID permite que ao invés de ter que lidar com múltiplos grupos de dados, se passe a lidar com apenas um. Assim, a informação sobre o grupo de <i>reads</i> permite a identificação dos dados de diferentes experimentos, ainda que eles estejam combinados em um arquivo único. Cada linha @RG deve conter um ID único. Logo, todas as <i>reads</i> de um mesmo grupo são consideradas como parte da mesma corrida de sequenciamento e indicam a linha que ocupam nessa corrida. Por exemplo: ID: FLOWCELL1.LANE2.
LB	identificador da biblioteca de DNA.
SM	nome da amostra sequenciada em determinado grupo de <i>reads</i> . Todo dado que tiver um mesmo valor SM será tratado como pertencendo a uma mesma amostra.
PL	identifica a plataforma de sequenciamento utilizada.
PU	denominação alternativa do grupo de <i>reads</i> . Mantém a informação sobre a linha onde a amostra se encontra na <i>flow cell</i> . Essa designação não é exigida pelo GATK, mas prevalece sobre o ID caso seja executada uma recalibração de base.
/path/to/reference/hg19.fa	identifica o caminho a ser seguido para consulta ao genoma de referência
sample.trimmed.r1.fastq	<i>input</i> para o mapeamento, contendo a primeira <i>read</i> do par
sample.trimmed.r2.fastq	<i>input</i> para o mapeamento, contendo a segunda <i>read</i> do par
> mapped.sample.sam	indica o redirecionamento do resultado do mapeamento para o arquivo SAM especificado.

Como *output* do comando acima é gerado um arquivo SAM (*.sam). Porém, uma vez que os arquivos SAM são arquivos de texto que ocupam muito espaço no disco rígido, e para que as informações sobre mapeamento pudessem ser visualizadas, esse arquivo pode ser convertido para o formato BAM (*.bam).

1.2.3.1. SAM

O formato SAM (*Sequencing Alignment/Map*) (LI et al., 2009) é um arquivo baseado em texto, utilizado como *output* por diversos programas de alinhamento. Cada linha no arquivo SAM armazena informações sobre uma *read* mapeada contra um genoma de referência.

Arquivos SAM possuem uma seção com o cabeçalho (que é opcional) e uma seção de alinhamento. As linhas no cabeçalho iniciam com “@” seguido por um código de duas letras. Por sua vez, cada *read* alinhada à referência é representada em uma linha da seção de alinhamento.

Podem estar presentes ainda linhas opcionais com marcações predefinidas (*The SAM/BAM Format Specification Working Group, Sequence Alignment/Map Format Specification*, 2015, <http://samtools.github.io/hts-specs/SAMv1.pdf>). Algumas destas marcações são geradas pelo BWA (aquelas começando com “X”).

1.2.3.2. BAM

O formato BAM (*Binary Alignment/Map*) é a versão binária compactada de um arquivo SAM, indexável e amplamente utilizado para representar as sequências após o alinhamento. A compactação em blocos (chamada BGZF) de um arquivo BAM permite além da diminuição do espaço de armazenamento o carregamento parcial do arquivo, o que é bastante utilizado em programas de visualização como o IGV ou o *UCSC Genome Browser*.

A conversão do arquivo SAM em BAM gera um arquivo com as mesmas informações e pode ser realizada através do programa *SAMtools* (<http://samtools.sourceforge.net/>), o qual fornece diversas ferramentas para manipulação desses arquivos.

Para visualizar o arquivo BAM e permitir sua utilização pelos *softwares* de determinação de variantes, é preciso ordenar os alinhamentos de acordo com a posição genômica. O comando a seguir é utilizado para realizar a conversão de SAM em BAM e a ordenação do arquivo BAM:

```
samtools sort mapped.sample.sam sorted.mapped.sample.bam
```

O nome do arquivo gerado pelo comando seguiu o formato a seguir, onde PIG0001 representa o nome da amostra e *sorted* indica que o arquivo BAM gerado se encontra ordenado:

PIG0001.sorted.bam

Arquivos BAM armazenam as mesmas informações que um arquivo SAM e possuem uma seção de cabeçalho, que contém informações gerais sobre o arquivo como nome, tamanho da amostra, método de alinhamento utilizado e uma seção com o alinhamento propriamente dito contendo nome, sequência e qualidade da *read*, além de marcações personalizadas.

Os arquivos BAM devem ainda ser indexados, permitindo uma pesquisa rápida no arquivo ordenado. Um índice de correspondência do arquivo BAM em questão em relação às coordenadas de referência será identificado pela terminação (*.bam.bai). O comando a seguir permitiu gerar um arquivo indexado:

```
samtools index sorted.mapped.sample.bam
```

O *output* do comando acima pode ser nomeado como a seguir:

PIG0001.sorted.bam.bai

Uma vez ordenados e indexados, os arquivos BAM puderam ser visualizados através de um visualizador externo. Neste trabalho utilizamos o *Integrative Genomics Viewer* (IGV) 2.3.67, um programa em java disponibilizado pelo *Broad Institute* (ROBINSON et al., 2011; THORVALDSDOTTIR; ROBINSON; MESIROV, 2013).

1.3. Análise terciária

1.3.1. Determinação de variantes

Em um projeto de sequenciamento, o passo seguinte ao mapeamento é a detecção das diferenças entre as regiões genômicas sequenciadas e o genoma de referência (determinação de variantes). Um programa amplamente utilizado para análise dos dados de NGS é o *Genome Analysis Toolkit* (GATK) v.3.5, disponibilizado pelo *Broad Institute* (DEPRISTO et al., 2011; MCKENNA et al., 2010a; VAN DER AUWERA et al., 2013).

O programa apresenta uma estrutura modular e é dividido em diversas análises, as quais são reunidas junto a um *framework* em um arquivo java (*.jar). Para ter acesso à lista de análises disponíveis é utilizado o comando:

```
java -jar GenomeAnalysisTK.jar
```

Já para realizar uma análise específica é utilizado o comando:

```
java -jar GenomeAnalysisTK.jar -T <analysis> <arguments*>
```

Para realizar a determinação de SNPs e indels as ferramentas *HaplotypeCaller* com o parâmetro `--emitRefConfidence GVCF` e *UnifiedGenotyper* do GATK podem ser utilizadas. O *HaplotypeCaller* considera simultaneamente todas as amostras a serem analisadas e, ao encontrar uma região apresentando sinais de variação (região ativa), o programa descarta o mapeamento preexistente e realiza uma remontagem das *reads* naquela região. O programa realinha então cada sequência contra a sequência de referência com o objetivo de identificar potenciais sítios de variação.

Comparado ao *UnifiedGenotyper*, o *HaplotypeCaller* possibilita a nomeação de SNPs e indels de forma simultânea. Isso permite que o *HaplotypeCaller* seja mais preciso quando lidando com regiões reconhecidamente problemáticas, como por exemplo, onde são encontrados diferentes tipos de variações próximas umas das outras (VAN DER AUWERA et al., 2013).

Por outro lado, o *UnifiedGenotyper* possui filtros menos restritivos que possibilitam encontrar variantes com frequências populacionais mais baixas, principalmente em áreas de baixa cobertura, como *singletons* e alelos raros em polimorfismos multialélicos. Porém, essa característica pode resultar em uma taxa alta de falsos positivos. Além disso, essa ferramenta faz a leitura das sequências ponto a ponto, não sendo aplicável à identificação de indels. Por essas e outras razões, o próprio site do GATK descontinuou as atualizações e aposentou a ferramenta *UnifiedGenotyper* recomendando o uso do *HaplotypeCaller* em seu lugar.

Devido a utilização do parâmetro `--emitRefConfidence GVCF`, é gerado para cada amostra separadamente um arquivo gVCF (do inglês, *genomic variant calling format*), onde estão dispostas um registro para cada posição (ou intervalo de interesse) independentemente de uma variante ser detectada naquele sítio ou não. O uso do gVCF é importante pois permite a adição de outros conjuntos de amostra, caso necessite realizar uma análise conjunta. Desta forma, pode-se adicionar os arquivos gVCFs de diferentes coortes e realizar a análise de

chamada de variantes simultaneamente nestes conjuntos de amostra, aumentando a acurácia nesta determinação.

As seguintes linhas de comando são utilizadas para realizar a nomeação das variantes (Tabela 3):

HaplotypeCaller:

```
java -jar GenomeAnalysisTK.jar \
  -R reference.fasta \
  -T HaplotypeCaller \
  -I listofsamples.list \
  --emiteRefConfidence GVCF \
  --dbsnp dbSNP.vcf \
  -L targets.interval_list \
  -o output.raw.snps.indels.g.vcf \
  --dontUseSoftClippedBases \
  -drf DuplicateRead
```

UnifiedGenotyper:

```
java -jar GenomeAnalysisTK.jar \
  -T UnifiedGenotyper \
  -R reference.fasta \
  -I sample1.bam [-I sample2.bam ...] \
  --dbsnp dbSNP.vcf \
  -o snps.raw.vcf \
  -stand_call_conf [50.0] \
  -stand_emit_conf 10.0 \
  [-L targets.interval_list]
```

Tabela 3: Descrição dos componentes da linha de comando executada no GATK

Comandos utilizados no GATK	Função do comando executado
-R	indica o arquivo com o genoma de referência
-T	indica qual ferramenta do GATK será utilizada, isto é, <i>HaplotypeCaller</i> ou <i>UnifiedGenotyper</i>
-I	indica arquivo de texto com lista de amostras (formato BAM) a ser utilizado pelo GATK

--dbsnp	indica arquivo (dbSNP.vcf) contendo a identificação dos rs de cada ponto de variação oficialmente descrito, a ser utilizada para preenchimento da coluna ID do <i>output</i>
-stand_call_conf	é o limiar mínimo de confiança (na escala Phred) utilizado para separar determinações de genótipo realizadas com maior e menor confiança. Apenas determinações de genótipo emitidas com confiança \geq limiar mínimo são consideradas. O valor default recomendado é de 30

Continuação Tabela 3: Descrição dos componentes da linha de comando executada no GATK

Comandos utilizados no GATK	Função do comando executado
-stand_emit_conf	permite emitir determinações de genótipo com baixa qualidade como resultados filtrados
--emitRefConfidence GVCF	indica a produção do arquivo g.vcf para o <i>HaplotypeCaller</i>
-L	direciona o GATK a restringir o processamento dos dados aos intervalos genômicos especificados em um arquivo “ <i>targets.interval_list</i> ”, que indica o cromossomo e as coordenadas das posições de início e fim em relação ao genoma de referência
-o	indica o <i>output</i> , que é um arquivo VCF ou gVCF (<i>Variant Call Format</i>) contendo os sítios que o algoritmo (<i>UnifiedGenotyper</i> ou <i>HaplotypeCaller</i> , respectivamente) identificou como sendo variáveis
--dontUseSoftClippedBases	direciona o programa a não analisar bases <i>soft clipped</i> (bases não alinhadas nas extremidades das <i>reads</i>), o que diminui a determinação de falso-positivos
-drf	desabilita a aplicação de filtros à análise (<i>DuplicateRead</i> neste caso).

Após gerar os arquivos g.vcf para cada amostra um passo é realizado para combinar os arquivos em um único arquivo vcf com a linha de comando:

```
java -jar GenomeAnalysisTK.jar \
  -T GenotypeGVCFs \
  -R reference.fasta \
  -I listofsamples.list \
  -o cohort.g.vcf
```

Tabela 4: Descrição dos componentes da linha de comando executada no GATK

Comandos utilizados no GATK	Função do comando executado
-R	indica o arquivo com o genoma de referência
-T	indica qual ferramenta do GATK será utilizada, isto é, <i>GenotypeGVCFs</i>
-I	indica arquivo de texto com lista de amostras (formato BAM) a ser utilizado pelo GATK
-o	indica o <i>output</i> , que é um arquivo gVCF (<i>Variant Call Format</i>) contendo os sítios que o algoritmo (<i>HaplotypeCaller</i>) identificou como sendo variáveis

1.3.1.1. VCF

O VCF é um formato de arquivo que contém informações sobre variantes encontradas em posições específicas em relação a um genoma de referência. O arquivo VCF possui um cabeçalho, bastante útil, uma vez que contém uma descrição para os campos contidos no arquivo (Tabela 5):

Tabela 5: Descrição dos componentes da seção de cabeçalho de um arquivo VCF

Informações presentes no cabeçalho	Descrição das abreviações apresentadas
Fileformat	versão do formato de arquivo e a versão do <i>variant caller</i> utilizado
FILTER	identifica quais filtros são aplicados aos dados
FORMAT e INFO	essas linhas definem as anotações contidas nas colunas correspondentes a essas informações no arquivo VCF
GATKCommandLine	contém a linha de comando utilizada pelo GATK para realizar a genotipagem das amostras. Essa linha de comando especifica todos os parâmetros utilizados pelo <i>variant caller</i> , incluindo os nomes do arquivo com o genoma de referência e do arquivo BAM
Contig lines e Reference	contém informações como os nomes dos fragmentos, tamanho e genoma de referência que é utilizado como <i>input</i> para gerar o arquivo BAM

Além do cabeçalho, um arquivo VCF contém as linhas com os dados das amostras, onde estão contidas em cada linha informações sobre uma única variante. As linhas com os dados são listadas seguindo o designado no cabeçalho do arquivo VCF. As oito primeiras colunas do arquivo (até INFO) representam as propriedades observadas dos sítios variantes (ou invariantes). Informações específicas à amostra são apresentadas na coluna FORMAT e nas seguintes.

As nove primeiras colunas são necessárias para o formato VCF, ainda que possam estar vazias. As informações contidas em cada coluna estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6: Descrição dos componentes do corpo de um arquivo VCF

Informações presentes no corpo do arquivo	Descrição das abreviações apresentadas
CHROM e POS	contém as coordenadas genômicas nas quais as variantes ocorrem
ID	campo opcional, cujo conteúdo se baseia nas informações contidas em um banco de dados de referência como o dbSNP
REF e ALT	identificam o alelo referência e alternativo(s) observado(s) na(s) amostra(s). No caso de inserções, o alelo ALT fornece a sequência inserida, bem como a base anterior à inserção. Para deleções, o alelo ALT é representado pela base anterior à deleção
QUAL	é a probabilidade de que um polimorfismo (REF/ALT) exista de fato neste local indicado. No entanto, por ser este valor dependente da quantidade de dados analisada ele não representa uma medida útil para avaliação da qualidade de determinação de uma variante
FILTER	esse campo contém os filtros aplicados aos dados analisados. Se a variante passou pelos filtros aplicados o valor indicado é PASS. Caso nenhum filtro tenha sido aplicado será indicado “.”
INFO	informações descrevendo cada variante
DB	associado ao dbSNP
H3	associado ao HapMap3
VALIDATED	validado por experimentos contínuos
NA	número total de alelos nos genótipos identificados
AC	contagem alélica dentre os genótipos do alelo ALT, na mesma ordem em que listados
SVTYPE	tipo de variante estrutural (DEL para deleção, DUP para duplicação, INV para inversão)
END	posição final ocupada pela variante
IMPRECISE	indica que a posição ocupada pela variante não é precisa
CIPOS/CIEND	intervalo de confiança em torno da posição e posição final para variantes localizadas com baixa precisão
FORMAT	fornece a ordem das informações contidas nas colunas seguintes (amostras):
GT	indica o genótipo da amostra em cada sítio. Em diploides, são indicados os dois alelos de cada indivíduo, sendo “0” indicativo do alelo referência e “1” do alelo alternativo. O separador (/) indica que os genótipos não estão faseados e () indica genótipos em fase
AD	representa o número de <i>reads</i> que dá suporte a cada um dos alelos (alternativo e/ou referência) reportados

DP	indica o número total de <i>reads</i> que representam o genótipo reportado
GQ	indica qual a confiança (escala Phred) da determinação de genótipo realizada. Valores muito baixos são indicativos de pouca confiança no genótipo identificado
PL	é a probabilidade normalizada dos genótipos possíveis ou a probabilidade de o genótipo não estar correto. Assim, quanto menor o valor apresentado aqui, melhor
HP	identificadores de haplótipos eventualmente determinados pelo <i>ReadBackedPhasing</i>
PQ	qualidade de faseamento de haplótipos eventualmente determinados pelo <i>ReadBackedPhasing</i>

1.3.2. Remoção de genótipos de baixa qualidade

Alguns dos genótipos considerados pelo *HaplotypeCaller* e *UnifiedGenotyper* podem não ser verdadeiros, principalmente quando a genotipagem se refere a um segmento com baixa cobertura de sequenciamento ou quando, no caso de genótipos heterozigotos, um dos alelos é pouco representado.

Visando diminuir a taxa de falso-positivos, genótipos de baixa cobertura são interrogados, tomando como *input* o arquivo VCF obtido pelo *HaplotypeCaller* e *UnifiedGenotyper*.

Neste processo, o arquivo VCF é tratado pela ferramenta VCFx (versão 1.0) (CASTELLI et al., 2015), disponível em http://www.castelli-lab.net/apps/apps_vcfx.php, que interroga alelos segundo as regras:

- Para genótipos homozigotos inferidos em segmentos cobertos por oito ou menos *reads*, é introduzido um alelo interrogado (*vcfx alpha* = 8). A definição final desse tipo de genótipo (homozigoto ou heterozigoto) será inferida posteriormente.
- Genótipos heterozigotos em que um dos alelos está altamente subrepresentado (proporção de *reads* igual ou menor que 1%), são considerados homozigotos para o alelo mais representado (*vcfx beta* = 0.01). Esse procedimento minimiza a influência de *reads* mapeadas incorretamente e da alta taxa de erros de sequenciamento geralmente introduzidos em dados de NGS. Essa correção só pode ser aplicada em situações de alta cobertura (100 ou mais *reads*).
- Para genótipos heterozigotos em que um dos alelos está relativamente subrepresentado (proporção de *reads* entre 1% e 20%), um alelo interrogado é introduzido representando o alelo subrepresentado (*vcfx delta* = 0.20). A definição

final desse tipo de genótipo (homozigoto ou heterozigoto) será inferida posteriormente.

- Para genótipos heterozigotos inferidos com no máximo cinco *reads* em que um dos alelos está subrepresentado (Proporção de *reads* ente 20% e 40%), um alelo interrogado é inserido representando o alelo subrepresentado. No entanto, quando os dois alelos têm a mesma representatividade, ambos são considerados interrogados (*vcfx gamma* = 0.50). A definição final desse tipo de genótipo (homozigoto ou heterozigoto) será inferida posteriormente.

A linha de comando utilizada no VCFx é indicada a seguir:

```
vcfx checkpl input=input.vcf output=output.vcf
```

Após a análise pelo VCFx, se forem realizadas análises por ambas as ferramentas (*HaplotypeCaller* e *UnifiedGenotyper*) as variantes que apresentaram genótipos distintos nos dois arquivos VCF obtidos através do *HaplotypeCaller* e *UnifiedGenotyper*, são analisadas manualmente para (a) verificar qual dos dois algoritmos fez a identificação correta do genótipo e (b) nos casos de genótipos interrogados por somente um dos algoritmos, para resolver variantes que são interrogadas por conta do número de *reads* consideradas pelos algoritmos, principalmente no caso do *HaplotypeCaller* que, devido aos filtros extremamente rigorosos, acaba descartando um número considerável de *reads* de suas análises. Para isso, é preciso analisar os arquivos BAM das amostras nos pontos interrogados. Como descrito anteriormente, o programa IGV pode ser utilizado para a visualização, avaliação de qualidade e contagem das *reads* alternativas que cobrem determinada posição. Considerando somente as bases chamadas com qualidade mínima Q30 em *reads* mapeadas com qualidade mínima Q30, as regras empregadas pelo VCFx são novamente aplicadas, agora manualmente para determinar se essas variantes continuariam interrogadas ou se seriam resolvidas.

Após essa etapa de maturação do arquivo, as informações contidas nos dois arquivos são unidas em um único arquivo VCF (VCF consenso) que é utilizado nas análises posteriores.

Após a análise pelo VCFx, se apenas a ferramenta *HaplotypeCaller* com o parâmetro `--emitRefConfidence GVCF` foi utilizada, os pontos de variação interrogados das amostras devem ser visualizados no programa IGV. É preciso analisar os arquivos BAMs destas amostras para avaliar a qualidade e contagem de *reads* alternativas que cobrem determinada

posição (interrogada pelo programa VCFx). Isto porque o *HaplotypeCaller* aplica filtros extremamente rigorosos, descartando um número considerável de *reads* para suas análises. Portanto, analisar ponto a ponto os arquivos BAM muitas vezes pode auxiliar na compreensão do porquê as variantes foram interrogadas pelo programa VCFx.

Após a maturação manual o arquivo VCF é atualizado manualmente nas posições onde houveram alelos interrogados reavaliados e resolvidos.

9. 2. REFERÊNCIAS

ABDEL-MALEK, Z. A. et al. The enigma and challenges of vitiligo pathophysiology and treatment. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 33, n. 6, p. 778–787, 2020.

ABEGAZ, F. et al. Performance of model-based multifactor dimensionality reduction methods for epistasis detection by controlling population structure. **BioData Mining**, v. 14, n. 1, p. 16, 2021.

ADAMEYKO, I. et al. Sox2 and Mitf cross-regulatory interactions consolidate progenitor and melanocyte lineages in the cranial neural crest. **Development**, v. 139, n. 2, p. 397–410, 2012.

AGRAWAL, S. et al. Comparison of Oxidant-Antioxidant Status in Patients with Vitiligo and Healthy Population. **Kathmandu University Medical Journal**, v. 12, n. 2, p. 132–136, 2015.

AL-SHOBAILI, H. A. Update on the genetics characterization of vitiligo. **International journal of health sciences**, v. 5, n. 2, p. 167–79, 2011.

ALENIZI, D. Consanguinity pattern and heritability of Vitiligo in Arar, Saudi Arabia. **Journal of Family and Community Medicine**, v. 21, n. 1, p. 13, 2014.

ALEXANDER, D. H.; LANGE, K. Enhancements to the ADMIXTURE algorithm for individual ancestry estimation. **BMC Bioinformatics**, v. 12, n. 1, p. 246, 2011.

ALEXANDER, D. H.; NOVEMBRE, J.; LANGE, K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. **Genome Research**, v. 19, n. 9, p. 1655–1664, 2009.

ALIKHAN, A. et al. Vitiligo: A comprehensive overview. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 65, n. 3, p. 473–491, 2011.

ALKHATEEB, A. et al. Epidemiology of Vitiligo and Associated Autoimmune Diseases in Caucasian Probands and Their Families. **Pigment Cell Research**, v. 16, n. 3, p. 208–214, 2003.

ALZOLIBANI, A. Genetic epidemiology and heritability of vitiligo in the Qassim region of Saudi Arabia. **Acta dermatovenerologica Alpina, Pannonica, et Adriatica**, v. 18, n. 3, p. 119–25, 2009.

ANDERSON, A. E. et al. Tgif1 and Tgif2 Repress Expression of the RabGAP Evi5l. **Molecular and Cellular Biology**, v. 37, n. 5, 2017.

ANDRADE, R. B. et al. Estimating Asian Contribution to the Brazilian Population: A New Application of a Validated Set of 61 Ancestry Informative Markers. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 8, n. 11, p. 3577–3582, 2018.

ANDREWS S. **FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.**, 2010.

ARCOS-BURGOS, M. et al. Vitiligo: complex segregation and linkage disequilibrium

analyses with respect to microsatellite loci spanning the HLA. **Human Genetics**, v. 110, n. 4, p. 334–342, 2002.

ARONOFF, S. Catalase: Kinetics of Photooxidation. **Science**, v. 150, n. 3692, p. 72–73, 1965.

ARORA, N.; SIDDIQUI, E. M.; MEHAN, S. Involvement of adenylate cyclase/cAMP/CREB and SOX9/MITF in melanogenesis to prevent vitiligo. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 476, n. 3, p. 1401–1409, 2021.

AUDE-GARCIA, C. et al. Dual roles for MEF2A and MEF2D during human macrophage terminal differentiation and c-Jun expression. **Biochemical Journal**, v. 430, n. 2, p. 237–244, 2010.

BAHARAV, E. et al. Tyrosinase as an autoantigen in patients with vitiligo. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 105, n. 1, p. 84–88, 1996.

BATCIOGLU, K. et al. Comparison of plasma malondialdehyde, glutathione, glutathione peroxidase, hydroxyproline and selenium levels in patients with vitiligo and healthy controls. **Indian Journal of Dermatology**, v. 53, n. 3, p. 106, 2008.

BERGQVIST, C.; EZZEDINE, K. Vitiligo: A Review. **Dermatology**, v. 236, n. 6, p. 571–592, 2020.

BERGSTRÖM, A. et al. Insights into human genetic variation and population history from 929 diverse genomes. **Science**, v. 367, n. 6484, p. eaay5012, 2020.

BERSON, J. F. et al. Pmel17 Initiates Premelanosome Morphogenesis within Multivesicular Bodies. **Molecular Biology of the Cell**, v. 12, n. 11, p. 3451–3464, 2001.

BERTOLOTI, A. et al. Type I interferon signature in the initiation of the immune response in vitiligo. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 27, n. 3, p. 398–407, 2014.

BIN, B.-H. et al. Membrane-Associated Transporter Protein (MATP) Regulates Melanosomal pH and Influences Tyrosinase Activity. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0129273, 2015.

BOULON, S. et al. Oct-1 Potentiates CREB-Driven Cyclin D1 Promoter Activation via a Phospho-CREB- and CREB Binding Protein-Independent Mechanism. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 22, p. 7769–7779, 2002.

BOYLE, A. P. et al. Annotation of functional variation in personal genomes using Regulome DB. **Genome Research**, v. 22, n. 9, p. 1790–1797, 2012.

BRUSERUD, Ø. et al. AIRE-mutations and autoimmune disease. **Current Opinion in Immunology**, v. 43, p. 8–15, 2016.

BUSCH, A.; RICHTER, A. S.; BACKOFEN, R. IntaRNA: efficient prediction of bacterial sRNA targets incorporating target site accessibility and seed regions. **Bioinformatics**, v. 24, n. 24, p. 2849–2856, 2008.

CASTELLI, E. C. et al. HLA-E coding and 3' untranslated region variability determined by next-generation sequencing in two West-African population samples. **Human Immunology**, v. 76, n. 12, p. 945–953, 2015.

CASTRO, C. C. S. DE; MIOT, H. A. Prevalence of vitiligo in Brazil-A population survey. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 31, n. 3, p. 448–450, 2018.

CHAI, J.; TARNAWSKI, A. S. Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 53, n. 2, p. 147–57, 2002.

CHAITANYA, L. et al. The HirisPlex-S system for eye, hair and skin colour prediction from DNA: Introduction and forensic developmental validation. **Forensic Science International: Genetics**, v. 35, n. April, p. 123–135, 2018.

CHER, C. (FIELD A. S. Bioanalyzer Applications for Next Gen Sequencing : Updates and Tips. p. 1–49, 2011.

CHOI, H. et al. Primary Cilia Negatively Regulate Melanogenesis in Melanocytes and Pigmentation in a Human Skin Model. **PLOS ONE**, v. 11, n. 12, p. e0168025, 2016.

CUI, T.-T. et al. miR-196a-2 rs11614913 polymorphism is associated with vitiligo by affecting heterodimeric molecular complexes of Tyr and Tyrp1. **Archives of**

D'ORAZIO, J. et al. UV radiation and the skin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 6, p. 12222–12248, 2013.

DAMMAK, I. et al. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation at the tissue level in patients with stable and active vitiligo. **International Journal of Dermatology**, v. 48, n. 5, p. 476–480, 2009.

DAS, S. K. et al. Studies on vitiligo. II. Familial aggregation and genetics. **Genetic Epidemiology**, v. 2, n. 3, p. 255–262, 1985.

DELL'ANNA, M. L. et al. Alterations of Mitochondria in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Vitiligo Patients. **Pigment Cell Research**, v. 16, n. 5, p. 553–559, 2003.

DEMIROVIC, D. et al. Differential translocation of heat shock factor-1 after mild and severe stress to human skin fibroblasts undergoing aging in vitro. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 8, n. 4, p. 333–339, 2014.

DENAT, L. et al. Melanocytes as Instigators and Victims of Oxidative Stress. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 6, p. 1512–1518, 2014.

DEPRISTO, M. A. et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. **Nature Genetics**, v. 43, n. 5, p. 491–498, 2011.

DI LEVA, G.; CROCE, C. M. MiRNA profiling of cancer. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 23, n. 1, p. 3–11, 2013.

DONG, D. et al. Comparison of responses of melanocyte lineages from p75(+) and p75(–) human scalp-derived neural crest stem cells under phototherapy. **Lasers in Medical Science**, v. 36, n. 1, p. 139–146, 2021.

EWING, B. et al. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 175–185, 1998.

FERRAGINA, P. et al. An Alphabet-Friendly FM-Index. p. 150–160, 2004.

FLESHER, J. L. et al. Delineating the role of MITF isoforms in pigmentation and tissue homeostasis. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 33, n. 2, p. 279–292, 2020.

FREZZATO, F. et al. HSP70/HSF1 axis, regulated via a PI3K/AKT pathway, is a druggable target in chronic lymphocytic leukemia. **International Journal of Cancer**, v. 145, n. 11, p. 3089–3100, 2019.

FRIEDMAN, J. R.; KAESTNER, K. H. The Foxa family of transcription factors in development and metabolism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 19–20, p. 2317–2328, 2006.

GALLANT, S.; GILKESON, G. ETS transcription factors and regulation of immunity. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 54, n. 3, p. 149–163, 2006.

GIOVANNELLI, L. et al. Increased oxidative DNA damage in mononuclear leukocytes in vitiligo. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 556, n. 1–2, p. 101–106, 2004.

GIRAUD, M. et al. Aire unleashes stalled RNA polymerase to induce ectopic gene expression in thymic epithelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 2, p. 535–540, 2012.

GODING, C. R.; ARNHEITER, H. MITF—the first 25 years. **Genes & Development**, v. 33, n. 15–16, p. 983–1007, 2019.

GÓTH, L.; NAGY, T. Inherited catalase deficiency: Is it benign or a factor in various age related disorders? **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 753, n. 2, p. 147–154, 2013.

GRIFFITHS-JONES, S. et al. miRBase: microRNA sequences, targets and gene

nomenclature. **Nucleic acids research**, v. 34, n. Database issue, p. D140-4, 2006.

HAFEZ, M.; SHARAF, L.; ABD EL-NABI, S. M. The genetics of vitiligo. **Acta dermatovenereologica**, v. 63, n. 3, p. 249–51, 1983.

HARRIS, J. E. et al. A Mouse Model of Vitiligo with Focused Epidermal Depigmentation

Requires IFN- γ for Autoreactive CD8⁺ T-Cell Accumulation in the Skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 7, p. 1869–1876, 2012.

HARRIS, M. L. et al. Sox proteins in melanocyte development and melanoma. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 23, n. 4, p. 496–513, 2010.

HELLWEGE, J. N. et al. Population Stratification in Genetic Association Studies. **Current Protocols in Human Genetics**, v. 95, n. 1, p. 1.22.1-1.22.23, 2017.

HERSHEY, C. L.; FISHER, D. E. Genomic analysis of the Microphthalmia locus and identification of the MITF-J/Mitf-J isoform. **Gene**, v. 347, n. 1, p. 73–82, 2005.

HOASHI, T. et al. MART-1 Is Required for the Function of the Melanosomal Matrix Protein PMEL17/GP100 and the Maturation of Melanosomes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 14, p. 14006–14016, 2005.

HORNYAK, T. J. et al. Mitf dosage as a primary determinant of melanocyte survival after ultraviolet irradiation. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 22, n. 3, p. 307–318, 2009.

HUNTZINGER, E.; IZAURRALDE, E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. **Nature reviews. Genetics**, v. 12, n. 2, p. 99–110, 2011.

JACOB, C. et al. HDAC1 and HDAC2 Control the Specification of Neural Crest Cells into Peripheral Glia. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 17, p. 6112–6122, 2014.

JIMBOW, K. et al. Increased sensitivity of melanocytes to oxidative stress and abnormal expression of tyrosinase-related protein in vitiligo. **British Journal of Dermatology**, v. 144, n. 1, p. 55–65, 2001.

JIN, Y. et al. NALP1 in Vitiligo-Associated Multiple Autoimmune Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 12, p. 1216–1225, 2007.

JIN, Y. et al. Variant of TYR and Autoimmunity Susceptibility Loci in Generalized Vitiligo. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 18, p. 1686–1697, 2010a.

JIN, Y. et al. Common variants in FOXP1 are associated with generalized vitiligo. **Nature Genetics**, v. 42, n. 7, p. 576–578, 2010b.

JIN, Y. et al. Common variants in FOXP1 are associated with generalized vitiligo. **Nature Genetics**, v. 42, n. 7, p. 576–578, 2010c.

JIN, Y. et al. Genome-wide association analyses identify 13 new susceptibility loci for generalized vitiligo. **Nature Genetics**, v. 44, n. 6, p. 676–680, 2012.

JIN, Y. et al. Genome-wide association studies of autoimmune vitiligo identify 23 new risk loci and highlight key pathways and regulatory variants. **Nature Genetics**, v. 48, n. 11, p. 1418–1424, 2016.

JOHN, B. et al. Human MicroRNA targets. **PLoS biology**, v. 2, n. 11, p. e363, 2004a.

JOHN, B. et al. Human MicroRNA Targets. **PLoS Biology**, v. 2, n. 11, p. e363, 2004b.

JOYCE, C. E. et al. Deep sequencing of small RNAs from human skin reveals major alterations in the psoriasis miRNAome. **Human Molecular Genetics**, v. 20, n. 20, p. 4025–4040, 2011.

KANG, J. et al. A general mechanism for transcription regulation by Oct1 and Oct4 in response to genotoxic and oxidative stress. **Genes & Development**, v. 23, n. 2, p. 208–222, 2009.

KANG, M. C. et al. UP256 Inhibits Hyperpigmentation by Tyrosinase  Expression/Dendrite Formation via Rho-Dependent  Signaling and by Primary Cilium Formation  in Melanocytes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 15, p. 5341, 2020.

KEMP, E. H. et al. Immunoprecipitation of melanogenic enzyme autoantigens with vitiligo sera: evidence for cross-reactive autoantibodies to tyrosinase and tyrosinase-related protein-

2 (TRP-2). **Clinical & Experimental Immunology**, v. 109, n. 3, p. 495–500, 1997.

KIM, E. et al. MITF Expression Predicts Therapeutic Vulnerability to p300 Inhibition in

Human Melanoma. **Cancer Research**, v. 79, n. 10, p. 2649–2661, 2019.

KINGO, K. et al. Gene expression analysis of melanocortin system in vitiligo. **Journal of Dermatological Science**, v. 48, n. 2, p. 113–122, 2007.

KITAMURA, R. et al. Mechanisms underlying the dysfunction of melanocytes in vitiligo epidermis: role of SCF/KIT protein interactions and the downstream effector, MITF-M. **The Journal of Pathology**, v. 202, n. 4, p. 463–475, 2004.

KOCA, R. et al. Oxidant-antioxidant enzymes and lipid peroxidation in generalized vitiligo. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 29, n. 4, p. 406–409, 2004.

KOSTYUK, V. A. et al. Dysfunction of Glutathione S-Transferase Leads to Excess 4-Hydroxy-2-Nonenal and H₂O₂ and Impaired Cytokine Pattern in Cultured Keratinocytes and Blood of Vitiligo Patients. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 13, n. 5, p. 607–620, 2010.

KRÜGER, C.; SCHALLREUTER, K. U. A review of the worldwide prevalence of vitiligo in children/adolescents and adults. **International Journal of Dermatology**, v. 51, n. 10, p. 1206–1212, 2012.

LAMBERT, M. W. et al. The physiology of melanin deposition in health and disease. **Clinics in Dermatology**, v. 37, n. 5, p. 402–417, 2019.

LE GAL, F.-A. et al. Direct Evidence to Support the Role of Antigen-Specific CD8⁺ T Cells in Melanoma-Associated Vitiligo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 117, n. 6, p. 1464–1470, 2001.

LEE, N.; KIM, D.; KIM, W.-U. Role of NFAT5 in the Immune System and Pathogenesis of Autoimmune Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 2019.

LEWIS, B. P. et al. 33-Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. **Cell**, v. 115, n. 7, p. 787–798, 2003.

LI, H. et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. **Bioinformatics**, v. 25, n. 16, p. 2078–2079, 2009.

LI, H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. 2013.

LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics**, v. 25, n. 14, p. 1754–1760, 2009.

LISHOUT, F. VAN et al. An efficient algorithm to perform multiple testing in epistasis screening. **BMC Bioinformatics**, v. 14, n. 1, p. 138, 2013.

LISHOUT, F. VAN et al. gammaMAXT: a fast multiple-testing correction algorithm. **BioData Mining**, v. 8, n. 1, p. 36, 2015.

LIU, X.-M. et al. Maintenance of immune hyporesponsiveness to melanosomal proteins by DHICA-mediated antioxidation: Possible implications for autoimmune vitiligo. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, n. 9, p. 1177–1185, 2011.

LOH, P.-R. et al. Reference-based phasing using the Haplotype Reference Consortium panel. **Nature Genetics**, v. 48, n. 11, p. 1443–1448, 2016.

MA, W. et al. Reprogramming Retinal Pigment Epithelium to Differentiate Toward Retinal Neurons with Sox2. **Stem Cells**, v. 27, n. 6, p. 1376–1387, 2009.

MACHADO FILHO, C. D. DOS S. et al. Vitiligo: analysis of grafting versus curettage alone, using melanocyte morphology and reverse transcriptase polymerase chain reaction for tyrosinase mRNA. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 123, n. 4, p. 187–191, 2005.

MALCOV-BROG, H. et al. UV-Protection Timer Controls Linkage between Stress and Pigmentation Skin Protection Systems. **Molecular Cell**, v. 72, n. 3, p. 444–456.e7, 2018.

MAPLES, B. K. et al. RFMix: A Discriminative Modeling Approach for Rapid and Robust Local-Ancestry Inference. **The American Journal of Human Genetics**, v. 93, n. 2, p. 278–288, 2013.

- and to promote differentiation. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 11, p. 6442–6458, 2017.
- MARESCA, V. et al. Increased Sensitivity to Peroxidative Agents as a Possible Pathogenic Factor of Melanocyte Damage in Vitiligo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 109, n. 3, p. 310–313, 1997.
- MARÍN, R. M.; VANÍEK, J. Efficient use of accessibility in microRNA target prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 1, p. 19–29, 2011.
- MAROÑAS, O. et al. Development of a forensic skin colour predictive test. **Forensic Science International: Genetics**, v. 13, p. 34–44, 2014.
- MARTIN, A. R. et al. Human Demographic History Impacts Genetic Risk Prediction across Diverse Populations. **The American Journal of Human Genetics**, v. 100, n. 4, p. 635–649, 2017.
- MARTIN, K. A. et al. A Competitive Mechanism of CArG Element Regulation by YY1 and SRF: Implications for Assessment of Phox1/MHox Transcription Factor Interactions at CArG Elements. **DNA and Cell Biology**, v. 16, n. 5, p. 653–661, 1997.
- MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet.journal**, v. 17, n. 1, p. 10, 2011.
- MARUOTTI, J. et al. MITF-M, a ‘melanocyte-specific’ isoform, is expressed in the adult retinal pigment epithelium. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 25, n. 5, p. 641–644, 2012.
- MAURUS, K. et al. The AP-1 transcription factor FOSL1 causes melanocyte reprogramming and transformation. **Oncogene**, v. 36, n. 36, p. 5110–5121, 2017.
- MCEVOY, B.; BELEZA, S.; SHRIVER, M. D. The genetic architecture of normal variation in human pigmentation: an evolutionary perspective and model. **Human Molecular Genetics**, v. 15, n. suppl_2, p. R176–R181, 2006.
- MCKENNA, A. et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. **Genome Research**, v. 20, n. 9, p. 1297–1303, 2010a.
- MCKENNA, A. et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. **Genome Research**, v. 20, n. 9, p. 1297–1303, 2010b.
- MCLAREN, W. et al. Deriving the consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor. **Bioinformatics**, v. 26, n. 16, p. 2069–2070, 2010.
- MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988a.
- MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic acids research**, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988b.
- MIONE, M.; BOSSERHOFF, A. MicroRNAs in melanocyte and melanoma biology. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 28, n. 3, p. 340–354, 2015.
- MORRIS, B. J. et al. FOXO3: A Major Gene for Human Longevity - A Mini-Review. **Gerontology**, v. 61, n. 6, p. 515–525, 2015.
- MORRONE, A. et al. Catecholamines and Vitiligo. **Pigment Cell Research**, v. 5, n. 2, p. 65–69, 1992.
- MOSENSON, J. A. et al. A central role for inducible heat-shock protein 70 in autoimmune vitiligo. **Experimental Dermatology**, v. 22, n. 9, p. 566–569, 2013.

NASLAVSKY, M. S. et al. Whole-genome sequencing of 1,171 elderly admixed individuals from the largest Latin American metropolis (São Paulo, Brazil). **bioRxiv**, p. 1–29, 2020.

NGUYEN, N. T.; FISHER, D. E. MITF and UV responses in skin: From pigmentation to addiction. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 32, n. 2, p. 224–236, 2019.

- NING, S.; PAGANO, J. S.; BARBER, G. N. IRF7: activation, regulation, modification and function. **Genes & Immunity**, v. 12, n. 6, p. 399–414, 2011.
- PALERMO, B. et al. Specific Cytotoxic T Lymphocyte Responses Against Melan-A/MART1, Tyrosinase and Gp100 in Vitiligo by the Use of Major Histocompatibility Complex/Peptide Tetramers: the Role of Cellular Immunity in the Etiopathogenesis of Vitiligo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 117, n. 2, p. 326–332, 2001.
- PALMERO, E. I. et al. Mechanisms and role of microRNA deregulation in cancer onset and progression. **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, n. 3, p. 363–370, 2011.
- PASSERON, T. et al. SOX9 is a key player in ultraviolet B-induced melanocyte differentiation and pigmentation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 35, p. 13984–13989, 2007.
- PASSOS, G. A. et al. Update on Aire and thymic negative selection. **Immunology**, v. 153, n. 1, p. 10–20, 2018.
- PATEL, A. B.; GREBER, B. J.; NOGALES, E. Recent insights into the structure of TFIID, its assembly, and its binding to core promoter. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 61, p. 17–24, 2020.
- PAVAN, W. J.; STURM, R. A. The Genetics of Human Skin and Hair Pigmentation. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 20, n. 1, p. 41–72, 2019.
- PENA, S. D. J. J. et al. The Genomic Ancestry of Individuals from Different Geographical Regions of Brazil Is More Uniform Than Expected. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e17063, 2011a.
- PENA, S. D. J. J. et al. The Genomic Ancestry of Individuals from Different Geographical Regions of Brazil Is More Uniform Than Expected. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e17063, 2011b.
- PERNIOLA, R. Twenty Years of AIRE. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018.
- PORTO, I. O. P. et al. microRNAs targeting the immunomodulatory HLA-G gene: A new survey searching for microRNAs with potential to regulate HLA-G. **Molecular Immunology**, v. 65, n. 2, p. 230–241, 2015.
- PRAETORIUS, C. et al. A Polymorphism in IRF4 Affects Human Pigmentation through a Tyrosinase-Dependent MITF/TFAP2A Pathway. **Cell**, v. 155, n. 5, p. 1022–1033, 2013.
- PRUIM, R. J. et al. LocusZoom: regional visualization of genome-wide association scan results. **Bioinformatics**, v. 26, n. 18, p. 2336–2337, 2010.
- QUILLEN, E. E. et al. Shades of complexity: New perspectives on the evolution and genetic architecture of human skin. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 168, n. S67, p. 4–26, 2019.
- RAMA RAO, GR. et al. Determination of oxidative stress in vitiligo by measuring superoxide dismutase and catalase levels in vitiliginous and non-vitiliginous skin. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 75, n. 3, p. 268, 2009.
- RAPOSO, G. et al. Distinct Protein Sorting and Localization to Premelanosomes, Melanosomes, and Lysosomes in Pigmented Melanocytic Cells. **Journal of Cell Biology**, v. 152, n. 4, p. 809–824, 2001.
- RASHIGHI, M. et al. CXCL10 Is Critical for the Progression and Maintenance of Depigmentation in a Mouse Model of Vitiligo. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 223, p. 223ra23–223ra23, 2014.
- REGAZZETTI, C. et al. Endothelial Cells Promote Pigmentation through Endothelin Receptor B Activation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 12, p. 3096–3104, 2015.
- REHMSMEIER, M. et al. Fast and effective prediction of microRNA / target duplexes. **Spring**, n. 2003, p. 1507–1517, 2004.
- REHMSMEIER, M. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. **RNA**, v.

10, n. 10, p. 1507–1517, 2004.

REZAEI, N. et al. Autoimmunity as an aetiological factor in vitiligo. **Journal of the**

- European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 21, n. 7, p. 865–876, 2007.
- RIDING, R. L. et al. Type I interferon signaling limits viral vector priming of CD8 + T cells during initiation of vitiligo and melanoma immunotherapy. **Pigment Cell & Melanoma Research**, p. pcmr.12935, 2020.
- RIDING, R. L.; HARRIS, J. E. The Role of Memory CD8 + T Cells in Vitiligo. **The Journal of Immunology**, v. 203, n. 1, p. 11–19, 2019.
- ROBERTS, G. H. L.; SANTORICO, S. A.; SPRITZ, R. A. The genetic architecture of vitiligo. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 33, n. 1, p. 8–15, 2020a.
- ROBERTS, G. H. L.; SANTORICO, S. A.; SPRITZ, R. A. Deep genotype imputation captures virtually all heritability of autoimmune vitiligo. **Human Molecular Genetics**, v. 29, n. 5, p. 859–863, 2020b.
- ROBINSON, J. T. et al. Integrative genomics viewer. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 1, p. 24–26, 2011.
- SALZANO, F. M.; SANS, M. Interethnic admixture and the evolution of Latin American populations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 1 suppl 1, p. 151–170, 2014.
- SATO, S. et al. CBP/p300 as a co-factor for the Microphthalmia transcription factor. **Oncogene**, v. 14, n. 25, p. 3083–3092, 1997.
- SCHALLREUTER, K. U. et al. In Vivo and In Vitro Evidence for Hydrogen Peroxide (H₂O₂) Accumulation in the Epidermis of Patients with Vitiligo and its Successful Removal by a UVB-Activated Pseudocatalase. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 4, n. 1, p. 91–96, 1999.
- SCHALLREUTER, K. U. et al. Estrogens Can Contribute to Hydrogen Peroxide Generation and Quinone-Mediated DNA Damage in Peripheral Blood Lymphocytes from Patients with Vitiligo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 5, p. 1036–1042, 2006.
- SCHALLREUTER, K. U. et al. Basic evidence for epidermal H₂O₂/ONOO⁻-mediated oxidation/nitration in segmental vitiligo is supported by repigmentation of skin and eyelashes after reduction of epidermal H₂O₂ with topical NB-UVB-activated pseudocatalase PC-KUS. **The FASEB Journal**, v. 27, n. 8, p. 3113–3122, 2013.
- SCHALLREUTER, K. U.; WOOD, J. M.; BERGER, J. Low Catalase Levels in the Epidermis of Patients with Vitiligo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 97, n. 6, p. 1081–1085, 1991.
- SCHUNTER, J. A. et al. A novel FoxD3 Variant Is Associated With Vitiligo and Elevated Thyroid Auto-Antibodies. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 100, n. 10, p. E1335–E1342, 2015.
- SECOLIN, R. et al. Distribution of local ancestry and evidence of adaptation in admixed populations. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 13900, 2019.
- SEHGAL, V.; SRIVASTAVA, G. Vitiligo: Compendium of clinico-epidemiological features. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 73, n. 3, p. 149, 2007.
- SERRE, C.; BUSUTTIL, V.; BOTTO, J.-M. Intrinsic and extrinsic regulation of human skin melanogenesis and pigmentation. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 40, n. 4, p. 328–347, 2018.
- SHAKYA, A. et al. Oct1 Is a Switchable, Bipotential Stabilizer of Repressed and Inducible Transcriptional States. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 1, p. 450–459, 2011.
- SHEINBOIM, D. et al. OCT4 impedes cell fate redirection by the melanocyte lineage master regulator MITF in mouse ESCs. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1022, 2017.
- SHIMAZU, T. et al. Suppression of Oxidative Stress by -Hydroxybutyrate, an Endogenous

Histone Deacetylase Inhibitor. **Science**, v. 339, n. 6116, p. 211–214, 2013.

SIRUGO, G.; WILLIAMS, S. M.; TISHKOFF, S. A. The Missing Diversity in Human Genetic Studies. **Cell**, v. 177, n. 1, p. 26–31, 2019.

SPEECKAERT, R. et al. Critical appraisal of the oxidative stress pathway in vitiligo: a systematic review and meta-analysis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 32, n. 7, p. 1089–1098, 2018a.

SPEECKAERT, R. et al. Critical appraisal of the oxidative stress pathway in vitiligo: a systematic review and meta-analysis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 32, n. 7, p. 1089–1098, 2018b.

SPRITZ, R. A. Six Decades of Vitiligo Genetics: Genome-Wide Studies Provide Insights into Autoimmune Pathogenesis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 2, p. 268–273, 2012.

SPRITZ, R. A.; SANTORICO, S. A. The Genetic Basis of Vitiligo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 141, n. 2, p. 265–273, 2021.

SRIVASTAVA, N. et al. Dendritic cells sub-sets are associated with inflammatory cytokine production in progressive vitiligo disease. **Archives of Dermatological Research**, 2021.

STURM, R. A. Molecular genetics of human pigmentation diversity. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n. R1, p. R9–R17, 2009.

SUMITOMO, A. et al. LPA Induces Keratinocyte Differentiation and Promotes Skin Barrier Function through the LPAR1/LPAR5-RHO-ROCK-SRF Axis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 139, n. 5, p. 1010–1022, 2019.

SUN, X. et al. Study on genetic epidemiology on 815 patients with vitiligo in Zhejiang area. **Zhonghua liu xing bing xue za zhi = Zhonghua liuxingbingxue zazhi**, v. 26, n. 11, p. 911–4, 2005.

SUN, X. et al. Genetic epidemiology of vitiligo: a study of 815 probands and their families from south China. **International Journal of Dermatology**, v. 45, n. 10, p. 1176–1181, 2006.

TACHIBANA, M. MITF: A Stream Flowing for Pigment Cells. **Pigment Cell Research**, v. 13, n. 4, p. 230–240, 2000.

TAKAHASHI, K. et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861–872, 2007.

TANG, L. et al. Vitamin D protects human melanocytes against oxidative damage by activation of Wnt/ β -catenin signaling. **Laboratory Investigation**, v. 98, n. 12, p. 1527–1537, 2018.

TAZI-AHNINI, R. et al. The autoimmune regulator gene (AIRE) is strongly associated with vitiligo. **British Journal of Dermatology**, p. ???-???, 2008.

THE 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM. A global reference for human genetic variation. **Nature**, v. 526, n. 7571, p. 68–74, 2015.

THOMAS, A. J.; ERICKSON, C. A. FOXD3 regulates the lineage switch between neural crest-derived glial cells and pigment cells by repressing MITF through a non-canonical mechanism. **Development**, v. 136, n. 11, p. 1849–1858, 2009.

THORVALDSDOTTIR, H.; ROBINSON, J. T.; MESIROV, J. P. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. **Briefings in Bioinformatics**, v. 14, n. 2, p. 178–192, 2013.

TOOSI, S.; ORLOW, S. J.; MANGA, P. Vitiligo-Inducing Phenols Activate the Unfolded Protein Response in Melanocytes Resulting in Upregulation of IL6 and IL8. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 11, p. 2601–2609, 2012.

UHLEN, M. et al. Tissue-based map of the human proteome. **Science**, v. 347, n. 6220, p. 1260419–1260419, 2015.

VACHTENHEIM, J.; BOROVSANŠKÝ, J. “Transcription physiology” of pigment formation in melanocytes: central role of MITF. **Experimental Dermatology**, v. 19, n. 7, p. 617–627, 2010.

VACHTENHEIM, J.; ŠESTÁKOVÁ, B.; TUHÁČKOVÁ, Z. Inhibition of MITF transcriptional activity independent of targeting p300/CBP coactivators. **Pigment Cell**

Research, v. 20, n. 1, p. 41–51, 2007.

VAISH, U. et al. Micro RNAs upregulated in Vitiligo skin play an important role in its aetiopathogenesis by altering TRP1 expression and keratinocyte-melanocytes cross-talk. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 10079, 2019.

VAN DEN BOORN, J. G. et al. Autoimmune Destruction of Skin Melanocytes by Perilesional T Cells from Vitiligo Patients. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 129, n. 9, p. 2220–2232, 2009.

VAN DEN WIJNGAARD, R. et al. Local Immune Response in Skin of Generalized Vitiligo Patients. **Laboratory Investigation**, v. 80, n. 8, p. 1299–1309, 2000.

VAN DER AUWERA, G. A. et al. From FastQ Data to High-Confidence Variant Calls: The Genome Analysis Toolkit Best Practices Pipeline. In: **Current Protocols in Bioinformatics**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2013. v. 11p. 11.10.1–11.10.33.

VERDONI, A. M.; IKEDA, S.; IKEDA, A. Serum response factor is essential for the proper development of skin epithelium. **Mammalian Genome**, v. 21, n. 1–2, p. 64–76, 2010.

WAGNER, R. Y. et al. Altered E-Cadherin Levels and Distribution in Melanocytes Precede Clinical Manifestations of Vitiligo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 7, p. 1810–1819, 2015.

WAKAMATSU, K. et al. Characterization of melanin in human iridal and choroidal melanocytes from eyes with various colored irides. **Pigment cell & melanoma research**, v. 21, n. 1, p. 97–105, 2008.

WAN, P.; HU, Y.; HE, L. Regulation of melanocyte pivotal transcription factor MITF by some other transcription factors. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 354, n. 1–2, p. 241–246, 2011.

WAŃKOWICZ-KALIŃSKA, A. et al. Immunopolarization of CD4+ and CD8+ T Cells to Type-1-Like is Associated with Melanocyte Loss in Human Vitiligo. **Laboratory Investigation**, v. 83, n. 5, p. 683–695, 2003.

WARD, L. D.; KELLIS, M. HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. D930–D934, 2012.

WIRIYASERMKUL, P.; MORIYAMA, S.; NAGAMORI, S. Membrane transport proteins in melanosomes: Regulation of ions for pigmentation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1862, n. 12, p. 183318, 2020.

XIE, H. et al. Vitiligo: How do oxidative stress-induced autoantigens trigger autoimmunity? **Journal of Dermatological Science**, v. 81, n. 1, p. 3–9, 2016.

YAN, S. et al. Current insight into the roles of microRNA in vitiligo. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 4, p. 3211–3219, 2020.

YU, J. et al. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. **Science**, v. 318, n. 5858, p. 1917–1920, 2007.

ZERLANKO, B. J. et al. Premature Senescence and Increased TGF β Signaling in the Absence of Tgif1. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35460, 2012.

ZHANG, X.-J. et al. Characteristics of genetic epidemiology and genetic models for vitiligo. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 51, n. 3, p. 383–390, 2004.

ZHANG, Y. et al. The Prevalence of Vitiligo: A Meta-Analysis. **PLOS ONE**, v. 11, n. 9, p. e0163806, 2016.

ZHANG, Z. et al. Differentially expressed microRNAs in peripheral blood mononuclear cells of non-segmental vitiligo and their clinical significance. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 35, n. 2, p. 1–10, 2021.

ANEXO E - PROTOCOLO PARA IDENTIFICAÇÃO COMPUTACIONAL DE INTERAÇÕES ENTRE MIRNAS E REGIÃO 3'UTR



Laboratório de Pesquisas Forenses e Genômicas
Departamento de Química – FFCLRP/USP

Protocolo para identificação computacional de interações entre miRNAs e região 3'UTR

Oliveira MLG, Marcorin L, Pereira ALE, Debortoli G,

Fracasso NCA, Silva GV, Castelli EC, Mendes-Junior CT

Versão 1 – Outubro de 2016

Adaptado de: Oliveira MLG. Sequenciamento de nova geração do gene IRF4: identificação da variação associada a fenótipos de pigmentação na população brasileira. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2016. 151p.

MicroRNAs (miRNAs) atuam na regulação de diversos processos biológicos através da interação entre sua região *seed* e sequências presentes principalmente na região codificadora e 3'UTR dos mRNAs alvo (MIONE; BOSSERHOFF, 2015). Essa interação, dependendo da complementariedade de sequência entre o miRNA e seu alvo, pode resultar na inibição da tradução do mRNA (no caso de complementariedade incompleta) ou facilitar a degradação do mRNA (havendo complementariedade completa) (HUNTZINGER; IZAURRALDE, 2011).

Características específicas dos miRNAs (como possibilidade de pareamento incompleto e pequeno tamanho da sequência – 19-25 nucleotídeos) permitem que essas moléculas regulem centenas de mRNAs, tornando bastante complexo o entendimento desta interação (DI LEVA; CROCE, 2013). Além disso, é necessário considerar que esta regulação pode ainda ser influenciada por variações gênicas presentes nos sítios de mRNA alvo (PALMERO et al., 2011). Assim, a compreensão do papel desempenhado por essas moléculas passa a identificação dos seus alvos no genoma. Essa identificação pode ser

realizada experimentalmente. Todavia, tendo em vista a complexidade e os custos associados ao método experimental, tem-se buscado alternativas computacionais *in silico* para o reconhecimento preditivo da ligação miRNA-mRNA-alvo (MARÍN; VANÍEK, 2011).

Na predição computacional, utiliza-se as sequências de miRNAs disponíveis em bancos de dados para buscar possíveis alvos, neste caso, sequências 3'UTR do mRNA de determinado gene. A restrição da análise à 3'UTR se deve ao fato de a maioria dos miRNAs se ligarem preferencialmente nessa região (LEWIS et al., 2003).

A fim de identificar miRNAs que se liguem a sequências polimórficas da 3'UTR de um determinado gene, são selecionados os haplótipos encontrados com frequência acima de 1% na amostra populacional.

Tendo em vista o grande número de falso-positivos obtidos através dos métodos *in silico*, optamos por utilizar três algoritmos distintos para predição de miRNAs com afinidade a sequências da 3'UTR: RNAhybrid (REHMSMEIER et al., 2004), miRanda (JOHN et al., 2004a) e intaRNA (BUSCH; RICHTER; BACKOFEN, 2008).

Considerando que o miRNA se hibridize ao alvo de maneira energeticamente ótima, o RNAhybrid se baseia no cálculo da energia mínima livre (MFE) de hibridização entre as posições iniciais (*seed*) no miRNA e no alvo. O miRanda também se baseia no cálculo da MFE de hibridização para predição de miRNAs afins, mas utiliza ainda informações relacionadas à conservação evolutiva da sequência alvo e à posição do alvo em 3'UTRs alinhadas de genes homólogos. Por sua vez, o intaRNA se baseia em um *score* combinado da energia de interação, que é calculado como a soma da energia livre de hibridização e da energia livre necessária para tornar os sítios de interação acessíveis.

Para realizar uma avaliação conjunta utilizando esses três algoritmos é empregado um *software*, mirhunt (PORTO et al., 2015) (http://www.castelli-lab.net/apps/apps_mirhunt.php), que automatiza a análise como brevemente descrito: a) as sequências de mRNA da 3'UTR são fragmentadas em uma série de subsequências de 500 nucleotídeos com uma sobreposição de 50 nucleotídeos iniciais e finais; b) os três algoritmos são utilizados para prever interações miRNA/mRNA considerando cada uma das subsequências; c) os resultados gerados apresentam todas as interações miRNA/mRNA encontradas por cada algoritmo; d) mantem-se nos resultados somente a ligação mais estável nos casos em que são identificadas mais de uma interação para um mesmo miRNA com afinidade para uma mesma região-alvo (para reconhecimento de uma mesma região alvo, os

últimos nucleotídeos pareados da região *seed* são utilizados como referência, com uma tolerância máxima de 3 nucleotídeos); e) os resultados encontrados pelos três algoritmos são comparados; f) um sistema de pontuação é aplicado para cada interação miRNA/alvo. Os parâmetros utilizados para o miRanda são: -4 para extensão e -9 para abertura do *gap*, limiar de pontuação estabelecido como 50 e mínima energia livre configurada para -1 kcal/mol. Para o RNAhybrid: mínima energia livre de ligação configurada para -1 kcal/mol e número de *hits* ajustado para 10. O intaRNA é um método livre de parâmetro, então a configuração padrão é utilizada (PORTO et al., 2015).

O banco de dados contendo os miRNAs humanos até então identificados (2.588) pode ser obtido a partir do miRBase, release 21 de junho de 2014 (GRIFFITHS-JONES et al., 2006). Versão mais recente, caso disponível, deve ser utilizada.

Os algoritmos são utilizados para inferir a melhor interação miRNA/mRNA (menor valor de MFE) para cada miRNA e cada sequência da 3'UTR disponível para análise. Finalmente, um sistema de pontuação é aplicado para cada conjunto de dados, como descrito detalhadamente em Porto et al. (2015). Essas pontuações têm como objetivo identificar as interações mais estáveis e/ou específicas entre miRNAs e seus alvos, permitindo a seleção de miRNAs mais influentes, evitando o uso de limites arbitrários. Ao compor os resultados dos três métodos, interações falso-positivas eventualmente identificadas por apenas um dos métodos são descartadas por não resultarem em uma alta pontuação.

A primeira pontuação (denominada valor ϵ) reflete a estabilidade da interação miRNA/mRNA. O menor valor ϵ encontrado por cada algoritmo é utilizado como referência do algoritmo para propósito de normalização. Este procedimento tem como objetivo tornar os MFEs dos diferentes algoritmos comparáveis. A pontuação de ϵ para cada interação miRNA/mRNA é calculada a partir da razão entre o MFE daquela interação e aquele da referência. Após a normalização, a pontuação de energia composta para cada interação miRNA/mRNA é obtida pela soma das pontuações de cada algoritmo: $\epsilon = \epsilon_{\text{RNAhybrid}} + \epsilon_{\text{miRanda}} + \epsilon_{\text{intaRNA}}$. Assim, quanto maior for a pontuação ϵ maior a probabilidade de ocorrer uma forte interação entre o miRNA e o alvo.

A segunda pontuação (denominada valor s) reflete a especificidade da interação miRNA/mRNA, comparando as interações observadas com uma distribuição nula que leva em consideração a interação destes 2588 miRNAs em 23.464 sequências 3'UTR de genes humanos. Quanto maior for a pontuação s , maior a probabilidade do miRNA em questão interagir somente com o gene estudado.

A terceira pontuação (denominada valor es) é calculada como um valor combinado que reflete ambas as pontuações, ϵ e s . Quanto maior a pontuação es , maior a probabilidade de que o miRNA em questão interaja de forma forte e específica com o gene estudado.

REFERÊNCIAS

ABDEL-MALEK, Z. A. et al. The enigma and challenges of vitiligo pathophysiology and treatment. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 33, n. 6, p. 778–787, 2020.

ABEGAZ, F. et al. Performance of model-based multifactor dimensionality reduction methods for epistasis detection by controlling population structure. **BioData Mining**, v. 14, n. 1, p. 16, 2021.

ADAMEYKO, I. et al. Sox2 and Mitf cross-regulatory interactions consolidate progenitor and melanocyte lineages in the cranial neural crest. **Development**, v. 139, n. 2, p. 397–410, 2012.

AGRAWAL, S. et al. Comparison of Oxidant-Antioxidant Status in Patients with Vitiligo and Healthy Population. **Kathmandu University Medical Journal**, v. 12, n. 2, p. 132–136, 2015.

AL-SHOBAILI, H. A. Update on the genetics characterization of vitiligo. **International journal of health sciences**, v. 5, n. 2, p. 167–79, 2011.

ALENIZI, D. Consanguinity pattern and heritability of Vitiligo in Arar, Saudi Arabia. **Journal of Family and Community Medicine**, v. 21, n. 1, p. 13, 2014.

ALEXANDER, D. H.; LANGE, K. Enhancements to the ADMIXTURE algorithm for individual ancestry estimation. **BMC Bioinformatics**, v. 12, n. 1, p. 246, 2011.

ALEXANDER, D. H.; NOVEMBRE, J.; LANGE, K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. **Genome Research**, v. 19, n. 9, p. 1655–1664, 2009.

ALIKHAN, A. et al. Vitiligo: A comprehensive overview. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 65, n. 3, p. 473–491, 2011.

ALKHATEEB, A. et al. Epidemiology of Vitiligo and Associated Autoimmune Diseases in Caucasian Proband and Their Families. **Pigment Cell Research**, v. 16, n. 3, p. 208–214, 2003.

ALZOLIBANI, A. Genetic epidemiology and heritability of vitiligo in the Qassim region of

Saudi Arabia. **Acta dermatovenerologica Alpina, Pannonica, et Adriatica**, v. 18, n. 3, p. 119–25, 2009.

ANDERSON, A. E. et al. Tgif1 and Tgif2 Repress Expression of the RabGAP Evi5l. **Molecular and Cellular Biology**, v. 37, n. 5, 2017.

ANDRADE, R. B. et al. Estimating Asian Contribution to the Brazilian Population: A New Application of a Validated Set of 61 Ancestry Informative Markers. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 8, n. 11, p. 3577–3582, 2018.

ANDREWS S. **FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.**, 2010.

ARCOS-BURGOS, M. et al. Vitiligo: complex segregation and linkage disequilibrium analyses with respect to microsatellite loci spanning the HLA. **Human Genetics**, v. 110, n. 4, p. 334–342, 2002.

ARONOFF, S. Catalase: Kinetics of Photooxidation. **Science**, v. 150, n. 3692, p. 72–73, 1965.

ARORA, N.; SIDDIQUI, E. M.; MEHAN, S. Involvement of adenylate cyclase/cAMP/CREB and SOX9/MITF in melanogenesis to prevent vitiligo. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 476, n. 3, p. 1401–1409, 2021.

AUDE-GARCIA, C. et al. Dual roles for MEF2A and MEF2D during human macrophage terminal differentiation and c-Jun expression. **Biochemical Journal**, v. 430, n. 2, p. 237–244, 2010.

BAHARAV, E. et al. Tyrosinase as an autoantigen in patients with vitiligo. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 105, n. 1, p. 84–88, 1996.

BATCIOGLU, K. et al. Comparison of plasma malondialdehyde, glutathione, glutathione peroxidase, hydroxyproline and selenium levels in patients with vitiligo and healthy controls. **Indian Journal of Dermatology**, v. 53, n. 3, p. 106, 2008.

BERGQVIST, C.; EZZEDINE, K. Vitiligo: A Review. **Dermatology**, v. 236, n. 6, p. 571–592, 2020.

BERGSTRÖM, A. et al. Insights into human genetic variation and population history from 929 diverse genomes. **Science**, v. 367, n. 6484, p. eaay5012, 2020.

BERSON, J. F. et al. Pmel17 Initiates Premelanosome Morphogenesis within Multivesicular Bodies. **Molecular Biology of the Cell**, v. 12, n. 11, p. 3451–3464, 2001.

BERTOLOTI, A. et al. Type I interferon signature in the initiation of the immune response in vitiligo. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 27, n. 3, p. 398–407, 2014.

BIN, B.-H. et al. Membrane-Associated Transporter Protein (MATP) Regulates Melanosomal pH and Influences Tyrosinase Activity. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0129273, 2015.

BOULON, S. et al. Oct-1 Potentiates CREB-Driven Cyclin D1 Promoter Activation via a Phospho-CREB- and CREB Binding Protein-Independent Mechanism. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 22, p. 7769–7779, 2002.

BOYLE, A. P. et al. Annotation of functional variation in personal genomes using Regulome DB. **Genome Research**, v. 22, n. 9, p. 1790–1797, 2012.

BRUSERUD, Ø. et al. AIRE-mutations and autoimmune disease. **Current Opinion in Immunology**, v. 43, p. 8–15, 2016.

BUSCH, A.; RICHTER, A. S.; BACKOFEN, R. IntaRNA: efficient prediction of bacterial sRNA targets incorporating target site accessibility and seed regions. **Bioinformatics**, v. 24, n. 24, p. 2849–2856, 2008.

CASTELLI, E. C. et al. HLA-E coding and 3' untranslated region variability determined by next-generation sequencing in two West-African population samples. **Human Immunology**, v. 76, n. 12, p. 945–953, 2015.

CASTRO, C. C. S. DE; MIOT, H. A. Prevalence of vitiligo in Brazil-A population survey. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 31, n. 3, p. 448–450, 2018.

CHAI, J.; TARNAWSKI, A. S. Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 53, n. 2, p. 147–57, 2002.

CHAITANYA, L. et al. The HirisPlex-S system for eye, hair and skin colour prediction from DNA: Introduction and forensic developmental validation. **Forensic Science International: Genetics**, v. 35, n. April, p. 123–135, 2018.

CHER, C. (FIELD A. S. Bioanalyzer Applications for Next Gen Sequencing : Updates and Tips. p. 1–49, 2011.

CHOI, H. et al. Primary Cilia Negatively Regulate Melanogenesis in Melanocytes and Pigmentation in a Human Skin Model. **PLOS ONE**, v. 11, n. 12, p. e0168025, 2016.

- CUI, T.-T. et al. miR-196a-2 rs11614913 polymorphism is associated with vitiligo by affecting heterodimeric molecular complexes of Tyr and Tyrp1. **Archives of Dermatological Research**, v. 307, n. 8, p. 683–692, 2015.
- D'ORAZIO, J. et al. UV radiation and the skin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 6, p. 12222–12248, 2013.
- DAMMAK, I. et al. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation at the tissue level in patients with stable and active vitiligo. **International Journal of Dermatology**, v. 48, n. 5, p. 476–480, 2009.
- DAS, S. K. et al. Studies on vitiligo. II. Familial aggregation and genetics. **Genetic Epidemiology**, v. 2, n. 3, p. 255–262, 1985.
- DELL'ANNA, M. L. et al. Alterations of Mitochondria in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Vitiligo Patients. **Pigment Cell Research**, v. 16, n. 5, p. 553–559, 2003.
- DEMIROVIC, D. et al. Differential translocation of heat shock factor-1 after mild and severe stress to human skin fibroblasts undergoing aging in vitro. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 8, n. 4, p. 333–339, 2014.
- DENAT, L. et al. Melanocytes as Instigators and Victims of Oxidative Stress. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 6, p. 1512–1518, 2014.
- DEPRISTO, M. A. et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. **Nature Genetics**, v. 43, n. 5, p. 491–498, 2011.
- DI LEVA, G.; CROCE, C. M. MiRNA profiling of cancer. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 23, n. 1, p. 3–11, 2013.
- DONG, D. et al. Comparison of responses of melanocyte lineages from p75(+) and p75(–) human scalp-derived neural crest stem cells under phototherapy. **Lasers in Medical Science**, v. 36, n. 1, p. 139–146, 2021.
- EWING, B. et al. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 175–185, 1998.
- FERRAGINA, P. et al. An Alphabet-Friendly FM-Index. p. 150–160, 2004.
- FLESHER, J. L. et al. Delineating the role of MITF isoforms in pigmentation and tissue homeostasis. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 33, n. 2, p. 279–292, 2020.
- FREZZATO, F. et al. HSP70/HSF1 axis, regulated via a PI3K/AKT pathway, is a druggable

target in chronic lymphocytic leukemia. **International Journal of Cancer**, v. 145, n. 11, p. 3089–3100, 2019.

FRIEDMAN, J. R.; KAESTNER, K. H. The Foxa family of transcription factors in development and metabolism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 19–20, p. 2317–2328, 2006.

GALLANT, S.; GILKESON, G. ETS transcription factors and regulation of immunity. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 54, n. 3, p. 149–163, 2006.

GIOVANNELLI, L. et al. Increased oxidative DNA damage in mononuclear leukocytes in vitiligo. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 556, n. 1–2, p. 101–106, 2004.

GIRAUD, M. et al. Aire unleashes stalled RNA polymerase to induce ectopic gene expression in thymic epithelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 2, p. 535–540, 2012.

GODING, C. R.; ARNHEITER, H. MITF—the first 25 years. **Genes & Development**, v. 33, n. 15–16, p. 983–1007, 2019.

GÓTH, L.; NAGY, T. Inherited catalase deficiency: Is it benign or a factor in various age related disorders? **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 753, n. 2, p. 147–154, 2013.

GRIFFITHS-JONES, S. et al. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. **Nucleic acids research**, v. 34, n. Database issue, p. D140-4, 2006.

HAFEZ, M.; SHARAF, L.; ABD EL-NABI, S. M. The genetics of vitiligo. **Acta dermatovenereologica**, v. 63, n. 3, p. 249–51, 1983.

HARRIS, J. E. et al. A Mouse Model of Vitiligo with Focused Epidermal Depigmentation Requires IFN- γ for Autoreactive CD8⁺ T-Cell Accumulation in the Skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 7, p. 1869–1876, 2012.

HARRIS, M. L. et al. Sox proteins in melanocyte development and melanoma. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 23, n. 4, p. 496–513, 2010.

HELLWEGE, J. N. et al. Population Stratification in Genetic Association Studies. **Current Protocols in Human Genetics**, v. 95, n. 1, p. 1.22.1-1.22.23, 2017.

HERSHEY, C. L.; FISHER, D. E. Genomic analysis of the Microphthalmia locus and

- identification of the MITF-J/Mitf-J isoform. **Gene**, v. 347, n. 1, p. 73–82, 2005.
- HOASHI, T. et al. MART-1 Is Required for the Function of the Melanosomal Matrix Protein PMEL17/GP100 and the Maturation of Melanosomes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 14, p. 14006–14016, 2005.
- HORNYAK, T. J. et al. Mitf dosage as a primary determinant of melanocyte survival after ultraviolet irradiation. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 22, n. 3, p. 307–318, 2009.
- HUNTZINGER, E.; IZAURRALDE, E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. **Nature reviews. Genetics**, v. 12, n. 2, p. 99–110, 2011.
- JACOB, C. et al. HDAC1 and HDAC2 Control the Specification of Neural Crest Cells into Peripheral Glia. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 17, p. 6112–6122, 2014.
- JIMBOW, K. et al. Increased sensitivity of melanocytes to oxidative stress and abnormal expression of tyrosinase-related protein in vitiligo. **British Journal of Dermatology**, v. 144, n. 1, p. 55–65, 2001.
- JIN, Y. et al. NALP1 in Vitiligo-Associated Multiple Autoimmune Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 12, p. 1216–1225, 2007.
- JIN, Y. et al. Variant of TYR and Autoimmunity Susceptibility Loci in Generalized Vitiligo. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 18, p. 1686–1697, 2010a.
- JIN, Y. et al. Common variants in FOXP1 are associated with generalized vitiligo. **Nature Genetics**, v. 42, n. 7, p. 576–578, 2010b.
- JIN, Y. et al. Common variants in FOXP1 are associated with generalized vitiligo. **Nature Genetics**, v. 42, n. 7, p. 576–578, 2010c.
- JIN, Y. et al. Genome-wide association analyses identify 13 new susceptibility loci for generalized vitiligo. **Nature Genetics**, v. 44, n. 6, p. 676–680, 2012.
- JIN, Y. et al. Genome-wide association studies of autoimmune vitiligo identify 23 new risk loci and highlight key pathways and regulatory variants. **Nature Genetics**, v. 48, n. 11, p. 1418–1424, 2016.
- JOHN, B. et al. Human MicroRNA targets. **PLoS biology**, v. 2, n. 11, p. e363, 2004a.
- JOHN, B. et al. Human MicroRNA Targets. **PLoS Biology**, v. 2, n. 11, p. e363, 2004b.
- JOYCE, C. E. et al. Deep sequencing of small RNAs from human skin reveals major

alterations in the psoriasis miRNAome. **Human Molecular Genetics**, v. 20, n. 20, p. 4025–4040, 2011.

KANG, J. et al. A general mechanism for transcription regulation by Oct1 and Oct4 in response to genotoxic and oxidative stress. **Genes & Development**, v. 23, n. 2, p. 208–222, 2009.

KANG, M. C. et al. UP256 Inhibits Hyperpigmentation by Tyrosinase  Expression/Dendrite Formation via Rho-Dependent  Signaling and by Primary Cilium Formation  in Melanocytes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 15, p. 5341, 2020.

KEMP, E. H. et al. Immunoprecipitation of melanogenic enzyme autoantigens with vitiligo sera: evidence for cross-reactive autoantibodies to tyrosinase and tyrosinase-related protein-2 (TRP-2). **Clinical & Experimental Immunology**, v. 109, n. 3, p. 495–500, 1997.

KIM, E. et al. MITF Expression Predicts Therapeutic Vulnerability to p300 Inhibition in Human Melanoma. **Cancer Research**, v. 79, n. 10, p. 2649–2661, 2019.

KINGO, K. et al. Gene expression analysis of melanocortin system in vitiligo. **Journal of Dermatological Science**, v. 48, n. 2, p. 113–122, 2007.

KITAMURA, R. et al. Mechanisms underlying the dysfunction of melanocytes in vitiligo epidermis: role of SCF/KIT protein interactions and the downstream effector, MITF-M. **The Journal of Pathology**, v. 202, n. 4, p. 463–475, 2004.

KOCA, R. et al. Oxidant-antioxidant enzymes and lipid peroxidation in generalized vitiligo. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 29, n. 4, p. 406–409, 2004.

KOSTYUK, V. A. et al. Dysfunction of Glutathione S-Transferase Leads to Excess 4-Hydroxy-2-Nonenal and H₂O₂ and Impaired Cytokine Pattern in Cultured Keratinocytes and Blood of Vitiligo Patients. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 13, n. 5, p. 607–620, 2010.

KRÜGER, C.; SCHALLREUTER, K. U. A review of the worldwide prevalence of vitiligo in children/adolescents and adults. **International Journal of Dermatology**, v. 51, n. 10, p. 1206–1212, 2012.

LAMBERT, M. W. et al. The physiology of melanin deposition in health and disease. **Clinics in Dermatology**, v. 37, n. 5, p. 402–417, 2019.

- LE GAL, F.-A. et al. Direct Evidence to Support the Role of Antigen-Specific CD8+ T Cells in Melanoma-Associated Vitiligo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 117, n. 6, p. 1464–1470, 2001.
- LEE, N.; KIM, D.; KIM, W.-U. Role of NFAT5 in the Immune System and Pathogenesis of Autoimmune Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 2019.
- LEWIS, B. P. et al. 33-Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. **Cell**, v. 115, n. 7, p. 787–798, 2003.
- LI, H. et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. **Bioinformatics**, v. 25, n. 16, p. 2078–2079, 2009.
- LI, H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. 2013.
- LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics**, v. 25, n. 14, p. 1754–1760, 2009.
- LISHOUT, F. VAN et al. An efficient algorithm to perform multiple testing in epistasis screening. **BMC Bioinformatics**, v. 14, n. 1, p. 138, 2013.
- LISHOUT, F. VAN et al. gammaMAXT: a fast multiple-testing correction algorithm. **BioData Mining**, v. 8, n. 1, p. 36, 2015.
- LIU, X.-M. et al. Maintenance of immune hyporesponsiveness to melanosomal proteins by DHICA-mediated antioxidation: Possible implications for autoimmune vitiligo. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, n. 9, p. 1177–1185, 2011.
- LOH, P.-R. et al. Reference-based phasing using the Haplotype Reference Consortium panel. **Nature Genetics**, v. 48, n. 11, p. 1443–1448, 2016.
- MA, W. et al. Reprogramming Retinal Pigment Epithelium to Differentiate Toward Retinal Neurons with Sox2. **Stem Cells**, v. 27, n. 6, p. 1376–1387, 2009.
- MACHADO FILHO, C. D. DOS S. et al. Vitiligo: analysis of grafting versus curettage alone, using melanocyte morphology and reverse transcriptase polymerase chain reaction for tyrosinase mRNA. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 123, n. 4, p. 187–191, 2005.
- MALCOV-BROG, H. et al. UV-Protection Timer Controls Linkage between Stress and Pigmentation Skin Protection Systems. **Molecular Cell**, v. 72, n. 3, p. 444- 456.e7, 2018.
- MAPLES, B. K. et al. RFMix: A Discriminative Modeling Approach for Rapid and Robust

Local-Ancestry Inference. **The American Journal of Human Genetics**, v. 93, n. 2, p. 278–288, 2013.

MARATHE, H. G. et al. BRG1 interacts with SOX10 to establish the melanocyte lineage and to promote differentiation. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 11, p. 6442–6458, 2017.

MARESCA, V. et al. Increased Sensitivity to Peroxidative Agents as a Possible Pathogenic Factor of Melanocyte Damage in Vitiligo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 109, n. 3, p. 310–313, 1997.

MARÍN, R. M.; VANÍEK, J. Efficient use of accessibility in microRNA target prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 1, p. 19–29, 2011.

MAROÑAS, O. et al. Development of a forensic skin colour predictive test. **Forensic Science International: Genetics**, v. 13, p. 34–44, 2014.

MARTIN, A. R. et al. Human Demographic History Impacts Genetic Risk Prediction across Diverse Populations. **The American Journal of Human Genetics**, v. 100, n. 4, p. 635–649, 2017.

MARTIN, K. A. et al. A Competitive Mechanism of CArG Element Regulation by YY1 and SRF: Implications for Assessment of Phox1/MHox Transcription Factor Interactions at CArG Elements. **DNA and Cell Biology**, v. 16, n. 5, p. 653–661, 1997.

MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet.journal**, v. 17, n. 1, p. 10, 2011.

MARUOTTI, J. et al. MITF-M, a ‘melanocyte-specific’ isoform, is expressed in the adult retinal pigment epithelium. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 25, n. 5, p. 641–644, 2012.

MAURUS, K. et al. The AP-1 transcription factor FOSL1 causes melanocyte reprogramming and transformation. **Oncogene**, v. 36, n. 36, p. 5110–5121, 2017.

MCEVOY, B.; BELEZA, S.; SHRIVER, M. D. The genetic architecture of normal variation in human pigmentation: an evolutionary perspective and model. **Human Molecular Genetics**, v. 15, n. suppl_2, p. R176–R181, 2006.

MCKENNA, A. et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. **Genome Research**, v. 20, n. 9, p. 1297–1303, 2010a.

MCKENNA, A. et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. **Genome Research**, v. 20, n. 9, p. 1297–1303, 2010b.

MCLAREN, W. et al. Deriving the consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor. **Bioinformatics**, v. 26, n. 16, p. 2069–2070, 2010.

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

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

MIONE, M.; BOSSERHOFF, A. MicroRNAs in melanocyte and melanoma biology. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 28, n. 3, p. 340–354, 2015.

MORRIS, B. J. et al. FOXO3: A Major Gene for Human Longevity - A Mini-Review. **Gerontology**, v. 61, n. 6, p. 515–525, 2015.

MORRONE, A. et al. Catecholamines and Vitiligo. **Pigment Cell Research**, v. 5, n. 2, p. 65–69, 1992.

MOSENSON, J. A. et al. A central role for inducible heat-shock protein 70 in autoimmune vitiligo. **Experimental Dermatology**, v. 22, n. 9, p. 566–569, 2013.

NASLAVSKY, M. S. et al. Whole-genome sequencing of 1,171 elderly admixed individuals from the largest Latin American metropolis (São Paulo, Brazil). **bioRxiv**, p. 1–29, 2020.

NGUYEN, N. T.; FISHER, D. E. MITF and UV responses in skin: From pigmentation to addiction. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 32, n. 2, p. 224–236, 2019.

NING, S.; PAGANO, J. S.; BARBER, G. N. IRF7: activation, regulation, modification and function. **Genes & Immunity**, v. 12, n. 6, p. 399–414, 2011.

PALERMO, B. et al. Specific Cytotoxic T Lymphocyte Responses Against Melan-A/MART1, Tyrosinase and Gp100 in Vitiligo by the Use of Major Histocompatibility Complex/Peptide Tetramers: the Role of Cellular Immunity in the Etiopathogenesis of Vitiligo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 117, n. 2, p. 326–332, 2001.

PALMERO, E. I. et al. Mechanisms and role of microRNA deregulation in cancer onset and

progression. **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, n. 3, p. 363–370, 2011.

PASSERON, T. et al. SOX9 is a key player in ultraviolet B-induced melanocyte differentiation and pigmentation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 35, p. 13984–13989, 2007.

PASSOS, G. A. et al. Update on Aire and thymic negative selection. **Immunology**, v. 153, n. 1, p. 10–20, 2018.

PATEL, A. B.; GREBER, B. J.; NOGALES, E. Recent insights into the structure of TFIID, its assembly, and its binding to core promoter. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 61, p. 17–24, 2020.

PAVAN, W. J.; STURM, R. A. The Genetics of Human Skin and Hair Pigmentation. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 20, n. 1, p. 41–72, 2019.

PENA, S. D. J. J. et al. The Genomic Ancestry of Individuals from Different Geographical Regions of Brazil Is More Uniform Than Expected. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e17063, 2011a.

PENA, S. D. J. J. et al. The Genomic Ancestry of Individuals from Different Geographical Regions of Brazil Is More Uniform Than Expected. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e17063, 2011b.

PERNIOLA, R. Twenty Years of AIRE. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018.

PORTO, I. O. P. et al. microRNAs targeting the immunomodulatory HLA-G gene: A new survey searching for microRNAs with potential to regulate HLA-G. **Molecular Immunology**, v. 65, n. 2, p. 230–241, 2015.

PRAETORIUS, C. et al. A Polymorphism in IRF4 Affects Human Pigmentation through a Tyrosinase-Dependent MITF/TFAP2A Pathway. **Cell**, v. 155, n. 5, p. 1022–1033, 2013.

PRUIM, R. J. et al. LocusZoom: regional visualization of genome-wide association scan results. **Bioinformatics**, v. 26, n. 18, p. 2336–2337, 2010.

QUILLEN, E. E. et al. Shades of complexity: New perspectives on the evolution and genetic architecture of human skin. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 168, n. S67, p. 4–26, 2019.

RAMA RAO, GR. et al. Determination of oxidative stress in vitiligo by measuring superoxide dismutase and catalase levels in vitiliginous and non-vitiliginous skin. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 75, n. 3, p. 268, 2009.

RAPOSO, G. et al. Distinct Protein Sorting and Localization to Premelanosomes,

Melanosomes, and Lysosomes in Pigmented Melanocytic Cells. **Journal of Cell Biology**, v. 152, n. 4, p. 809–824, 2001.

RASHIGHI, M. et al. CXCL10 Is Critical for the Progression and Maintenance of Depigmentation in a Mouse Model of Vitiligo. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 223, p. 223ra23-223ra23, 2014.

REGAZZETTI, C. et al. Endothelial Cells Promote Pigmentation through Endothelin Receptor B Activation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 12, p. 3096–3104, 2015.

REHMSMEIER, M. et al. Fast and effective prediction of microRNA / target duplexes. **Spring**, n. 2003, p. 1507–1517, 2004.

REHMSMEIER, M. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. **RNA**, v. 10, n. 10, p. 1507–1517, 2004.

REZAEI, N. et al. Autoimmunity as an aetiological factor in vitiligo. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 21, n. 7, p. 865–876, 2007.

RIDING, R. L. et al. Type I interferon signaling limits viral vector priming of CD8 + T cells during initiation of vitiligo and melanoma immunotherapy. **Pigment Cell & Melanoma Research**, p. pcmr.12935, 2020.

RIDING, R. L.; HARRIS, J. E. The Role of Memory CD8 + T Cells in Vitiligo. **The Journal of Immunology**, v. 203, n. 1, p. 11–19, 2019.

ROBERTS, G. H. L.; SANTORICO, S. A.; SPRITZ, R. A. The genetic architecture of vitiligo. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 33, n. 1, p. 8–15, 2020a.

ROBERTS, G. H. L.; SANTORICO, S. A.; SPRITZ, R. A. Deep genotype imputation captures virtually all heritability of autoimmune vitiligo. **Human Molecular Genetics**, v. 29, n. 5, p. 859–863, 2020b.

ROBINSON, J. T. et al. Integrative genomics viewer. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 1, p. 24–26, 2011.

SALZANO, F. M.; SANS, M. Interethnic admixture and the evolution of Latin American populations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 1 suppl 1, p. 151–170, 2014.

SATO, S. et al. CBP/p300 as a co-factor for the Microphthalmia transcription factor. **Oncogene**, v. 14, n. 25, p. 3083–3092, 1997.

SCHALLREUTER, K. U. et al. In Vivo and In Vitro Evidence for Hydrogen Peroxide (H₂O₂) Accumulation in the Epidermis of Patients with Vitiligo and its Successful Removal by a UVB-Activated Pseudocatalase. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 4, n. 1, p. 91–96, 1999.

SCHALLREUTER, K. U. et al. Estrogens Can Contribute to Hydrogen Peroxide Generation and Quinone-Mediated DNA Damage in Peripheral Blood Lymphocytes from Patients with Vitiligo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 5, p. 1036–1042, 2006.

SCHALLREUTER, K. U. et al. Basic evidence for epidermal H₂O₂/ONOO⁻-mediated oxidation/nitration in segmental vitiligo is supported by repigmentation of skin and eyelashes after reduction of epidermal H₂O₂ with topical NB-UVB-activated pseudocatalase PC-KUS. **The FASEB Journal**, v. 27, n. 8, p. 3113–3122, 2013.

SCHALLREUTER, K. U.; WOOD, J. M.; BERGER, J. Low Catalase Levels in the Epidermis of Patients with Vitiligo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 97, n. 6, p. 1081–1085, 1991.

SCHUNTER, J. A. et al. A novel FoxD3 Variant Is Associated With Vitiligo and Elevated Thyroid Auto-Antibodies. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 100, n. 10, p. E1335–E1342, 2015.

SECOLIN, R. et al. Distribution of local ancestry and evidence of adaptation in admixed populations. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 13900, 2019.

SEHGAL, V.; SRIVASTAVA, G. Vitiligo: Compendium of clinico-epidemiological features. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 73, n. 3, p. 149, 2007.

SERRE, C.; BUSUTTIL, V.; BOTTO, J.-M. Intrinsic and extrinsic regulation of human skin melanogenesis and pigmentation. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 40, n. 4, p. 328–347, 2018.

SHAKYA, A. et al. Oct1 Is a Switchable, Bipotential Stabilizer of Repressed and Inducible Transcriptional States. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 1, p. 450–459, 2011.

SHEINBOIM, D. et al. OCT4 impedes cell fate redirection by the melanocyte lineage master regulator MITF in mouse ESCs. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1022, 2017.

SHIMAZU, T. et al. Suppression of Oxidative Stress by γ -Hydroxybutyrate, an Endogenous Histone Deacetylase Inhibitor. **Science**, v. 339, n. 6116, p. 211–214, 2013.

SIRUGO, G.; WILLIAMS, S. M.; TISHKOFF, S. A. The Missing Diversity in Human Genetic Studies. **Cell**, v. 177, n. 1, p. 26–31, 2019.

SPEECKAERT, R. et al. Critical appraisal of the oxidative stress pathway in vitiligo: a systematic review and meta-analysis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 32, n. 7, p. 1089–1098, 2018a.

SPEECKAERT, R. et al. Critical appraisal of the oxidative stress pathway in vitiligo: a systematic review and meta-analysis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 32, n. 7, p. 1089–1098, 2018b.

SPRITZ, R. A. Six Decades of Vitiligo Genetics: Genome-Wide Studies Provide Insights into Autoimmune Pathogenesis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 2, p. 268–273, 2012.

SPRITZ, R. A.; SANTORICO, S. A. The Genetic Basis of Vitiligo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 141, n. 2, p. 265–273, 2021.

SRIVASTAVA, N. et al. Dendritic cells sub-sets are associated with inflammatory cytokine production in progressive vitiligo disease. **Archives of Dermatological Research**, 2021.

STURM, R. A. Molecular genetics of human pigmentation diversity. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n. R1, p. R9–R17, 2009.

SUMITOMO, A. et al. LPA Induces Keratinocyte Differentiation and Promotes Skin Barrier Function through the LPAR1/LPAR5-RHO-ROCK-SRF Axis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 139, n. 5, p. 1010–1022, 2019.

SUN, X. et al. Study on genetic epidemiology on 815 patients with vitiligo in Zhejiang area. **Zhonghua liu xing bing xue za zhi = Zhonghua liuxingbingxue zazhi**, v. 26, n. 11, p. 911–4, 2005.

SUN, X. et al. Genetic epidemiology of vitiligo: a study of 815 probands and their families from south China. **International Journal of Dermatology**, v. 45, n. 10, p. 1176–1181, 2006.

TACHIBANA, M. MITF: A Stream Flowing for Pigment Cells. **Pigment Cell Research**, v. 13, n. 4, p. 230–240, 2000.

TAKAHASHI, K. et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861–872, 2007.

TANG, L. et al. Vitamin D protects human melanocytes against oxidative damage by

activation of Wnt/ β -catenin signaling. **Laboratory Investigation**, v. 98, n. 12, p. 1527–1537, 2018.

TAZI-AHNINI, R. et al. The autoimmune regulator gene (AIRE) is strongly associated with vitiligo. **British Journal of Dermatology**, p. ???-???, 2008.

THE 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM. A global reference for human genetic variation. **Nature**, v. 526, n. 7571, p. 68–74, 2015.

THOMAS, A. J.; ERICKSON, C. A. FOXD3 regulates the lineage switch between neural crest-derived glial cells and pigment cells by repressing MITF through a non-canonical mechanism. **Development**, v. 136, n. 11, p. 1849–1858, 2009.

THORVALDSDOTTIR, H.; ROBINSON, J. T.; MESIROV, J. P. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. **Briefings in Bioinformatics**, v. 14, n. 2, p. 178–192, 2013.

TOOSI, S.; ORLOW, S. J.; MANGA, P. Vitiligo-Inducing Phenols Activate the Unfolded Protein Response in Melanocytes Resulting in Upregulation of IL6 and IL8. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 11, p. 2601–2609, 2012.

UHLEN, M. et al. Tissue-based map of the human proteome. **Science**, v. 347, n. 6220, p. 1260419–1260419, 2015.

VACHTENHEIM, J.; BOROVSANSKÝ, J. “Transcription physiology” of pigment formation in melanocytes: central role of MITF. **Experimental Dermatology**, v. 19, n. 7, p. 617–627, 2010.

VACHTENHEIM, J.; ŠESTÁKOVÁ, B.; TUHÁČKOVÁ, Z. Inhibition of MITF transcriptional activity independent of targeting p300/CBP coactivators. **Pigment Cell Research**, v. 20, n. 1, p. 41–51, 2007.

VAISH, U. et al. Micro RNAs upregulated in Vitiligo skin play an important role in its aetiopathogenesis by altering TRP1 expression and keratinocyte-melanocytes cross-talk. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 10079, 2019.

VAN DEN BOORN, J. G. et al. Autoimmune Destruction of Skin Melanocytes by Perilesional T Cells from Vitiligo Patients. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 129, n. 9, p. 2220–2232, 2009.

VAN DEN WIJNGAARD, R. et al. Local Immune Response in Skin of Generalized Vitiligo

Patients. **Laboratory Investigation**, v. 80, n. 8, p. 1299–1309, 2000.

VAN DER AUWERA, G. A. et al. From FastQ Data to High-Confidence Variant Calls: The Genome Analysis Toolkit Best Practices Pipeline. In: **Current Protocols in Bioinformatics**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2013. v. 11p. 11.10.1-11.10.33.

VERDONI, A. M.; IKEDA, S.; IKEDA, A. Serum response factor is essential for the proper development of skin epithelium. **Mammalian Genome**, v. 21, n. 1–2, p. 64–76, 2010.

WAGNER, R. Y. et al. Altered E-Cadherin Levels and Distribution in Melanocytes Precede Clinical Manifestations of Vitiligo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 7, p. 1810–1819, 2015.

WAKAMATSU, K. et al. Characterization of melanin in human iridal and choroidal melanocytes from eyes with various colored irides. **Pigment cell & melanoma research**, v. 21, n. 1, p. 97–105, 2008.

WAN, P.; HU, Y.; HE, L. Regulation of melanocyte pivotal transcription factor MITF by some other transcription factors. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 354, n. 1–2, p. 241–246, 2011.

WAŃKOWICZ-KALIŃSKA, A. et al. Immunopolarization of CD4⁺ and CD8⁺ T Cells to Type-1-Like is Associated with Melanocyte Loss in Human Vitiligo. **Laboratory Investigation**, v. 83, n. 5, p. 683–695, 2003.

WARD, L. D.; KELLIS, M. HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. D930–D934, 2012.

WIRIYASERMKUL, P.; MORIYAMA, S.; NAGAMORI, S. Membrane transport proteins in melanosomes: Regulation of ions for pigmentation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1862, n. 12, p. 183318, 2020.

XIE, H. et al. Vitiligo: How do oxidative stress-induced autoantigens trigger autoimmunity? **Journal of Dermatological Science**, v. 81, n. 1, p. 3–9, 2016.

YAN, S. et al. Current insight into the roles of microRNA in vitiligo. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 4, p. 3211–3219, 2020.

YU, J. et al. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells.

Science, v. 318, n. 5858, p. 1917–1920, 2007.

ZERLANKO, B. J. et al. Premature Senescence and Increased TGF β Signaling in the Absence of Tgif1. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35460, 2012.

ZHANG, X.-J. et al. Characteristics of genetic epidemiology and genetic models for vitiligo. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 51, n. 3, p. 383–390, 2004.

ZHANG, Y. et al. The Prevalence of Vitiligo: A Meta-Analysis. **PLOS ONE**, v. 11, n. 9, p. e0163806, 2016.

ZHANG, Z. et al. Differentially expressed microRNAs in peripheral blood mononuclear cells of non-segmental vitiligo and their clinical significance. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 35, n. 2, p. 1–10, 2021.