



Felícia de Araujo Lima

**Estudos de Associação de Genes de  
Pigmentação com Cor da Pele, Cabelo  
e Olhos para Fenotipagem Forense  
em Amostra Brasileira**

**Atena**  
Editora

Ano 2019



**Felícia de Araujo Lima**

**Estudos de Associação de Genes de  
Pigmentação com Cor da Pele, Cabelo  
e Olhos para Fenotipagem Forense  
em Amostra Brasileira**

**Atena**  
Editora

Ano 2019

2019 by Atena Editora  
Copyright © Atena Editora  
Copyright do Texto © 2019 Os Autores  
Copyright da Edição © 2019 Atena Editora  
Editora Chefe: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Antonella Carvalho de Oliveira  
Diagramação: Geraldo Alves  
Edição de Arte: Lorena Prestes  
Revisão: Os Autores



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons. Atribuição 4.0 Internacional (CC BY 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

### **Conselho Editorial**

#### **Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins  
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso  
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais  
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília  
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristina Gaio – Universidade de Lisboa  
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia  
Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Farias – Universidade Estácio de Sá  
Prof. Dr. Eloi Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima  
Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões  
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice  
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Universidade Federal do Maranhão  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Regina Gardacho Pietrobom – Universidade Estadual do Centro-Oeste  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia  
Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador  
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

#### **Ciências Agrárias e Multidisciplinar**

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano  
Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia  
Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa  
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão  
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará  
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

### Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás  
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri  
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina  
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria  
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

### Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto  
Prof. Dr. Alexandre Leite dos Santos Silva – Universidade Federal do Piauí  
Profª Drª Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará  
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande  
Profª Drª Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

<b>Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)</b>	
L732e	Lima, Felícia de Araujo. Estudos de associação de genes de pigmentação com cor da pele, cabelo e olhos para fenotipagem forense em amostra brasileira [recurso eletrônico] / Felícia de Araujo Lima. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019.  Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-805-2 DOI 10.22533/at.ed.052190312  1. Genética forense – Brasil. 2. Prova (Direito). I. Título. CDD 614.1
<b>Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422</b>	

Atena Editora  
Ponta Grossa – Paraná - Brasil  
[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)  
contato@atenaeditora.com.br

## SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
INTRODUÇÃO .....	8
OBJETIVOS.....	21
MATERIAL E MÉTODOS.....	22
RESULTADOS .....	26
DISCUSSÃO .....	60
CONCLUSÕES .....	67
REFERÊNCIAS.....	68
ANEXOS .....	75

## ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO DE GENES DE PIGMENTAÇÃO COM COR DA PELE, CABELO E OLHOS PARA FENOTIPAGEM FORENSE EM AMOSTRA BRASILEIRA

**Felícia de Araujo Lima**

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Departamento de Medicina Legal  
São Paulo – São Paulo

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

**PALAVRAS-CHAVE:** genética forense; polimorfismo de nucleotídeo único; estudos de associação genética; fenótipo; genótipo; identificação de vítimas; Brasil.



## ASSOCIATION STUDY OF PIGMENTATION GENES WITH SKIN, HAIR AND EYES COLOR FOR FORENSIC PHENOTYPING PURPOSES IN BRAZILIAN SAMPLE

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

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

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

O sistema CODIS (*Combined DNA Index System*) é uma base de dados de DNA, fundada pelo FBI na década de 1990 com a finalidade de auxiliar os laboratórios criminais americanos na identificação de suspeitos de crimes. Atualmente, a maioria dos marcadores do tipo STR que compõem o CODIS são os utilizados pela comunidade forense internacional e também na área de pesquisa científica. A partir de 1º de Janeiro de 2017 o CODIS passou a incorporar sete marcadores STRs adicionais (D1S1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D19S433, D22S1045) aos 13 já existentes (CSF1PO, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, FGA, THO1, TPOX e vWA), totalizando 20 marcadores genéticos do tipo STR, presentes tanto em cromossomos autossômicos como em cromossomos sexuais (<https://www.fbi.gov/about-us/lab/biometric-analysis/codis/>). A partir das análises desses marcadores, cria-se um perfil de DNA e a informação é armazenada em bancos de DNA civis ou criminais (locais, estaduais e federais) para permitir a busca informatizada com o intuito de identificar pessoas desaparecidas ou suspeitos de crimes (FBI – <https://www.fbi.gov/about-us/lab/biometric-analysis/codis/>; Hares, 2015). Uma das maiores limitações desta técnica é a necessidade de uma amostra referência para comparação. Nos casos criminais, na falta imediata desse tipo de amostra, o perfil gerado da amostra questionável é armazenado em bancos de dados, para futuras comparações (Butler, 2011; Kayser; de Knijff 2011; Kayser; Schneider, 2009; Zieger; Utz, 2015).

Mesmo diante desta problemática, o uso dos STRs nas ciências forenses é



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

## 2.1 Fenotipagem Forense pelo DNA

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

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

Os primeiros estudos relacionando genótipos a fenótipos foram realizados com o uso de amostras das populações americana e europeia e identificaram regiões no DNA que são representativas na caracterização da coloração branca da pele, bem como na cor de cabelo ruivo e loiro e também na variação da pigmentação da íris, apontando a importância de compreender a relação entre genótipos e fenótipos complexos, como cor da pele, cabelo e olhos (Frudakis; Terravainen; Thomas, 2007; Sulem et al, 2007). O processo de predizer os fenótipos de um indivíduo, com finalidade forense, a partir da verificação de suas amostras biológicas é conhecido como Fenotipagem Forense pelo DNA ou FDP (do inglês *Forensic DNA Phenotyping*) (Kayser, 2015; Kayser; Schneider, 2009), termo que foi apresentado e descrito primeiramente pelos investigadores Koops & Schellekens em 2008. Para este tipo de abordagem obtêm-se o DNA a partir da amostra biológica de origem desconhecida e, com base na análise de marcadores validados para os fenótipos pesquisados, é possível inferir características externamente visíveis, ou EVCs (do inglês *Externally Visible Characteristics*), dentre elas a cor da pele, a cor do cabelo e a cor dos olhos. Logo, a Fenotipagem Forense pelo DNA fornece mais detalhes sobre o sujeito ao qual determinada amostra biológica pertence, sem a necessidade de uma amostra referência para análise comparativa (Frudakis, 2008; Kayser; Schneider, 2009; Liu; Wen; Kayser, 2013; Maroñas et al, 2015).

Em 2009, um estudo conduzido na Europa verificou a associação entre 37 SNPs de pigmentação e a cor dos olhos e, ao fazer o genótipo de amostras pertencentes a 6.168 holandeses, desenvolveu um modelo capaz de inferir essa característica. Os dados obtidos mostraram que 67,6% dos indivíduos tinham olhos azuis, 22,8% foram sugestivos para olhos castanhos e 9,6% foram sugestivos de indivíduos com

pigmentação intermediária da íris (nem azul nem castanha) (Liu et al, 2009). Com base no estudo anterior, o mesmo grupo criou um sistema de análise multiplex, denominado IrisPlex, no qual seis (*HERC2* rs12913832, *OCA2* rs1800407, *SLC24A4* rs12896399, *SLC45A2* rs16891982, *TYR* rs1393350, e *IRF4* rs12203592) dentre os 37 SNPs foram validados quanto a sua capacidade preditiva para a pigmentação da íris, sendo que o modelo estatístico desenvolvido garante 90% de precisão na obtenção do dado (Walsh et al, 2011; Walsh et al, 2012).

Em 2013, esse mesmo grupo apresentou uma atualização do ensaio, denominada de HIrisPlex, demonstrando a possibilidade de prever simultaneamente tanto a cor do cabelo quanto a cor da íris (cor dos olhos). Neste estudo foi verificada a sensibilidade de predição desses dois fenótipos por meio da análise multiplex de 24 marcadores moleculares, sendo 23 do tipo SNP (incluindo os 6 SNPs presentes no IrisPlex) e uma alteração do tipo INDEL (Polimorfismo do tipo Inserção-Deleção), presentes em 11 genes. Além da alta capacidade para predição de cor de olhos, já observada pelos pesquisadores utilizando o sistema IrisPlex, o sistema HIrisPlex se mostrou altamente eficiente na predição de cor de cabelo preto, ruivo, castanho e loiro com acurácia de 87,5%, 80%, 78,5% e 69,5%, respectivamente (Walsh et al, 2013; Walsh et al, 2014).

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

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

Outro trabalho que objetivou avaliar a confiabilidade da predição de fenótipos de pigmentação com o uso de uma grande base de dados de marcadores genéticos em indivíduos com fenótipos conhecidos e, a partir da análise molecular tentou prever o fenótipo de pigmentação de espécimes pré-históricos de *Homo* e de indivíduos contemporâneos cujas características externamente visíveis não são conhecidas, realizou a comparação dos dados fenotípicos preditos e observados por meio da análise de 124 SNPs em 33 regiões gênicas e sete regiões intergênicas de 30 indivíduos, cinco deles pré-históricos, cujos genomas nucleares completos estão disponíveis nas bases de dados públicas, tais como UCSC. Este estudo mostrou que para os fenótipos preditos por meio da análise molecular versus observados, a percentagem de concordância foi: para cor da pele: 64%; para cor do cabelo: 44%

e para cor dos olhos: 36%, já para os resultados obtidos pela análise molecular versus o fenótipo sugerido, essas percentagens foram de 60% para cor da pele, 42% para cor do cabelo e 67% para cor dos olhos. (Cerqueira et al., 2012). Este estudo permitiu demonstrar a aplicabilidade que marcadores de pigmentação podem ter na determinação de fenótipos na área forense.

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

## **2.2 Evolução da Pigmentação Humana**

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

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

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

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

A exposição excessiva à UVR também promove o decaimento na concentração plasmática de folato, elemento necessário para a síntese e reparo do DNA, cuja deficiência pode causar malformações fetais. Sendo um componente que está sob influência da ação da UVR, acredita-se que a manutenção do folato também

esteja relacionada ao processo de seleção natural que promoveu as variações na pigmentação (Juzeniene et al, 2009; Lucock, 2000; Robins, 2005).

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

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

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

Uma vez que os genes envolvidos no processo de pigmentação como um todo são os mesmos para pele, olhos e cabelo, essas características estão relacionadas e, acredita-se que a evolução adaptativa do processo de pigmentação desses traços tenha acontecido ao mesmo tempo, sendo que as diferenças observadas podem representar efeitos pleiotrópicos dos genes de pigmentação da pele, que agiram também influenciando as variações na cor dos olhos e do cabelo (Hellenthal et al, 2014; Jablonski; Chaplin, 2014).

### **2.3 Pigmentação Humana e Melanogênese**

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

O polímero responsável pela pigmentação humana é a melanina, um biopolímero

complexo capaz de absorver radicais livres gerados no citoplasma, luz visível e radiação ionizante, inclusive ultravioleta, bem como neutralizar espécies reativas de oxigênio (ROS) (Chang, 2012; Jablonski, 2012).

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

A melanogênese é um processo complexo e depende de muitas vias que, quando alteradas, podem ocasionar hipo/hiperpigmentação, devido à quantidade de melanina presente dentro dos melanossomos, com ou sem alteração no número dessas organelas, uma vez que o número de melanossomos em indivíduos de pele negra ou branca, por exemplo, é praticamente o mesmo, porém estes variam de densidade e tamanho. Pode ocorrer ainda a combinação entre os dois tipos de melanina, por exemplo, quantidades pequenas de eumelanina no cabelo, podem se misturar com feomelanina e formar os fenótipos intermediários (Park et al, 2009; Videira; Moura; Magina, 2013).

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

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



et al, 2007; Nan et al, 2009a).

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

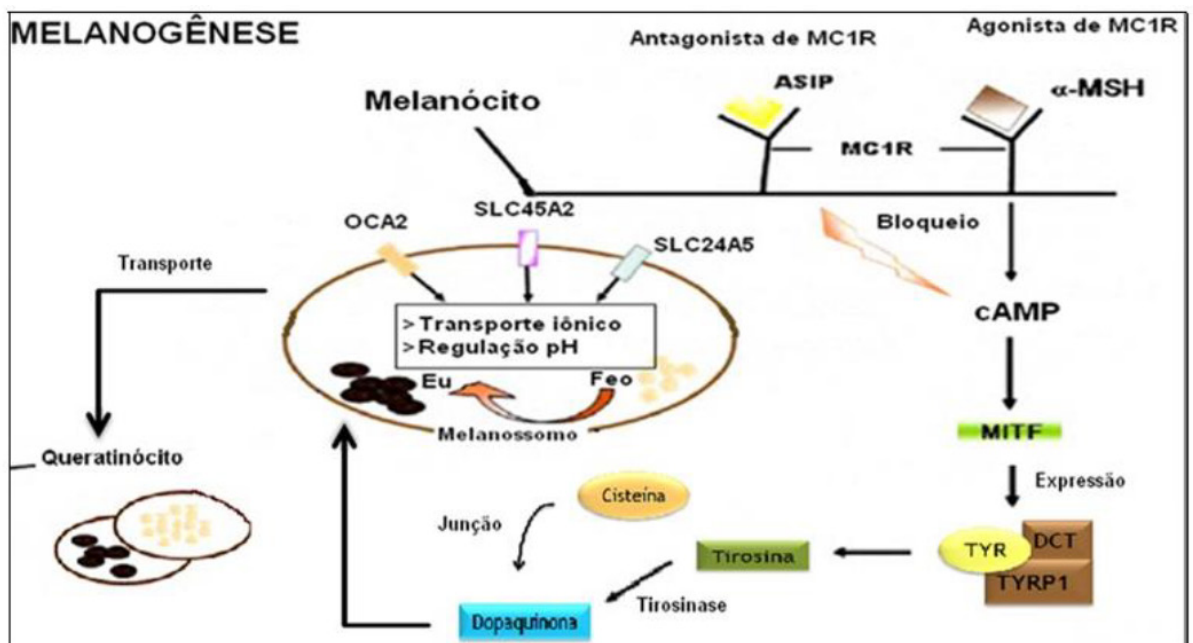


Figura 1: Esquema da síntese de melanina. Hormônio  $\alpha$ -MSH se liga ao receptor MC1R, desencadeando aumento de cAMP e ativação do fator de transcrição MITF. MITF favorece expressão de genes, como o *TYR*. *TYR* codifica tirosinase que converte tirosina em dopaquinona. Em seguida, dopaquinona se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

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

Após a conjugação da dopaquinona com cisteínil-dopa, DHI ou DHICA, o produto

é levado para dentro dos melanossomos. Dentro dessas organelas o controle do pH e a quantidade de íons presente, fatores cuja manutenção depende de proteínas transportadoras de solutos, como a NCKX5 (do inglês *sodium/potassium/calcium exchanger 5*), são determinantes na maturação da melanina e também podem definir o tipo de pigmento que será sintetizado, uma vez que ambientes com pH mais básico favorecem a produção de eumelanina, enquanto que ambientes com pH mais ácido favorecem a síntese feomelanina (Lamason et al, 2005; Scherer; Kumar, 2010; Videira; Moura; Magina, 2013; Wilson et al, 2013).

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

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

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

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

Resumidamente, a regulação da melanogênese em humanos é controlada em diferentes níveis. Durante o desenvolvimento embrionário os melanócitos são células derivadas da crista neural e quando maduros migram para os tecidos onde vão se estabelecer. O padrão de migração está sob controle genético e representa o primeiro nível de regulação da melanogênese. A síntese de melanina também é regulada a nível celular por controle da formação dos melanossomos, que podem ser produzidos em vários tamanhos e densidades, dependendo do seu conteúdo de melanina. Finalmente, a melanogênese é regulada em nível subcelular, onde ocorre controle da expressão dos genes envolvidos nesse processo (Ebanks; Wickett; Boissy, 2009; Park et al, 2009; Schallreuter et al, 2008; Videira; Moura; Magina,

2013).

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

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

### 2.3.1 SLC24A5

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

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

Embora a função exata do gene *SLC24A5* não seja totalmente conhecida, duas funções potenciais podem ser citadas: 1) influenciar a variação na pigmentação por mecanismos ainda desconhecidos que afetam os níveis de esteróis celulares (Wilson et al, 2013) e 2) codificar a proteína responsável por transportar  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^{+}$  para melanossomos realizando a troca por sódio (Lamason et al, 2005). Esta proteína possui estrutura com trechos hidrofóbicos e hidrofílicos intercalados e um ensaio de marcação celular mostrou que NCKX5 se localiza no interior das células fazendo parte das proteínas da rede trans-Golgi. Ela é descrita como uma proteína transportadora de solutos que exerce seu papel nos melanossomos agindo em canais iônicos dependentes de potássio e regulando o pH dentro dessas organelas e a proteína defeituosa leva ao albinismo oculocutâneo tipo 6 (OCA6). (Wilson et al, 2013).

A maturação e a manutenção da melanina são reguladas principalmente pela concentração de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dentro dos melanossomos, e estudos funcionais sugeriram um modelo de atuação de NCKX5 na absorção de cálcio dentro das organelas e apontaram ainda que o gene *SLC24A5* é mais expresso em células da derme, dos tecidos oculares e também em células com melanoma. Com isso, pode-

se concluir que a expressão de SLC24A5 é importante para as células produtoras de melanina (Altimimi; Schnetkamp, 2007; Wilson et al, 2013).

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

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

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

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

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

Na população brasileira a verificação das frequências dos alelos G e A em grupos de diferentes regiões do país (Sul, Sudeste e Nordeste), apontou que grande parte dos indivíduos com ancestralidade europeia exibe o alelo A e que esse polimorfismo foi associado à cor de pele branca, olhos azuis e cabelo loiro. Por outro lado, a

presença do alelo G foi relacionada com elevado índice de melanina e características de pele negra, olhos castanhos e cabelo preto, estando o alelo ancestral G presente na maioria dos indivíduos que possuem ancestralidade africana (Cerqueira et al, 2014; Durso et al, 2014; Lima; de Toledo Gonçalves; Fridman, 2015).

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

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

### 2.3.2 ASIP

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

Os achados sobre a expressão do gene *ASIP* descrevem a ocorrência de um polimorfismo na região 3'UTR (rs6058017) resultando na substituição de uma guanina por uma adenina na posição 8818 do gene (G8818A). A hipótese abordada



para a ação deste SNP sugere que a presença do alelo G promove instabilidade do RNA mensageiro e degradação prematura do transcrito. Deste modo, não há ação antagonista da proteína ASIP sobre o  $\alpha$ -MSH, possibilitando a ligação do hormônio ao seu receptor e promovendo a síntese de eumelanina. Considerando o efeito oposto, quando o alelo A (variante) está presente, o transcrito é devidamente processado e a proteína exerce ação bloqueadora na produção de eumelanina, favorecendo a síntese de feomelanina (Aberdam et al, 1998; Manne; Argeson; Siracusa, 1995; Voisey; Kelly; Van Daal, 2003).

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

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

### 2.3.3 TYR

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

O gene *TYR* foi o primeiro a ser identificado e descrito como relacionado ao processo de pigmentação, pois as mutações observadas se mostraram associadas com o albinismo, uma vez que a deleção total ou parcial da tirosinase causa má regulação na síntese de melanina e pode levar ao albinismo oculocutâneo tipo 1 (OCA1) (Oetting et al, 2009). Esta forma de albinismo é caracterizada pela deficiência na síntese e distribuição de melanina, ocasionando hipopigmentação da pele, da íris e do cabelo. O albinismo oculocutâneo tipo 1 é subdividido em OCA1A e OCA1B. No primeiro caso não há produção de melanina e, no caso de OCA1B ocorre produção parcial de pigmento na pele e íris (Ko et al, 2012; Oetting et al, 2009; Sturm; Duffy, 2012).

Diversas mutações no gene *TYR* já foram mapeadas e respondem por 46% dos casos de albinismo em caucasianos; além disso, estima-se que 1% dos europeus



que habitam o Norte da Europa apresenta alguma mutação no gene (Oetting, 2003; Scherer; Kumar, 2010; Sturm; Duffy, 2012).

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

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

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

Os estudos forenses que relacionam genótipos com EVCs foram inicialmente conduzidos em populações que apresentam baixos índices de miscigenação, onde a maioria das pessoas exibe EVCs semelhantes; logo, estudos com amostras de populações miscigenadas se tornam interessantes, pois podem ampliar o conhecimento sobre o papel dos genes de pigmentação.

### 3 | OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

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

#### 3.2 Específicos

- Caracterizar as frequências dos polimorfismos rs1426654, rs16960620, rs2555364 (*SLC24A5*), rs6058017 (*ASIP*) e rs1126809 (*TYR*) em amostra

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

## 4 | MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Casuística

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

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

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

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

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

para comparação estatística e para padronizar este estudo com as nomenclaturas encontradas na literatura.

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

## 4.2 Extração do DNA

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

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

## 4.3 Amplificação do DNA

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

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

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

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

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

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

Os *primers* para amplificação do polimorfismo de interesse do gene *TYR* (rs1126809), que é uma transição de uma adenina para uma guanina, resultando na alteração de aminoácidos arginina por glutamina (Arg402Gln) da proteína tirosinase (Oetting et al, 2009), foram desenhados com ajuda do programa Primer3 ([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)).

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

Gene	Polimorfismo	Primer Forward (F)	Primer Reverse (R)	Referência
	rs1426654	5'-TCATAAAGAAGCAAAACATTGGA-3'	5'-AGCACAGATGCCAAGGAGAT-3'	Valenzuela et al, 2010
<b>SLC24A5</b>	rs16960620	5'-TGAACAATGACATGACTGAAAAA-3'	5'-AGCTGAAGATTTGGCAGTGG-3'	Giardina et al, 2008
	rs2555364	5'-GACACAGCCGTCATATGCTC-3'	5'-GGCTTTGGTATTCCCCATCT-3'	Giardina et al, 2008
<b>ASIP</b>	rs6058017	5'-GGCTTCGATGAAGAAAGTGG-3'	5'-AGGGGATAGCCTCGTTCCTA-3'	Valenzuela et al, 2010
<b>TYR</b>	rs1126809	5'-CAACATCTTCCATGTCTCCAG-3'	5'-TCATAGCCCAGATCTTTGGA-3'	-

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

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

#### 4.4 Reação de Sequenciamento

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

As reações de sequenciamento foram conduzidas em um volume total de 10µL, contendo o produto de PCR amplificado e purificado (5µL), 10pMol do respectivo *primer* (2µL) (Invitrogen Life Technologies), 1µL de BigDye Terminator Cycle Sequencing v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) e 2µL de seu respectivo

tampão. A ciclagem térmica foi realizada em termociclador Mastercycler (Eppendorf), com condições de desnaturação inicial por 1 minuto a 96°C, seguido de 30 ciclos de desnaturação por 15 segundos a 96°C, anelamento por 15 segundos a 50°C e extensão por 4 minutos a 60°C.

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

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

#### 4.5 Análise Estatística

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

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

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

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

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

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

Essas análises foram realizadas para os três modelos genéticos propostos

(Modelos de Genótipo, Dominante e Recessivo).

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

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

## 5 | RESULTADOS

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

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

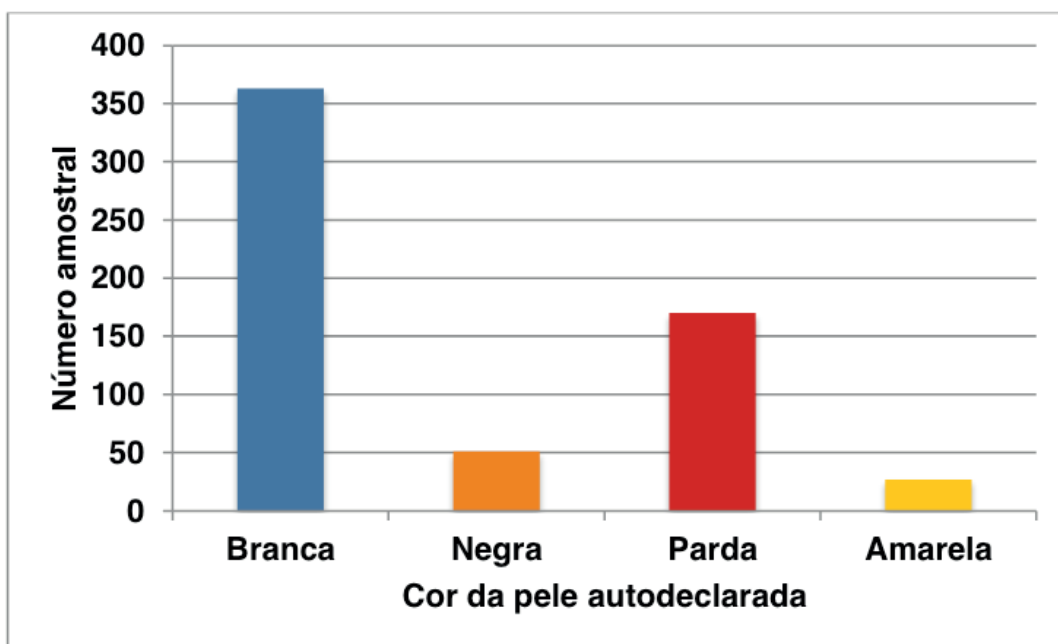


Gráfico 1: Número de indivíduos autodeclarados para cada uma das categorias de cor da pele.



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

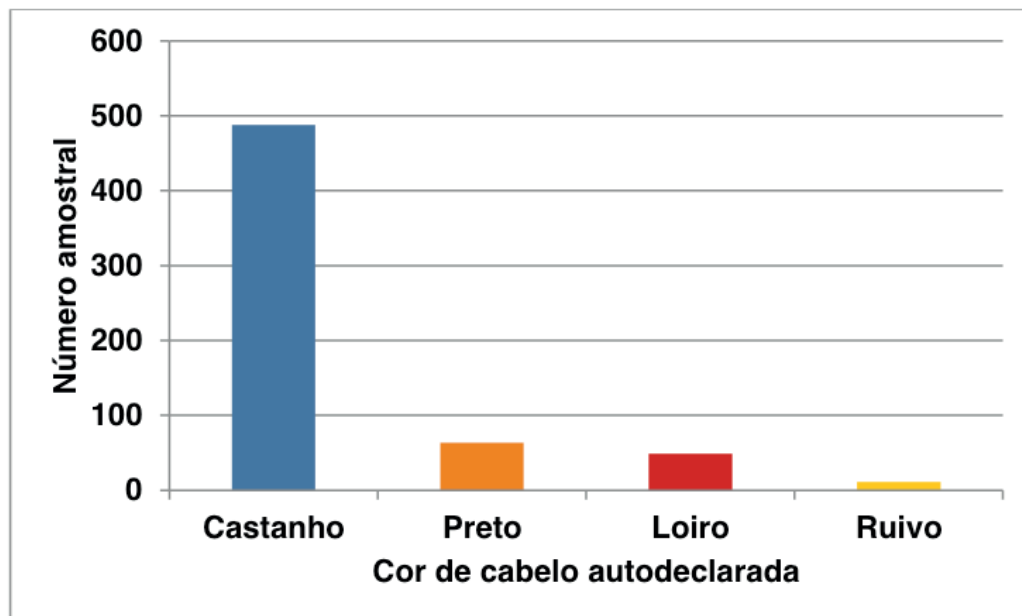


Gráfico 2: Número de indivíduos autodeclarados para cada uma das categorias de cor do cabelo.

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

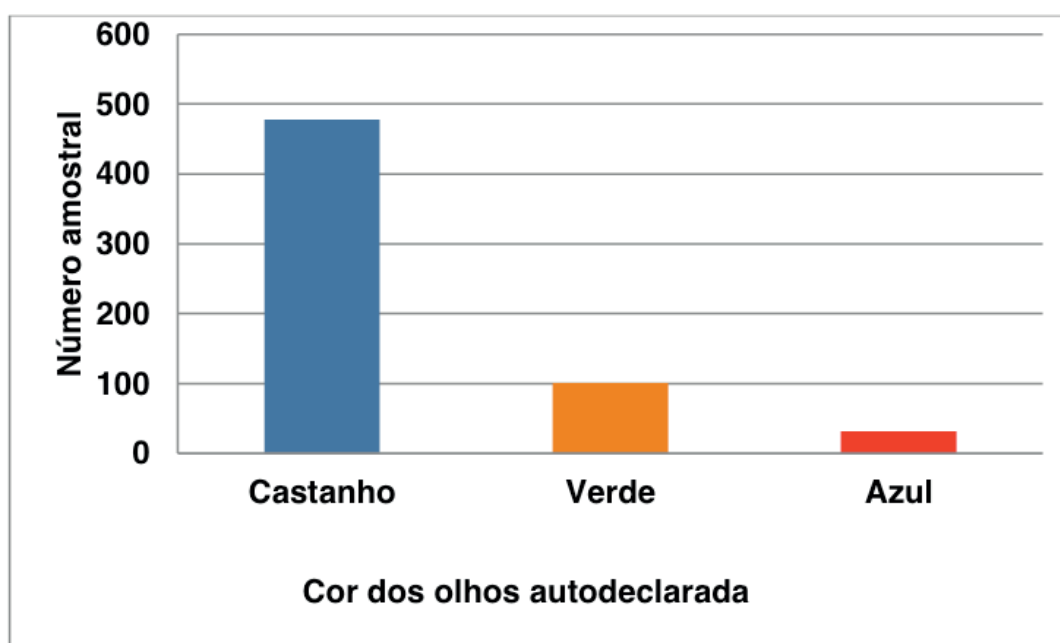


Gráfico 3: Número de indivíduos autodeclarados para cada uma das categorias de cor dos olhos.

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

## 5.1 SLC24A5

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

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

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

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

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

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

Variável	Categoria	SLC24A5 rs16960620			Total	$\chi^2$	p	pFisher
		AA	AG	GG				

Cor dos olhos categórico	Castanho escuro	N	282	3	1	286	4,295	0,83	0,88
		%	98,6%	1,0%	0,3%	100,0%			
	Castanho médio	N	107	0	0	107			
		%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%			
	Castanho claro	N	70	0	0	70			
		%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%			
	Verde	N	97	0	0	97			
	%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%				
Cor dos olhos agrupado	Azul	N	31	0	0	31	1,113	0,573	1
		%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%			
	Total	N	587	3	1	591			
		%	99,3%	0,5%	0,2%	100,0%			
	Castanhos	N	459	3	1	463			
		%	99,1%	0,6%	0,2%	100,0%			
	Azul+Verde	N	128	0	0	128			
	%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%				
	Total	N	587	3	1	591			
		%	99,3%	0,5%	0,2%	100,0%			

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

N: Número de indivíduos; \*p<0,05.

Variável	Categoria	<i>SLC24A5</i> rs16960620			Total	$\chi^2$	p	pFisher
		Dominante						
		AA	AG+GG					
Cor da pele	Negro	N	48	0	48	47,892	<0,001*	<0,001*
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Branco	N	348	1	349			
		%	99,7%	0,3%	100,0%			
	Pardo	N	168	0	168			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Amarelo	N	23	3	26			
%		88,5%	11,5%	100,0%				
Total	N	587	4	591				
	%	99,3%	0,7%	100,0%				
Cor da pele agrupado	Negro	N	48	0	48	0,356	0,551	1
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Não negro	N	539	4	543			
		%	99,3%	0,7%	100,0%			
	Total	N	587	4	591			
	%	99,3%	0,7%	100,0%				

Cor dos cabelos	Preto	N	61	1	62	1,215	0,75	0,599
		%	98,4%	1,6%	100,0%			
	Castanho	N	468	3	471			
		%	99,4%	0,6%	100,0%			
	Ruivo	N	10	0	10			
	%	100,0%	0,0%	100,0%				
	Loiro	N	48	0	48			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Total	N	587	4	591			
		%	99,3%	0,7%	100,0%			
Cor de cabelo agrupado	Preto++ Castanho	N	529	4	533	0,438	0,508	1
		%	99,2%	0,8%	100,0%			
	Rui- vo+Loiro	N	58	0	58			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Total	N	587	4	591			
		%	99,3%	0,7%	100,0%			

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

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

N: Número de indivíduos; \*p<0,05.

Variável	Categoria	SLC24A5 rs16960620		Total	$\chi^2$	p	pFisher
		Recessivo					
		AA+AG	GG				

Cor da pele	Negro	N	48	0	48	21,768	<b>0,041*</b>	<b>0,041*</b>
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Branco	N	349	0	349			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Pardo	N	168	0	168			
%		100,0%	0,0%	100,0%				
Amarelo	N	25	1	26				
	%	96,2%	3,8%	100,0%				
Total	N	590	1	591				
	%	99,8%	0,2%	100,0%				
Cor da pele agrupado	Negro	N	48	0	48	0,089	0,766	1
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Não negro	N	542	1	543			
%		99,8%	0,2%	100,0%				
Total	N	590	1	591				
	%	99,8%	0,2%	100,0%				
Cor dos cabelos	Preto	N	62	0	62	0,255	0,968	1
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Castanho	N	470	1	471			
		%	99,8%	0,2%	100,0%			
	Ruivo	N	10	0	10			
%		100,0%	0,0%	100,0%				
Loiro	N	48	0	48				
	%	100,0%	0,0%	100,0%				
Total	N	590	1	591				
	%	99,8%	0,2%	100,0%				
Cor de cabelo agrupado	Preto+Castanho	N	532	1	533	0,109	0,741	0,649
		%	99,8%	0,2%	100,0%			
	Ruivo+Loiro	N	58	0	58			
%		100,0%	0,0%	100,0%				
Total	N	590	1	591				
	%	99,8%	0,2%	100,0%				
Variável	Categoria	<b>SLC24A5 rs16960620_Recessivo</b>			Total	$\chi^2$	p	pFisher
		AA+AG	GG					
Cor dos olhos categórico	Castanho escuro	N	285	1	286	1,068	0,899	1
		%	99,7%	0,3%	100,0%			
	Castanho médio	N	107	0	107			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Castanho claro	N	70	0	70			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Verde	N	97	0	97			
%		100,0%	0,0%	100,0%				
Azul	N	31	0	31				
	%	100,0%	0,0%	100,0%				
Total	N	590	1	591				
	%	99,8%	0,2%	100,0%				



Cor dos olhos agru- pado	Castanhos	N	462	1	463	0,277	0,599	1
		%	99,8%	0,2%	100,0%			
	Azul+Ver- de	N	128	0	128			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Total	N	590	1	591			
		%	99,8%	0,2%	100,0%			

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

N: Número de indivíduos; \*p<0,05.

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

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

Variável	Categoria	<i>SLC24A5</i> rs2555364			Total	$\chi^2$	p	pFisher	
		CC	CG	GG					
Cor da pele	Negro	N	9	20	19	122,424	<0,001*	<0,001*	
		%	18,8%	41,7%	39,6%				100,0%
	Branco	N	4	26	318				348
		%	1,1%	7,5%	91,4%				100,0%
	Pardo	N	7	53	108				168
		%	4,2%	31,5%	64,3%				100,0%
Amarelo	N	4	9	12	25				
	%	16,0%	36,0%	48,0%	100,0%				
Total	N	24	108	457	589				
	%	4,1%	18,3%	77,6%	100,0%				
Cor da pele agru- pado	Negro	N	9	20	19	52,863	<0,001*	<0,001*	
		%	18,8%	41,7%	39,6%				100,0%
	Não negro	N	15	88	438				541
		%	2,8%	16,3%	81,0%				100,0%
	Total	N	24	108	457				589
		%	4,1%	18,3%	77,6%				100,0%

Cor dos cabelos	Preto	N	6	22	33	61	34,714	<0,001*	<0,001*
		%	9,8%	36,1%	54,1%	100,0%			
	Castanho	N	18	85	367	470			
		%	3,8%	18,1%	78,1%	100,0%			
	Ruivo	N	0	1	9	10			
	%	0,0%	10,0%	90,0%	100,0%				
	Loiro	N	0	0	48	48			
		%	0,0%	0,0%	100,0%	100,0%			
	Total	N	24	108	457	589			
		%	4,1%	18,3%	77,6%	100,0%			
Cor de cabelo agrupado	Preto+- Castanho	N	24	107	400	531	15,852	<0,001*	0,001
		%	4,5%	20,2%	75,3%	100,0%			
	Rui- vo+Loiro	N	0	1	57	58			
		%	0,0%	1,7%	98,3%	100,0%			
	Total	N	24	108	457	589			
		%	4,1%	18,3%	77,6%	100,0%			
Variável	Categoria	SLC24A5 rs2555364				Total	x <sup>2</sup>	p	pFisher
		CC	CG	GG					
Cor dos olhos cate- górico	Castanho escuro	N	19	89	178	286	82,575	<0,001*	<0,001*
		%	6,6%	31,1%	62,2%	100,0%			
	Castanho médio	N	2	14	90	106			
		%	1,9%	13,2%	84,9%	100,0%			
	Castanho claro	N	3	1	66	70			
		%	4,3%	1,4%	94,3%	100,0%			
	Verde	N	0	3	92	95			
		%	0,0%	3,2%	96,8%	100,0%			
	Azul	N	0	1	30	31			
		%	0,0%	3,2%	96,8%	100,0%			
	Total	N	24	108	456	588			
		%	4,1%	18,4%	77,6%	100,0%			
Cor dos olhos agru- pado	Castanhos	N	24	104	334	462	34,38	<0,001*	<0,001*
		%	5,2%	22,5%	72,3%	100,0%			
	Azul+Verde	N	0	4	122	126			
		%	0,0%	3,2%	96,8%	100,0%			
	Total	N	24	108	456	588			
		%	4,1%	18,4%	77,6%	100,0%			

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

N: Número de indivíduos; \*p<0,05.

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

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

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

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

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

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

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

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

Variável	Categoria	SCL24A5 rs2555364		Total	$\chi^2$	p	pFisher
		Dominante					
		CC	CG+GG				

Cor dos olhos categórico	Castanho escuro	N	19	267	286	11,529	<b>0,021*</b>	<b>0,015*</b>
		%	6,6%	93,4%	100,0%			
	Castanho médio	N	2	104	106			
		%	1,9%	98,1%	100,0%			
	Castanho claro	N	3	67	70			
		%	4,3%	95,7%	100,0%			
	Verde	N	0	96	96			
		%	0,0%	100,0%	100,0%			
	Azul	N	0	31	31			
		%	0,0%	100,0%	100,0%			
	Total	N	24	565	589			
		%	4,1%	95,9%	100,0%			
Cor dos olhos agrupado	Castanhos	N	24	438	462	6,878	<b>0,009*</b>	<b>0,004*</b>
		%	5,2%	94,8%	100,0%			
	Azul+Verde	N	0	127	127			
		%	0,0%	100,0%	100,0%			
	Total	N	24	565	589			
		%	4,1%	95,9%	100,0%			

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

N: Número de indivíduos; \*p<0,05.

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

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

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

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

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

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

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

Variável	Categoria	SCL24A5 rs2555364			Total	$\chi^2$	p	pFisher
		Recessivo						
		CC+CG	GG					



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

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

N: Número de indivíduos; \*p<0,05.

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

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

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

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

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

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

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

Variável	Categoria	SLC24A5 rs1426654			Total	$\chi^2$	p	pFisher
		GG	GA	AA				
Cor da pele	Negro	N	14	22	13	271,534	<0,001*	<0,001*
		%	28,6%	44,9%	26,5%			
	Branco	N	7	52	296			
		%	2,0%	14,6%	83,4%			
	Pardo	N	15	67	88			
		%	8,8%	39,4%	51,8%			
	Amarelo	N	22	1	4			
		%	81,5%	3,7%	14,8%			
	Total	N	58	142	401			
		%	9,7%	23,6%	66,7%			
Cor da pele agrupado	Negro	N	14	22	13	42,923	0,001*	0,001*
		%	28,6%	44,9%	26,5%			
	Não negro	N	44	120	388			
		%	8,0%	21,7%	70,3%			
	Total	N	58	142	401			
		%	9,7%	23,6%	66,7%			

Cor dos cabelos	Preto	N	18	23	21	62	60,184	<0,001*	<0,001*
		%	29,0%	37,1%	33,9%	100,0%			
	Castanho	N	40	113	327	480			
		%	8,3%	23,5%	68,1%	100,0%			
	Ruivo	N	0	4	7	11			
%		0,0%	36,4%	63,6%	100,0%				
Loiro	N	0	2	46	48				
	%	0,0%	4,2%	95,8%	100,0%				
Total	N	58	142	401	601				
	%	9,7%	23,6%	66,7%	100,0%				
Cor de cabelo agrupado	Preto+Castanho	N	58	136	348	542	16,565	<0,001*	<0,001*
		%	10,7%	25,1%	64,2%	100,0%			
	Ruivo+Loiro	N	0	6	53	59			
		%	0,0%	10,2%	89,8%	100,0%			
	Total	N	58	142	401	601			
%		9,7%	23,6%	66,7%	100,0%				
Variável	Categoria	SLC24A5 rs1426654			Total	$\chi^2$	p	pFisher	
		GG	GA	AA					
Cor dos olhos categórico	Castanho escuro	N	50	106	136	292	118,943	<0,001*	<0,001*
		%	17,1%	36,3%	46,6%	100,0%			
	Castanho médio	N	3	25	81	109			
		%	2,8%	22,9%	74,3%	100,0%			
	Castanho claro	N	2	5	64	71			
		%	2,8%	7,0%	90,1%	100,0%			
	Verde	N	3	5	90	98			
%		3,1%	5,1%	91,8%	100,0%				
Azul	N	0	1	30	31				
	%	0,0%	3,2%	96,8%	100,0%				
Total	N	58	142	401	601				
	%	9,7%	23,6%	66,7%	100,0%				
Cor dos olhos agrupado	Castanhos	N	55	136	281	472	51,195	<0,001*	<0,001*
		%	11,7%	28,8%	59,5%	100,0%			
	Azul+Verde	N	3	6	120	129			
		%	2,3%	4,7%	93,0%	100,0%			
Total	N	58	142	401	601				
	%	9,7%	23,6%	66,7%	100,0%				

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

N: Número de indivíduos; \*p<0,05.

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

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

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

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

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

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

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

Variável	Categoria	SCL24A5 rs1426654				Total	$\chi^2$	p	pFisher
		Dominante		GG	GA+AA				
		N	%						

Cor dos olhos categórico	Castanho escuro	N	50	242	292	36,644	<b>&lt;0,001*</b>	<b>&lt;0,001*</b>
		%	17,1%	82,9%	100,0%			
	Castanho médio	N	3	106	109			
		%	2,8%	97,2%	100,0%			
	Castanho claro	N	2	69	71			
		%	2,8%	97,2%	100,0%			
	Verde	N	3	95	98			
		%	3,1%	96,9%	100,0%			
	Azul	N	0	31	31			
		%	0,0%	100,0%	100,0%			
	Total	N	58	543	601			
		%	9,7%	90,3%	100,0%			
Cor dos olhos agrupado	Castanhos	N	55	417	472	10,108	<b>0,001*</b>	<b>0,001*</b>
		%	11,7%	88,3%	100,0%			
	Azul+Verde	N	3	126	129			
		%	2,3%	97,7%	100,0%			
	Total	N	58	543	601			
		%	9,7%	90,3%	100,0%			

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

N: Número de indivíduos; \*p<0,05.

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

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

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

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

O polimorfismo rs1426654 foi significativamente associado à cor da pele



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

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

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

Variável	Categoria	SCL24A5 rs1426654			Total	$\chi^2$	p	pFisher
		Recessivo						
		GG+GA	AA					
Cor de cabelo agrupado	Preto+Castanho	N 194	348	542				
		% 35,8%	64,2%	100,0%				
	Ruivo+Loiro	N 6	53	59	15,734	<0,001*	<0,001*	
		% 10,2%	89,8%	100,0%				
	Total	N 200	401	601				
		% 33,3%	66,7%	100,0%				
Cor dos olhos categórico	Castanho escuro	N 156	136	292				
		% 53,4%	46,6%	100,0%				
	Castanho médio	N 28	81	109				
		% 25,7%	74,3%	100,0%				
	Castanho claro	N 7	64	71	114,192	<0,001*	<0,001*	
		% 9,9%	90,1%	100,0%				
	Verde	N 8	90	98				
	% 8,2%	91,8%	100,0%					
	Azul	N 1	30	31				
		% 3,2%	96,8%	100,0%				
	Total	N 200	401	601				
		% 33,3%	66,7%	100,0%				
Cor dos olhos agrupado	Castanhos	N 191	281	472				
		% 40,5%	59,5%	100,0%				
	Azul+Verde	N 9	120	129	51,174	<0,001*	<0,001*	
		% 7,0%	93,0%	100,0%				
	Total	N 200	401	601				
		% 33,3%	66,7%	100,0%				

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

N: Número de indivíduos; \*p<0,05.

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

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

<b>Cor dos olhos</b>	SLC24A5_rs1426654_recessivo (AA/GG+GA)	<b>&lt;0,001*</b>	<b>9,06</b>	4,49	18,29
----------------------	--	-------------------	-------------	------	-------

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

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

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

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

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

## 5.2 ASIP

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

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

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

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

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

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

Variável	Categoria	ASIP rs6058017			Total	$\chi^2$	p	pFisher
		GG	GA	AA				

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

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

N: Número de indivíduos; \* $p < 0,05$ .

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

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

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

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

O polimorfismo rs6058017 (ASIP) foi significativamente associado com cor da pele em modelo de regressão logística binária feito para o Modelo de Genótipos, após ajustado para Idade ( $p < 0,05$ ), de modo que indivíduos heterozigotos e homozigotos AA (variante) apresentaram 3,07 e 8,93 vezes maior chance de apresentar a cor da pele “não-negra” em relação aos homozigotos GG (ancestral), respectivamente. O modelo de regressão logística não pode ser ajustado para a cor de olhos devido à presença de uma categoria que não apresentou nenhum indivíduo.

As análises feitas com o Modelo Dominante para o SNP rs6058017 têm seus

resultados apresentados na Tabela 21.

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

Variável	Categoria	ASIP rs6058017 Dominante		Total	$\chi^2$	p	pFisher
		GG	GA+AA				

Cor dos olhos categórico	Castanho escuro	N	13	277	290	6,551	0,107	0,162
		%	4,5%	95,5%	100,0%			
	Castanho médio	N	5	102	107			
		%	4,7%	95,3%	100,0%			
	Castanho claro	N	4	66	70			
		%	5,7%	94,3%	100,0%			
	Verde	N	0	98	98			
	%	0,0%	100,0%	100,0%				
	Azul	N	0	31	31			
		%	0,0%	100,0%	100,0%			
	Total	N	22	574	596			
		%	3,7%	96,3%	100,0%			
Cor dos olhos agrupado	Castanhos	N	22	445	467	6,31	0,007*	0,012*
		%	4,7%	95,3%	100,0%			
	Azul+Verde	N	0	129	129			
		%	0,0%	100,0%	100,0%			
	Total	N	22	574	596			
		%	3,7%	96,3%	100,0%			

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

N: Número de indivíduos; \*p<0,05.

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

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

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

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

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

A Tabela 23 contém os resultados obtidos com as análises do Modelo Recessivo



para o SNP rs6058017 e as respectivas associações com as EVCs avaliadas neste estudo.

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

Variável	Categoria	ASIP rs6058017 Recessivo		Total	$\chi^2$	p	pFisher
		GG+GA	AA				

Cor dos olhos categorico	Castanho escuro	N	95	195	290	6,529	0,167	0,163
		%	32,8%	67,2%	100,0%			
	Castanho médio	N	31	76	107			
		%	29,0%	71,0%	100,0%			
	Castanho claro	N	20	50	70			
		%	28,6%	71,4%	100,0%			
	Verde	N	22	76	98			
	%	22,4%	77,6%	100,0%				
Cor dos olhos agrupado	Azul	N	5	26	31	5,239	<b>0,022*</b>	<b>0,022*</b>
		%	16,1%	83,9%	100,0%			
	Total	N	173	423	596			
		%	29,0%	71,0%	100,0%			
	Castanhos	N	146	321	467			
		%	31,3%	68,7%	100,0%			
	Azul+Verde	N	27	102	129			
	%	20,9%	79,1%	100,0%				
	Total	N	173	423	596			
		%	29,0%	71,0%	100,0%			

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

N: Número de indivíduos; \*p<0,05.

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

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

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

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

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

Para a característica de cor de olhos, apenas no Modelo Recessivo foi possível

realizar os cálculos de regressão logística e, observou-se que o SNP rs6058017 (ASIP) foi significativamente associado com essa EVC ( $p < 0,05$ ), de modo que indivíduos portadores de duas cópias do alelo variante A (homozigotos AA) apresentaram 1,72 vezes mais chance de pertencerem ao grupo de cor de olhos "azul+verde", em relação a indivíduos portadores do alelo G.

### 5.3 TYR

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

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

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

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

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

Variável	Categoria	TYR rs1126809			Total	X <sup>2</sup>	p	pFisher	
		GG	GA	AA					
Cor da pele	Negro	N	41	8	0	21,662	0,001*	0,001*	
		%	83,7%	16,3%	0,0%				100,0%
	Branco	N	235	111	10				356
		%	66,0%	31,2%	2,8%				100,0%
	Pardo	N	132	38	0				170
		%	77,6%	22,4%	0,0%				100,0%
	Amarelo	N	25	2	0				27
		%	92,6%	7,4%	0,0%				100,0%
	Total	N	433	159	10				602
		%	71,9%	26,4%	1,7%				100,0%
Cor da pele agrupado	Negro	N	41	8	0	3,964	0,138	0,158	
		%	83,7%	16,3%	0,0%				100,0%
	Não negro	N	392	151	10				553
		%	70,9%	27,3%	1,8%				100,0%
	Total	N	433	159	10				602
		%	71,9%	26,4%	1,7%				100,0%

Cor dos cabelos	Preto	N	52	9	1	62	7,708	0,26	0,226
		%	83,9%	14,5%	1,6%	100,0%			
	Castanho	N	335	137	9	481			
		%	69,6%	28,5%	1,9%	100,0%			
	Ruivo	N	8	3	0	11			
	%	72,7%	27,3%	0,0%	100,0%				
	Loiro	N	38	10	0	48			
		%	79,2%	20,8%	0,0%	100,0%			
	Total	N	433	159	10	602			
		%	71,9%	26,4%	1,7%	100,0%			
Cor de cabelo agrupado	Preto+Castanho	N	387	146	10	543	1,893	0,388	0,545
		%	71,3%	26,9%	1,8%	100,0%			
	Ruivo+Loiro	N	46	13	0	59			
		%	78,0%	22,0%	0,0%	100,0%			
	Total	N	433	159	10	602			
		%	71,9%	26,4%	1,7%	100,0%			

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

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

N: Número de indivíduos; \*p<0,05.

Foi encontrada associação significativa entre o polimorfismo rs1126809 (TYR) e a variável cor da pele ( $p < 0,05$ ), no Modelo de Genótipos. Entretanto, estes resultados devem ser analisados com muita cautela, pois este polimorfismo só possui 10 indivíduos para o grupo de homocigotos para o alelo polimórfico. Não foram detectadas associações entre o polimorfismo e as variáveis na forma agrupada

em duas categorias, portanto, não foram realizados modelos de regressão logística binários para prever as variáveis dependentes.

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

Variável	Categoria	TYR rs1126809 Dominante		Total	$\chi^2$	p	pFisher
		GG	GA+AA				

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

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

N: Número de indivíduos; \*p<0,05.

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

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

Variável	Categoria	TYR rs1126809 Recessivo			Total	$\chi^2$	p	pFisher
		GG+GA	AA					
Cor da pele	Negro	N	49	0	49	7,027	0,081	0,09
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Branco	N	346	10	356			
		%	97,2%	2,8%	100,0%			
	Pardo	N	170	0	170			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Amarelo	N	27	0	27			
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	Total	N	592	10	602			
		%	98,3%	1,7%	100,0%			

Cor da pele agrupado	Negro	N	49	0	49	0,901	0,343	1
		%	100,0%	0,0%	100,0%			
	N	543	10	553				
Não negro	%	98,2%	1,8%	100,0%				
	N	592	10	602				
Total	%	98,3%	1,7%	100,0%				
	N	61	1	62				
Cor dos cabelos	Preto	%	98,4%	1,6%	100,0%	1,127	0,77	1
		N	472	9	481			
	%	98,1%	1,9%	100,0%				
Castanho	N	11	0	11				
	%	100,0%	0,0%	100,0%				
Ruivo	N	48	0	48				
	%	100,0%	0,0%	100,0%				
Loiro	N	592	10	602				
	%	98,3%	1,7%	100,0%				
Cor de cabelo agrupado	Preto+Castanho	N	533	10	543	1,105	0,293	0,609
		%	98,2%	1,8%	100,0%			
	N	59	0	59				
Ruivo+Loiro	%	100,0%	0,0%	100,0%				
	N	592	10	602				
Total	%	98,3%	1,7%	100,0%				
	<b>Variável</b>		<b>TYR rs1126809 Recessivo</b>			<b>χ<sup>2</sup></b>	<b>p</b>	<b>pFisher</b>
<b>Categoria</b>		<b>GG+GA</b>	<b>AA</b>	<b>Total</b>				
Cor dos olhos categórico	Castanho escuro	N	289	3	292	2,695	0,61	0,532
		%	99,0%	1,0%	100,0%			
	Castanho médio	N	106	3	109			
		%	97,2%	2,8%	100,0%			
	Castanho claro	N	69	2	71			
		%	97,2%	2,8%	100,0%			
	Verde	N	97	2	99			
%		98,0%	2,0%	100,0%				
Azul	N	31	0	31				
	%	100,0%	0,0%	100,0%				
Total	N	592	10	602				
	%	98,3%	1,7%	100,0%				
Cor dos olhos agrupado	Castanhos	N	464	8	472	0,015	0,902	1
		%	98,3%	1,7%	100,0%			
	N	128	2	130				
Azul+Verde	%	98,5%	1,5%	100,0%				
	N	592	10	602				
Total	%	98,3%	1,7%	100,0%				

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

N: Número de indivíduos; \*p<0,05.

No Modelo Recessivo não foram detectadas associações significantes entre o



polimorfismo rs1126809 (TYR) e as variáveis estudadas ( $p < 0,05$ ),.

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

- ✓ SLC24A5 (rs16960620): associação com cor da pele nos três Modelos usados para as análises (Genótipo, Dominante e Recessivo), contudo sem realização de teste de regressão logística, devido a casuística e poder de teste baixos.
- ✓ SLC24A5 (rs2555364): associação com cor da pele, cor dos olhos e cor dos cabelos.
  - No Modelo de Genótipos, a regressão logística mostrou que os genótipos heterozigoto e homozigoto GG (variante) foram capazes de predizer a cor da pele “não negra”, apresentando chance 2,7 e 14,23 vezes maior, respectivamente, de predizer a cor “não-negra” em relação aos homozigotos CC.
  - No Modelo Recessivo observou-se ainda que portadores de duas cópias do alelo G (variante) apresentaram 19,32 vezes mais chance de ter a cor de cabelo na categoria “ruivo+loiro” e também apresentaram 11,78 vezes mais chance de pertencerem à categoria de cor de olhos “azul+verde” do que indivíduos portadores do alelo C.
- ✓ SLC24A5 (rs1426654): associação com cor da pele, cabelo e olhos.
  - No Modelo de Genótipos a regressão logística mostrou que o genótipo homozigoto AA (variante) apresentou 9,89 vezes mais chance de predizer a cor da pele “não-negra” e 7,83 vezes mais chance a cor dos olhos “azul+verde” em relação aos indivíduos com genótipo GG).
  - No Modelo Recessivo a regressão logística binária mostrou ainda que homozigotos AA (variante) apresentaram chance 4,77 maior de ter a cor de cabelo “ruivo+loiro”, em comparação aos portadores do alelo G (ancestral).
- ✓ ASIP (rs6058017): associação com cor da pele e olhos.
  - No Modelo de Genótipos de modo que indivíduos heterozigotos e homozigotos AA (variante) apresentaram 3,07 e 8,93 vezes maior chance de apresentar a cor da pele “não-negra” em relação aos homozigotos GG (ancestral).
  - No Modelo Recessivo notou-se ainda que homozigotos AA (variante) têm 1,72 vezes mais chances de estarem no grupo de indivíduos com olhos “azul+verde”.
- ✓ TYR (rs1126809): associação com cor da pele nos Modelos de Genótipo e Dominante, contudo sem realização de teste de regressão logística, devido a casuística e poder de teste baixos

## 6 | DISCUSSÃO

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

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

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

No ano de 2008, Giardina e colaboradores genotiparam para o SNP rs2555364 471 amostras de indivíduos originários da Europa, Ásia e África e mostraram que o alelo G esteve presente em 99% de italianos, 66% de asiáticos e 32% de africanos, colocando este alelo como um forte associado com pigmentação clara (Giardina et al, 2008). Na população brasileira este SNP foi estudado em 243 indivíduos do Rio de Janeiro e em 212 indivíduos de São Paulo em conjunto com outros 14 SNPs e as associações mostraram que o rs2555364 foi um dos SNPs que esteve associado com cor da pele nessas populações (Durso et al, 2014).

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

Nossos resultados mostram que o rs1426654 pode ser informativo na distinção

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

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

Estudos relatam que a frequência do alelo ancestral (G), que favorece a ocorrência de pigmento escuro por promover maior produção de eumelanina, está entre 93% e 100% em populações africanas e do leste asiático. (Lamason et al, 2005; Sturm; Larsson, 2009; Wilson et al, 2013). Por outro lado, Lamason e colaboradores (2005) apontam que em europeus ou em grupos que descendem dessa população, o alelo variante (A), que favorece a ocorrência de pele, cabelo e olhos e mais claros, alcança frequências entre 98% e 100% (Lamason et al, 2005).

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

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

Em Beleza e colaboradores (2013) o rs1426654 foi genotipado e a frequência do alelo variante (A) foi acima de 90% em europeus, sendo rara ou ausente em populações africanas e do Leste asiático. Achados similares também foram observados em um estudo realizado em 2016 que verificou a frequência de rs1426654 em conjunto com SNPs adicionais presentes em outros três genes (VDR, MC1R e SLC45A2) e

descreveu o haplótipo com alelo variante (A) presente em 88% de populações com ancestralidade europeia, que têm predominantemente a pele clara. Essa frequência diminuiu e chegou a 2% em populações da África Subsaariana (Tiosano et al, 2016) onde as populações são tipicamente negras com cabelo e olhos escuros. Mais uma vez corroborando os achados do presente trabalho.

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

A verificação das frequências alélicas do SNP rs6058017 (ASIP) revelou que portadores de duas cópias do alelo variante (A) têm aproximadamente 9,0 vezes mais chances de apresentar cor da pele “não-negra” em comparação com portadores do alelo ancestral homocigoto (G) (Tabela 20). No Modelo Recessivo, os cálculos de regressão logística apontam ainda que homocigotos para o alelo variante (A) têm quase 2,0 vezes mais chances de ter olhos azuis ou verdes (Tabela 24).

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

Kanetsky e colaboradores (2002) genotiparam 746 indivíduos americanos para o SNP rs6058017 (*ASIP*) e relataram que a presença do alelo ancestral (G) foi associada com cabelo escuro e olhos castanhos. Voisey e colaboradores (2006) postularam que o alelo variante aparece em 93% de caucasianos (EVCs claras),

90% de asiáticos (fenótipo de cor da pele definido pelos autores como intermediário) e 76% de aborígenes australianos (EVCs escuras), enquanto que o alelo ancestral (G) foi observado em 7% de caucasianos, 12,5% de asiáticos e 24% de aborígenes australianos. De acordo com os autores, as frequências que foram descritas confirmam a hipótese de que o alelo ancestral (G) está relacionado com fenótipo escuro para cor da pele, cabelo e olhos (Kanetsky et al, 2002; Voisey et al, 2006).

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

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

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

Mesmo não sendo possível usar o SNP rs1126809 para prever as EVCs aqui avaliadas, não se pode descartar o uso deste SNP como marcador em painéis para predição fenotípica, pois o gene *TYR* exerce papel importante na melanogênese e as possíveis variações dentro deste gene devem ser consideradas. Logo, estudos mais



aprofundados com o uso de um número maior de polimorfismos do gene *TYR* podem vir a demonstrar a importância do SNP rs1126809 nas variações da pigmentação humana.

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

O uso de apenas um SNP para inferência de qualquer fenótipo não deve ser considerado relevante, contudo a construção de um painel que possua marcadores associados com as mesmas características amplia as possibilidades de sugerir, como proposto pelo presente trabalho, características externamente visíveis de cor da pele, cabelo e olhos. Neste estudo optou-se por amplificar cinco polimorfismos em um grupo amostral significativamente alto, ao invés da amplificação de mais SNPs em um número amostral reduzido. Contudo, as associações aqui descritas mostram a relevância dos SNPs avaliados pela técnica de FDP e sugerem a aplicação desta tecnologia de modo auxiliar à técnica de STRs. Nesse aspecto, agrupar as variáveis de cor da pele, cabelo e olhos, como feito neste estudo, ajudam a investigar as EVCs de modo a obter os dados que definem as características mais extremas (por exemplo, pele negra versus pele “não-negra”) e, com isso, ajudar a reduzir o número de suspeitos em um crime, pois, ao encontrar indivíduos com as características apresentadas pela análise molecular, o perfil de STRs pode ser então traçado e a confirmação da individualização do sujeito é realizada. Além disso, a técnica de FDP pode ser usada para auxiliar a identificação de vítimas em casos de grandes desastres, por exemplo. A possibilidade de informar as associações gênicas de um SNP com determinado fenótipo de EVC é fundamental para a busca de modelos moleculares capazes de tal predição, contudo saber quão significantes as associações podem ser, como foi descrito nos resultados deste trabalho, aumenta a precisão das análises realizadas que podem ser mais informativas e de maior ajuda na Fenotipagem Forense pelo DNA.

Considera-se que a Fenotipagem Forense pelo DNA (FDP) estima a aparência de um indivíduo de modo probabilístico e não determinístico (MacLean; Lamparello, 2014). E, embora a técnica de FDP ofereça imensas vantagens, as preocupações

éticas e morais que concernem seu uso não podem ser esquecidas. No entanto, esses assuntos podem ser tratados de forma a mostrar o real potencial da técnica de modo que os direitos civis fundamentais também sejam preservados.

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

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

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

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

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



pessoas, sequer sabe sobre a existência dessa Lei.

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

Para que se estabeleçam Leis que definam o uso de amostras biológicas para a predição de EVCs, profissionais da genética forense devem ser ouvidos, por serem os que vivenciam a rotina dentro dos laboratórios e conhecem as vantagens da obtenção dessas informações.

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

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

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

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

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

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

## 7 | CONCLUSÕES

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

Os resultados encontrados permitem concluir que:

- De três polimorfismos avaliados para o gene *SLC24A5*, dois estão associados com maior significância com as características externamente visíveis aqui estudadas, pois, o SNP rs16960620 exibiu associação com cor da pele nos três Modelos usados para as análises (Genótipo, Dominante e Recesivo), contudo sem realização de teste de regressão logística, devido a casuística e poder de teste baixos.
- O SNP rs2555364 mostrou que os genótipos heterozigoto e homozigoto GG (variante) foram capazes de predizer a cor da pele “não negra”, apresentando chance 2,7 e 14,23 vezes maior, respectivamente, de predizer a cor “não-negra” em relação aos homozigotos CC e que portadores de duas cópias do alelo G (variante) apresentaram 19,32 vezes mais chance de ter a cor de cabelo na categoria “ruivo+loiro” e também apresentaram 11,78 vezes mais chance de pertencerem à categoria de cor de olhos “azul+verde” do que indivíduos portadores do alelo C.
- O SNP rs1426654 revelou que o genótipo homozigoto AA (variante) apresentou 9,89 vezes mais chance de predizer a cor da pele “não-negra” e 7,83 vezes mais chance a cor dos olhos “azul+verde” em relação aos indivíduos com genótipo GG e que homozigotos AA (variante) apresentaram chance 4,77 maior de ter a cor de cabelo “ruivo+loiro”, em comparação aos portado-

res do alelo G (ancestral).

- O polimorfismo presente no gene *ASIP* (rs6058017) foi associado com duas das EVCs avaliadas neste estudo, uma vez que: indivíduos heterozigotos e homozigotos AA (variante) apresentaram 3,07 e 8,93 vezes maior chance de apresentar a cor da pele “não-negra” em relação aos homozigotos GG (ancestral) e homozigotos AA (variante) têm 1,72 vezes mais chances de estarem no grupo de indivíduos com olhos “azul+verde”.
- Para o polimorfismo presente no gene *TYR* (rs1126809), notamos apenas associação com cor da pele nos Modelos de Genótipo e Dominante, contudo sem realização de teste de regressão logística, devido a casuística e poder de teste baixos, logo mais ensaios devem ser realizados avaliando este e outros SNPs presentes no gene para compreender sua associação com a predição fenotípica.

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

## REFERÊNCIAS

- Aberdam, E. et al. **Involvement of microphthalmia in the inhibition of melanocyte lineage differentiation and of melanogenesis by agouti signal protein.** *J Biol Chem.* v. 273, n. 31, p. 19560-19565, 1998.
- Agar, N.; Young, A.R. **Melanogenesis: a photoprotective response to DNA damage?** *Mutat Res.* v. 571, n. 1-2, p. 121-132, 2005.
- Altimimi, H.F.; Schnetkamp, P.P. **Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-K<sup>+</sup> exchangers (NCKX): functional properties and physiological roles.** *Channels (Austin).* v.1(2), p62-69, 2007.
- Alves-Silva, J. et al. **The ancestry of Brazilian mtDNA lineages.** *Am J Hum Genet.* v. 67, n. 2, p. 444-461, 2000.
- Andrade, E.S. et al. **Associations of OCA2-HERC2 SNPs and haplotypes with human pigmentation characteristics in the Brazilian population.** *Leg Med (Tokyo).* v. 24, p. 78-83, 2017.
- Barreiro, L.B. et al. **Natural selection has driven population differentiation in modern humans.** *Nature Genetics.* v. 40, p. 340-345, 2008.
- Basu Mallick, C. et al. **The light skin allele of SLC24A5 in South Asians and Europeans sHares identity by descent.** *PLoS Genet.* v. 9, n. 11, p. e1003912, 2013.
- Beleza, S. et al. **Genetic architecture of skin and eye color in an African-European admixed population.** *PLoS Genet.* v. 9, n. 3, p. e1003372, 2013.
- Bonilla, C. et al. **The 8818G allele of the agouti signaling protein (ASIP) gene is ancestral and is associated with darker skin color in African Americans.** *Hum Genet.* v. 116, n. 5, p. 402-406, 2005.
- Bouakaze, C. et al. **Pigment phenotype and biogeographical ancestry from ancient skeletal remains: inferences from multiplexed autosomal SNP analysis.** *Int J Legal Med.* v. 123, n. 4, p. 315-325, 2009.

- Butler, J. **Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology**. 1 ed. EUA: Academic Press; 2011.
- Calloway, E. **DNA mugshots' narrow search for Madrid bombers** [on-Line]. Disponível em <https://www.newscientist.com/article/dn17630-dna-mugshots-narrow-search-for-madrid-bombers/> Acesso em 20 de nov. 2015.
- Canfield, V.A. et al. **Molecular phylogeography of a human autosomal skin color locus under natural selection**. *G3 (Bethesda)*. v. 3, n. 11, p. 2059-2067, 2013.
- Cerqueira, C.C. et al. **Predicting Homo pigmentation phenotype through genomic data: from Neanderthal to James Watson**. *Am J Hum Biol*. v. 24, n. 5, p. 705-709, 2012.
- Cerqueira, C.C. et al. **Implications of the admixture process in skin color molecular assessment**. *PLoS One*. v. 9, n. 5, p. e96886, 2014.
- Chaitanya, L. et al. **Bringing colour back after 70 years: Predicting eye and hair colour from skeletal remains of World War II victims using the HirisPlex system**. *Forensic Sci Int Genet*. v. 26, p. 48-57, 2017.
- Chang, T. **Natural Melanogenesis Inhibitors Acting Through the Down-Regulation of Tyrosinase Activity**. *Materials*. v. 5, n. 9, p. 1661-1685, 2012.
- Chaplin, G.; Jablonski, N.G. **Vitamin D and the evolution of human depigmentation**. *Am J Phys Anthropol*. v. 139, n. 4, p. 451-461, 2009.
- Chaplin, G. **Geographic distribution of environmental factors influencing human skin coloration**. *Am J Phys Anthropol*. v. 125, v. 3, p. 292-302, 2004.
- Costin, G.E.; Hearing, V.J. **Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress**. *FASEB J*. v. 21, n. 4, p. 976-994, 2007.
- Diegoli, TM. **Forensic typing of short tandem repeat markers on the X and Y chromosomes**. *Forensic Sci Int Genet*. v. 18, p. 140-151, 2015.
- Dimisianos, G. et al. **A study of a single variant allele (rs1426654) of the pigmentation-related gene SLC24A5 in Greek subjects**. *Exp Dermatol*. v. 18, n. 2, p. 175-177, 2009.
- Durso, D.F. et al. **Association of genetic variants with self-assessed color categories in Brazilians**. *PLoS One*. v. 9, n. 1, p. e83926, 2014.
- Ebanks, J.P.; Wickett, R.R.; Boissy, R.E. **regulating skin pigmentation: the rise and fall of complexion coloration**. *Int J Mol Sci*. v. 10, n. 9, p. 4066-4087, 2009.
- FBI (Federal Bureau of Investigation). **CODIS Brochure**. Disponível em [https://www.fbi.gov/about-us/lab/biometric-analysis/codis/codis\\_brochure](https://www.fbi.gov/about-us/lab/biometric-analysis/codis/codis_brochure) Acesso em 25 de jan. 2016.
- Frudakis, T.; Terravainen, T.; Thomas, M. **Multilocus OCA2 genotypes specify human iris colors**. *Hum Genet*. v. 122, n. 3-4, p. 311-326, 2007.
- Frudakis, T.N. **Molecular Photofitting: Predicting Ancestry and Phenotype Using DNA**. 1ed. EUA: Academic Press; 2008.
- Giardina, E. et al. **Haplotypes in SLC24A5 Gene as Ancestry Informative Markers in Different Populations**. *Curr Genomics*. v. 9, n. 2, p. 110-114, 2008.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Kanetsky, P.A. et al. **A polymorphism in the agouti signaling protein gene is associated with human pigmentation.** *Am J Hum Genet.* v. 70, n. 3, p. 770-775, 2002.
- Kayser, M.; Schneider, P.M. **DNA-based prediction of human externally visible characteristics in forensics: motivations, scientific challenges, and ethical considerations.** *Forensic Sci Int Genet.* v. 3, n. 3, p. 154-161, 2009.
- Kayser, M.; de Knijff, P. **Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology.** *Nat Rev Genet.* v. 12, n. 3, p. 179-192, 2011.
- Kayser, M. **Forensic DNA Phenotyping: Predicting human appearance from crime scene material for investigative purposes.** *Forensic Sci Int Genet.* v. 18, p. 33-48, 2015.
- Ko, J.M. et al. **Mutation spectrum of the TYR and SLC45A2 genes in patients with oculocutaneous albinism.** *Mol Med Rep.* v. 5, n. 4, p. 943-948, 2012.
- Kollias, N. et al. **Photoprotection by melanin.** *J Photochem Photobiol B.* v. 9, n. 2, p. 35-160, 1991.
- Koops, B.; Schellekens, M. **Forensic DNA Phenotyping: Regulatory Issues.** *9 Colum. Sci. & Tech. L. Rev.* 158. 2008.
- Kwon, H.Y. et al. **Molecular structure and chromosomal mapping of the human homolog of the agouti gene.** *Proc Natl Acad Sci USA.* v. 91, n. 21, p. 9760-9764, 1994.
- Lamason, R.L. et al. **SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans.** *Science.* v. 310, n. 5755, p. 1782-1786, 2005.
- Lima, F.A.; de Toledo Gonçalves, F.; Fridman, C. **SLC24A5 and ASIP as phenotypic predictors in Brazilian population for forensic purposes.** *Leg Med (Tokyo).* v. 17, n. 4, p. 261-266, 2015.
- Lin, J.Y.; Fisher, D.E. **Melanocyte biology and skin pigmentation.** *Nature.* v. 445, p. 843-850, 2007.
- Liu, F. et al. **Eye color and the prediction of complex phenotypes from genotypes.** *Curr Biol.* v. 19, n. 5, p. 192-193, 2009.
- Liu, F.; Wen, B.; Kayser, M. **Colorful DNA polymorphisms in humans.** *Semin Cell Dev Biol.* v. 24, n. 6-7, p. 562-575, 2013.
- Lucock, M. **Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes.** *Mol Genet Metab.* v. 71, n. 1-2, p. 121-138, 2000.
- MacLean, C.E.; Lamparello, A. **Forensic DNA phenotyping in criminal investigations and criminal courts: assessing and mitigating the dilemmas inherent in the science.** *Recent Adv DNA Gene Seq.* v. 8, n. 2, p. 104-112, 2014.
- Manne, J.; Argeson, A.C.; Siracusa, L.D. **Mechanisms for the pleiotropic effects of the agouti gene.** *Proc Natl Acad Sci USA.* v. 92, n. 11, p. 4721-4724, 1995.
- Maroñas, O. et al. **Development of a forensic skin colour predictive test.** *Forensic Sci Int Genet.* v. 13, p. 34-44, 2014.
- Maroñas, O. et al. **The genetics of skin, hair, and eye color variation and its relevance to forensic pigmentation predictive tests.** *Forensic Sci Rev.* v. 27, n. 1, p. 13-40, 2015.



- Melton, T.; Holland, C.; Holland, M. **Forensic Mitochondrial DNA Analysis: Current Practice and Future Potential**. *Forensic Sci Rev.* v. 24, n. 2, p. 101-122, 2012.
- Meziani, R. et al. **Association study of the g.8818A>G polymorphism of the human agouti gene with melanoma risk and pigmentary characteristics in a French population**. *J Dermatol Sci.* v. 40, n. 2, p. 133-136, 2005.
- Miller, S.A.; Dykes, D.D.; Polesky, H.F. **A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells**. *Nucleic Acids Res.* v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.
- Mukherjee, M. et al. **Polymorphisms of four pigmentation genes (SLC45A2, SLC24A5, MC1R and TYRP1) among eleven endogamous populations of India**. *J Genet.* v. 92, n. 1, p. 35-139, 2013.
- Nan, H. et al. **Genetic variants in pigmentation genes, pigmentary phenotypes, and risk of skin cancer in Caucasians**. *Int J Cancer.* v. 125, n. 4, p. 909-917, 2009a.
- Nan, H. et al. **Genome-wide association study of tanning phenotype in a population of European ancestry**. *J Invest Dermatol.* v. 129, n. 9, p. 2250-2257, 2009b.
- Norton, H.L. et al. **Genetic evidence for the convergent evolution of light skin in Europeans and East Asians**. *Mol Biol Evol.* v. 24, n. 3, p. 710-722, 2007.
- Oetting, W.S. et al. **The R402Q tyrosinase variant does not cause autosomal recessive ocular albinism**. *Am J Med Genet A.* v. 149A, n. 3, p. 466-469, 2009.
- Oetting, W.S. et al. **Oculocutaneous albinism type 1: the last 100 years**. *Pigment Cell Res.* v. 16, n. 3, p. 307-311, 2003.
- Park, H.Y. et al. **Cellular mechanisms regulating human melanogenesis**. *Cell Mol Life Sci.* v. 66, n. 9, p. 1493-1506, 2009.
- Parra, E.J. **Human pigmentation variation: evolution, genetic basis, and implications for public health**. *Am J Phys Anthropol.* v. Suppl 45, p. 85-105, 2007.
- Patience, S. **Vitamin D deficiency: prevention and identification of risk**. *Community Pract.* v. 88, n. 6, p. 26-28, 2015.
- Pena, S.D.; Prado, V.F.; Epplen, J.T. **DNA diagnosis of human genetic individuality**. *J Mol Med (Berl).* v. 73, n. 11, p. 555-564, 1995.
- Pneuman, A. et al. **Verification of eye and skin color predictors in various populations**. *Leg Med (Tokyo).* v. 14, n. 2, p. 78-83, 2012.
- Pollack, A. **Building a Face, and a Case, on DNA** [on-line]. Disponível em: [http://www.nytimes.com/2015/02/24/science/building-face-and-a-case-on-dna.html?\\_r=0](http://www.nytimes.com/2015/02/24/science/building-face-and-a-case-on-dna.html?_r=0) Acesso em 25 de nov. 2015.
- Pośpiech, E. et al. **Evaluation of the predictive capacity of DNA variants associated with straight hair in Europeans**. *Forensic Sci Int Genet.* v. 19, p. 280-288, 2015.
- Pulker, H. et al. **Finding genes that underlie physical traits of forensic interest using genetic tools**. *Forensic Sci Int Genet.* v. 1, n. 2, p. 100-104, 2007.
- Ray, K.; Chaki, M.; Sengupta, M. **Tyrosinase and ocular diseases: some novel thoughts on the molecular basis of oculocutaneous albinism type 1**. *Prog Retin Eye Res.* v. 26, n. 4, p. 323-358, 2007.

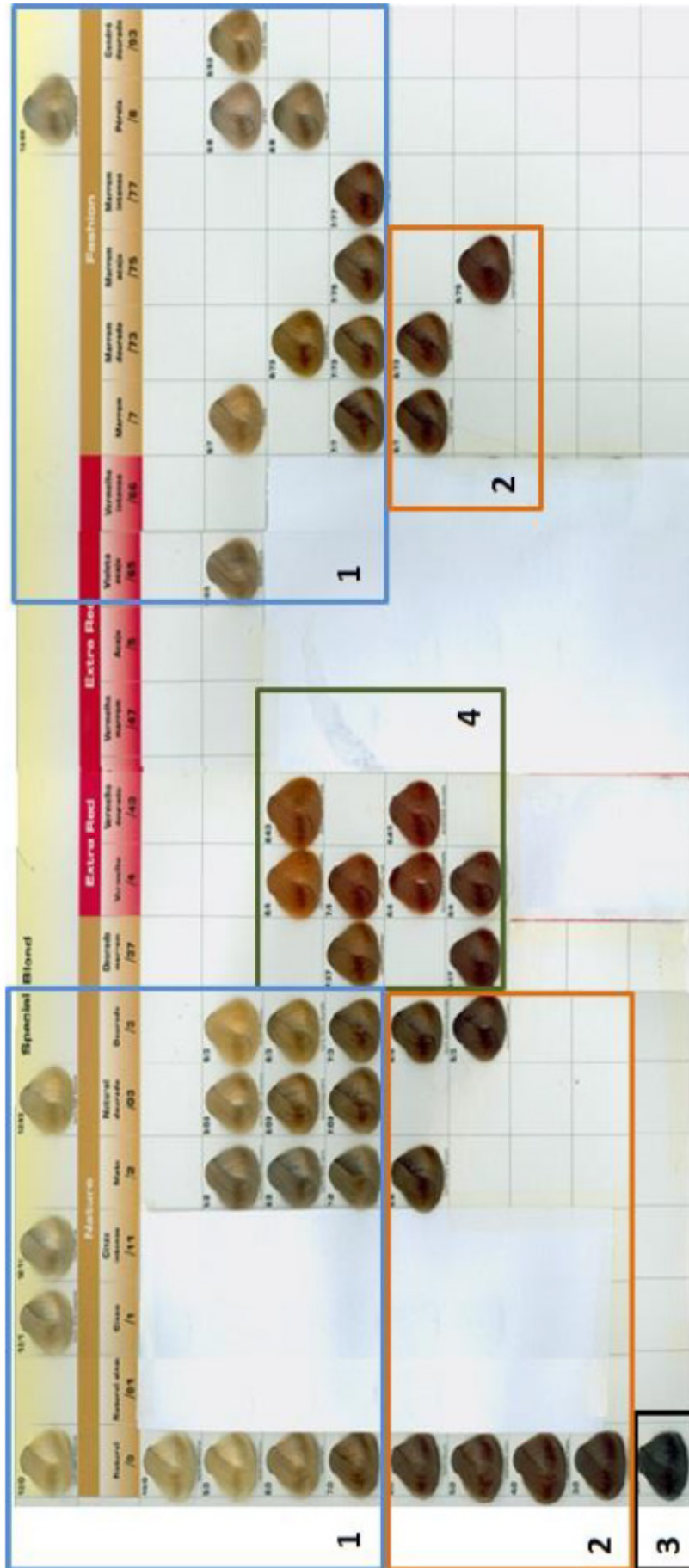


- Rees, J.L. **Genetics of hair and skin color.** Annu Rev Genet. v. 37, p. 67-90, 2003.
- Rees, J.L.; Harding, R.M. **Understanding the evolution of human pigmentation: recent contributions from population genetics.** J Invest Dermatol. v. 132, n. 3, p. 846-853, 2012.
- Robins, A.H. **Biological Perspectives on Human Pigmentation.** 1 ed. EUA: Cambridge-Print On; 2005.
- Rouzaud, F. et al. **MC1R and the response of melanocytes to ultraviolet radiation.** Mutat Res. v. 571, n. 1-2, p. 133-152, 2005.
- Sabeti, P.C. et al. **Genome-wide detection and characterization of positive selection in human populations.** Nature. v. 449, n. 7164, p. 913-918, 2007.
- Salzano, F.M.; Botolini, M.C. **Evolution and genetics of Latin American populations.** 1 ed. EUA: Cambridge-USA; 2002.
- Schallreuter, K.U. et al. **Regulation of melanogenesis--controversies and new concepts.** Exp Dermatol. v. 17, n. 5, p. 395-404, 2008.
- Scherer, D.; Kumar, R. **Genetics of pigmentation in skin cancer-a review.** Mutat Res. v. 705, n. 2, p. 141-153, 2010.
- Schiaffino, M.V. **Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology.** Int J Biochem Cell Biol. v. 42, n. 7, p. 1094-1104, 2010.
- Soejima, M.; Koda, Y. **Population differences of two coding SNPs in pigmentation-related genes SLC24A5 and SLC45A2.** Int J Legal Med. v. 121, n. 1, p. 36-39, 2007.
- Sturm, R.A. **A golden age of human pigmentation genetics.** Trends Genet. v. 22, n. 9, p. 464-468, 2006.
- Sturm, R.A. **Molecular genetics of human pigmentation diversity.** Hum Mol Genet. v. 18, n. R1, p. R2-17, 2009.
- Sturm, R.A.; Duffy, D.L. **Human pigmentation genes under environmental selection.** Genome Biol. v. 13, n. 9, p. 248, 2012.
- Sturm, R.A.; Larsson, M. **Genetics of human iris colour and patterns.** Pigment Cell Melanoma Res. v. 22, n. 5, p. 544-562, 2009.
- Sulem, P. et al. **Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans.** Nat Genet. v. 39, n. 12, p. 1443-1452, 2007.
- Sulem, P. et al. **Two newly identified genetic determinants of pigmentation in Europeans.** Nat Genet. v. 40, n. 7, p. 835-837, 2008.
- Suzuki, I. et al. **Agouti signaling protein inhibits melanogenesis and the response of human melanocytes to alpha-melanotropin.** J Invest Dermatol. v. 108, n. 6, p. 838-842, 1997.
- Tiosano, D. et al. **Latitudinal Clines of the Human Vitamin D Receptor and Skin Color Genes.** G3 (Bethesda). v. 3, n. 6(5), p. 1251-1266, 2016.
- Tsatmali, M.; Ancans, J.; Thody, A.J. **Melanocyte function and its control by melanocortin peptides.** J Histochem Cytochem. v. 50, n. 2, p. 125-133, 2002.

- Tully, G. **Genotype versus phenotype: human pigmentation.** *Forensic Sci Int Genet.* v. 1, n. 2, p. 105-110, 2007.
- Valenzuela, R.K. et al. **Predicting phenotype from genotype: normal pigmentation.** *J Forensic Sci.* v. 55, n. 2, p. 315-322, 2010.
- Videira, I.F.; Moura, D.F.; Magina, S. **Mechanisms regulating melanogenesis.** *An Bras Dermatol.* v. 88, n. 1, p. 76-83, 2013.
- Voisey, J.; Kelly, G.; Van Daal, A. **Agouti signal protein regulation in human melanoma cells.** *Pigment Cell Res.* v. 16, n. 1, p. 65-71, 2003.
- Voisey, J. et al. **A polymorphism in the agouti signalling protein (ASIP) is associated with decreased levels of mRNA.** *Pigment Cell Res.* v. 19, n. 3, p. 226-231, 2006.
- Walsh, S. et. al. **IrisPlex: a sensitive DNA tool for accurate prediction of blue and brown eye colour in the absence of ancestry information.** *Forensic Sci Int Genet.* v. 5, n. 3, p. 170-180, 2011.
- Walsh, S. et. al. **DNA-based eye colour prediction across Europe with the IrisPlex system.** *Forensic Sci Int Genet.* v. 6, n. 3, p. 330-340, 2012.
- Walsh, S. et. al. **The HirisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA.** *Forensic Sci Int Genet.* v. 7, n. 1, p. 98-115, 2013.
- Walsh, S. et. al. **Developmental validation of the HirisPlex system: DNA-based eye and hair colour prediction for forensic and anthropological usage.** *Forensic Sci Int Genet.* v. 9, p. 150-161, 2014.
- Wilson, B.D. et al. **Structure and function of ASP, the human homolog of the mouse agouti gene.** *Hum Mol Genet.* v. 4, n. 2, p. 223-230, 1995.
- Wilson, S. et al. **NCKX5, a natural regulator of human skin colour variation, regulates the expression of key pigment genes MC1R and alpha-MSH and alters cholesterol homeostasis in normal human melanocytes.** *Adv Exp Med Biol.* v. 961, p. 95-107, 2013.
- Yamaguchi, Y.; Hearing, V.J. **Physiological factors that regulate skin pigmentation.** *Biofactors.* v. 35, n. 2, p. 193-199, 2009.
- Zbieć-Piekarska, R.; Spólnicka, M.; Kupiec, T. **Examination of DNA methylation status of the ELOVL2 marker may be useful for human age prediction in forensic science.** *Forensic Sci Int Genet.* v. 14, p. 161-167, 2015.
- Zeigler-Johnson, C. et al. **Population differences in the frequency of the agouti signaling protein g.8818a>G polymorphism.** *Pigment Cell Res.* v. 17, n. 2, p. 185-187, 2004.
- Zhang, M. et al. **Genome-wide association studies identify several new loci associated with pigmentation traits and skin cancer risk in European Americans.** *Hum Mol Genet.* v. 22, n. 14, p. 2948-2959, 2013.
- Zieger, M.; Utz, S. **About DNA databasing and investigative genetic analysis of externally visible characteristics: A public survey.** *Forensic Sci Int Genet.* v. 17, p. 163-172, 2015.

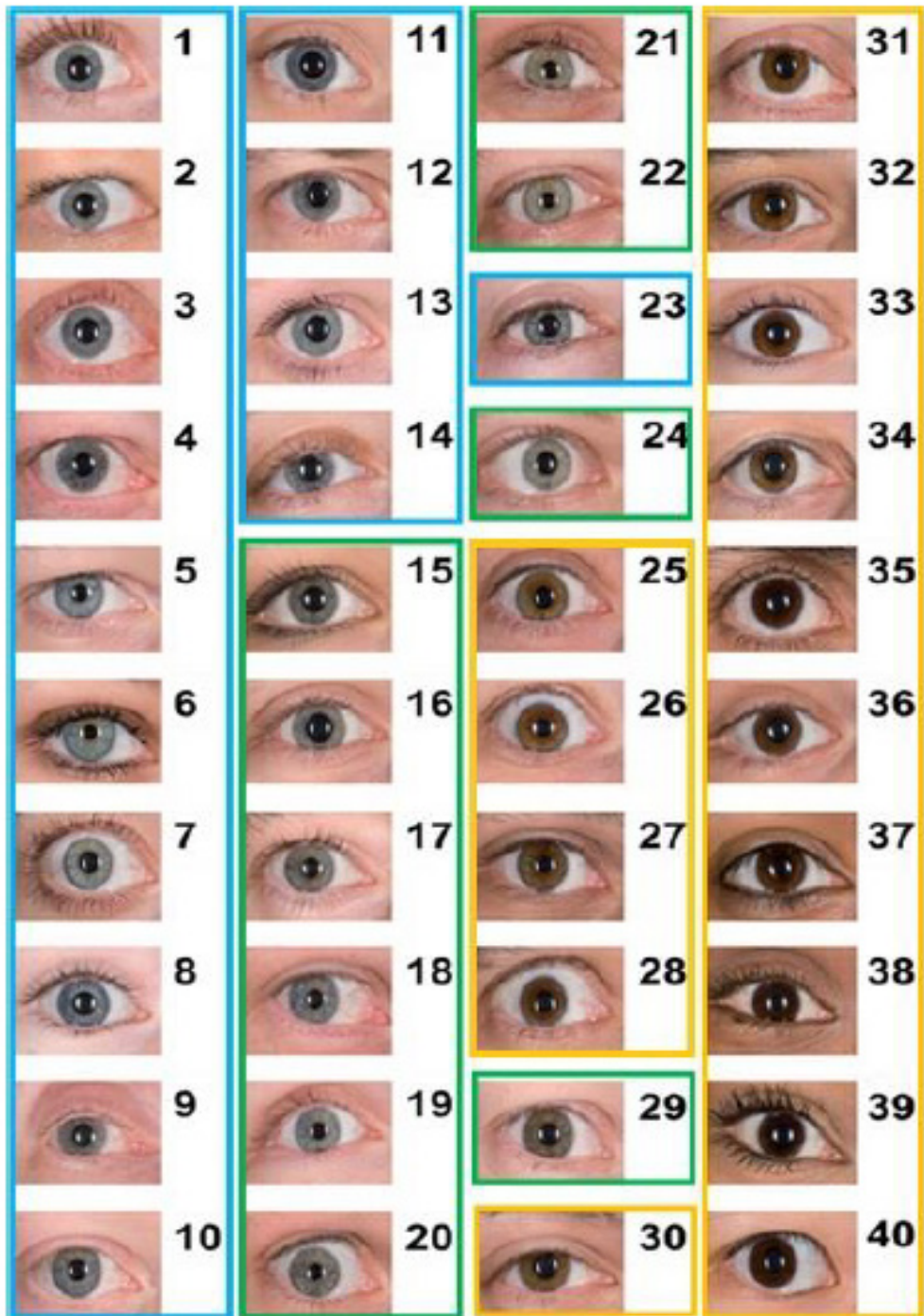
# ANEXOS

## Anexo A



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

## Anexo B



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

**Felícia de Araujo Lima** - Possui graduação em Biomedicina pela Universidade de Mogi das Cruzes, campus Villa Lobos (2012), Especialização em Biologia Molecular pelo Instituto de Pesquisa e Educação em Saúde de São Paulo (2014) e Mestrado em Ciências (Fisiopatologia Experimental) pela Universidade de São Paulo. Atuou como técnica de Laboratório (2010-2013) no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (Laboratório de Fisiologia Obstétrica (LIM57)). Tem experiência nas áreas de Análises Clínicas, Biologia Celular e Molecular, atuando principalmente nos seguintes temas: avaliação de polimorfismos de base única (SNPs) para verificação de fenótipos complexos e ciências forenses.

Agência Brasileira do ISBN  
ISBN 978-85-7247-805-2



9 788572 478052