

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
CURSO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

DIEGO WORDELL GUBERT

**ANÁLISE DE SNPs EM GENES DE PIGMENTAÇÃO HUMANA EM INDIVÍDUOS
COM OLHOS NEGROS E PELE CLARA**

Porto Alegre
2015

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

DIEGO WORDELL GUBERT

**ANÁLISE DE SNPs EM GENES DE PIGMENTAÇÃO HUMANA EM INDIVÍDUOS
COM OLHOS NEGROS E PELE CLARA**

Dissertação apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e Molecular da
Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade
Católica do Rio Grande do Sul

Orientador

Profa. Dra. Clarice Sampaio Alho

Porto Alegre

2015

Ficha Catalográfica

W924a Wordell Gubert, Diego

Análise de SNPs em genes de pigmentação humana em indivíduos com olhos negros e pele clara / Diego Wordell Gubert. – 2015.

54 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Clarice Sampaio Alho.

1. Fenotipagem de DNA Forense. 2. FDF. 3. SNP. 4. Pigmentação do Olho. 5. Pigmentação da Pele. I. Sampaio Alho, Clarice. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051

RESUMO

A compreensão da função e expressão dos genes envolvidos nos traços externamente visíveis (EVT; do inglês *externally visible traits*) têm sido amplamente utilizadas em vários estudos de evolução humana e investigações forenses. Para este último propósito, vários esforços têm sido feitos para descobrir um modelo eficiente e fácil para a predição da cor da pele e dos olhos em seres humanos. A vantagem óbvia da predição de tais EVTs, através da utilização do DNA, é sua incorporação na rotina em laboratórios forenses, sendo assim aplicada em investigações policiais. Em nosso estudo, relacionamos o genótipo de oito SNPs em genes relacionados com a pigmentação, rs4778138 (*OCA2*; SNP G>A); rs12913832 (*HERC2*; SNP A>G); rs16891982 (*SLC45A2*; SNP C>G); rs8045560 (*MC1R*; SNP C>T); rs1426654 (*SLC24A5*; SNP G>A); rs2733832 (*TYRP1*; SNP C>T); rs1042602 (*TYR*; SNP C>A); rs916977 (*HERC2*; SNP A>G), com diferentes abordagens analíticas. Um total de 116 indivíduos de uma população 'Branca de Neve' (Olhos Escuros e Pele Clara) do Sul do Brasil foram analisados para identificar a relação genótipo-fenótipo destes SNPs de acordo com a cor da pele e dos olhos. Estudos anteriores mostraram uma associação de três SNPs com Olhos e Pele Escuros (DES do inglês *Dark Eye and Skin*; de populações africanas) e cinco SNPs com Olhos e Pele Claros (LES do inglês *Light Eye and Skin*; de populações européias). Uma análise funcional discriminante (DFA, do inglês *discriminant function analysis*) foi realizada para obter a distribuição dos indivíduos entre os grupos DES e LES. rs4778138 (*OCA2*), rs12913832 (*HERC2*), and rs916977 (*HERC2*) apresentaram uma associação de 82% com o grupo DES indicando uma associação com o fenótipo olho escuro, *SLC45A2* rs16891982 (*SLC45A2*), rs8045560 (*MC1R*), rs1426654 (*SLC24A5*), rs2733832 (*TYRP1*), and rs1042602 (*TYR*) apresentaram uma relação de 90% com o grupo LES, indicando assim uma associação com o fenótipo pele clara,

PALAVRAS CHAVE: Fenotipagem de DNA Forense, FDF, SNP, Pigmentação do Olho, Pigmentação da Pele

ABSTRACT

The understanding of gene function in the determination of externally visible traits (EVTs) has several uses in human population evolutionary studies and in forensic investigations. With regards to the latter, a fair amount of effort has been made to discover an easy and efficient model for the prediction of eye and skin color in humans. The obvious advantage of the prediction of such EVT through the use of DNA is that it can be incorporated as routine procedure in forensic labs and be applied to police investigations. In the present study, we combined the genotypes of eight SNPs in pigmentation-related genes, rs4778138 (*OCA2*; SNP G>A); rs12913832 (*HERC2*; SNP A>G); rs16891982 (*SLC45A2*; SNP C>G); rs8045560 (*MC1R*; SNP C>T); rs1426654 (*SLC24A5*; SNP G>A); rs2733832 (*TYRP1*; SNP C>T); rs1042602 (*TYR*; SNP C>A); rs916977 (*HERC2*; SNP A>G), with multiple analytical approaches. A total of 116 individuals from a South of Brazil Snow White population (Dark Eye and Light Skin) were analyzed to identify the genotype-phenotype relationship of these SNPs according skin or eye color. Previous studies have shown an association of three SNPs with Dark Eye and Skin (DES; from African populations) and five SNPs with Light Eye and Skin (LES; from European populations). Discriminant Function Analysis (DFA) was performed to obtain the distribution of the individuals among the DES and LES clusters. rs4778138 (*OCA2*), rs12913832 (*HERC2*), and rs916977 (*HERC2*) presented an 82% relationship with the DES cluster, indicating an association with the dark eye phenotype and rs16891982 (*SLC45A2*), rs8045560 (*MC1R*), rs1426654 (*SLC24A5*), rs2733832 (*TYRP1*), and rs1042602 (*TYR*) presented a 90% relationship with the LES cluster, indicating an association with light skin phenotype.

KEYWORDS: Forensic DNA Phenotyping, FDP, SNP, Eye Pigmentation, Skin Pigmentation

LISTA DE ABREVIATURAS

EVT	Traços externamente visíveis; do inglês <i>externally visible traits</i>
SNP	do inglês, <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
DES	Olho e Pele escuros; do inglês <i>Dark Eye and Skin</i>
LES	Olho e Pele claros; do inglês <i>Light Eye and Skin</i>
SW	Branca de Neve; do inglês <i>Snow White</i>
MC1R	do inglês, <i>melanocortin 1 receptor</i>
ASIP	do inglês, <i>Agouti signaling protein</i>
MATP	do inglês, <i>Membrane associated transporter protein</i>
SLC45A2	do inglês, <i>Solute Carrier Family 45, member 2</i>
SLC24A5	do inglês, <i>Solute Carrier Family 24, member 5</i>
TYR	do inglês, <i>Tyrosinase</i>
TYRP1	do inglês, <i>Tyrosinase-related protein 1</i>
OCA2	do inglês, <i>Oculocutaneous albinism type II</i>
HERC2	do inglês, <i>HECT domain and RCC1-like domain-containing protein 2</i>
VNTR	do inglês, <i>Variable Number of Tandem Repeat</i>
STR	do inglês, <i>Short of Tandem Repeat</i>
AIM	do inglês, <i>Ancestry Informative Marker</i>
PCR	do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
CEV	Características Externas Visíveis
CREB	do inglês, <i>cyclicAMP response-element binding protein</i>
MITF	do ingles, <i>Microphthalmia-associated Transcription Factor</i>
DQ	dopaquinona
UV	ultravioleta

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	7
CAPÍTULO 1 - APRESENTAÇÃO DO TEMA E OBJETIVOS.....	8
1- REFERENCIAL TEÓRICO.....	8
1.1 - Biologia da Pigmentação	9
1.2 - Pigmentação e Ancestralidade.....	13
1.3 - Genes e SNPs envolvidos na determinação de pigmentação de pele e olhos.....	14
1.3.1- Gene <i>HERC2</i> : rs916977 e rs12913832.....	16
1.3.2- Gene <i>OCA2</i> : rs4778138	17
1.3.3- Gene <i>SLC24A5</i> : rs1426654	17
1.3.4- Gene <i>SLC45A2</i> : rs16891982	18
1.3.5- Gene <i>TYR</i> : rs1042602	19
1.3.6- Gene <i>TYRP1</i> : rs2733832	19
1.3.7- Gene <i>MC1R</i> : rs8045560.....	19
1.4 - Frequências alélicas dos SNPs envolvidos na determinação de pigmentação de pele e olhos em populações Africanas e Europeias.....	20
2- OBJETIVOS	21
CAPÍTULO 2 - ARTIGO CIENTÍFICO	22
CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
ADENDOS.....	44

CAPÍTULO 1 - APRESENTAÇÃO DO TEMA E OBJETIVOS

1- REFERENCIAL TEÓRICO

Ao longo dos anos foram implantadas diferentes técnicas a fim de caracterizar e individualizar pessoas, como em exemplo os exames antropométricos, impressões digitais e estudos envolvendo marcadores genéticos e bioquímicos (STRs, VNTRs, polimorfismos dos sistemas HLA, ABO e de outras proteínas séricas) (Kobachuk, 2012). Conjuntos autossômicos, altamente polimórficos conhecidos como STRs (*Short tandem repeat*) são marcadores moleculares utilizados na identificação humana em casos forenses há quase vinte anos (Jobling *et al.*, 2004). Na atualidade, o uso dos marcadores STR é muito vasto no sistema forense, sendo aplicado nos casos de identificação forense criminal e em testes de paternidade ou parentesco (Yoshida *et al.*, 2011). A confiabilidade elevada do resultado de uma análise de STR permite que ele seja usado como prova respeitável nos processos penal ou cível. Além disto, análises conjuntas de marcadores moleculares do tipo SNPs (*single nucleotide polymorfism*) podem também auxiliar na identificação humana, pois permitem a obtenção de perfis genômicos únicos para cada indivíduo (Kobachuk, 2012). SNPs, que representam a classe mais abundante de polimorfismos humanos, podem servir tanto para a discriminação individual como para a predição de Características Externas Visíveis (CEV). Sua abundância é a principal razão do grande interesse atual no campo forense; e o mapeamento do genoma humano tornou possível o desenvolvimento de mapas de genótipos e de haplótipos que podem caracterizar fenotipicamente um ser humano (Stacey *et al.*, 2002).

Entre as CEVs, a variação de pigmentação em humanos tem sido um bom alvo. Mutações polimórficas do tipo SNPs, podem determinar substituições de aminoácidos na proteína, alterando as propriedades funcionais da proteína traduzida e sendo expressa em fenótipos distintos (O'rahilly, 2009). Os traços fenotípicos mais promissores para a identificação forense são aqueles relacionados à pigmentação da pele, olhos e cabelos, por serem características muito marcantes, de fácil visualização e constituírem um dos fenótipos mais variáveis na população humana (Jablonski e Chaplin, 2000; Sturm *et al.*, 2001; Parra, 2007; Kayser e Schneider, 2009). O desenvolvimento de técnicas quantitativas para mensurar a pigmentação proporcionou uma maior objetividade na classificação da ampla variação de pigmentação existente, permitindo identificar de forma mais precisa os genes que de alguma forma exercem influência sobre essa característica (Jablonski, 2004).

Apesar de ser promissora a utilização de marcadores genéticos de traços fenotípicos na identificação humana para fins forenses, a descrição de genes e do mecanismo pelo qual eles influenciam a definição das características fenotípicas é de difícil elucidação, uma vez que essas características apresentam um padrão de herança complexo, por serem determinadas por múltiplos genes (poligenia) e por sofrerem forte influência do meio ambiente (Sturm e Larsson, 2009). Não obstante, estudos

demonstram que a base genética da variação normal da pigmentação é passível de ser decifrada (Van Daal, 2008) se forem avaliadas as variantes genéticas adequadas (Liu *et al.*, 2009).

Pesquisas de associação genótipo-fenótipo sobre a cor do cabelo, a cor da íris e a pigmentação da pele têm estudado variações de SNPs em genes diretamente envolvidos na síntese de pigmentos (Sturm, 2009; Walsh *et al.*, 2011a; Walsh *et al.*, 2011b; Walsh *et al.*, 2013; Cerqueira *et al.*, 2014; Yun *et al.*, 2014). Todos eles sustentam que há uma necessidade grande por parte dos órgãos policiais de possuir uma base de dados com padrões genéticos que possam auxiliar na solução de crimes, excluindo ou inserindo indivíduos em processos criminais que buscam identificar suspeitos ou vítimas (Pulker *et al.*, 2007). Especialmente no caso de não se ter informações sobre o perfil genético de referência (para confronto de alelos de STRs), a amostra questionada pode ser estudada para fins da predição do fenótipo do indivíduo (Kayser *et al.*, 2011).

1.1 - Biologia da Pigmentação

Acredita-se que existam mais de 120 genes de alguma forma envolvidos nas vias de pigmentação, os quais agem em diferentes estágios do processo de produção da melanina (Sturm, 2006; Branicki *et al.*, 2009). Tais genes agem em caráter quantitativo, influenciando cumulativamente nas diferentes tonalidades de coloração (Tully, 2007). Contudo, cerca de apenas uma dezena de genes têm alelos que definitivamente determinam os padrões extremos de pigmentação melânica, isto é, os padrões escuro e claro. A compreensão da biologia da pigmentação depende do entendimento dos eventos intramelanossomais. Os melanossomas (compartimentos sub-celulares, produzidos pelos melanócitos, que sintetizam e estocam polímeros de melanina) são os principais responsáveis pela coloração dos tecidos humanos (Sulem *et al.*, 2007) por causa do seu conteúdo de melanina. Melaninas são produzidas em dois tipos distintos quimicamente: eumelanina (coloração castanho-preto) e feomelanina (coloração amarelo-avermelhada) (Ito *et al.*, 2006). Eumelaninas são escuras, opacas e altamente polimerizadas (formato oval), enquanto que as feomelaninas, por possuírem sulfidril e cisteína em seus passos de conjugação, são mais leves e menos polimerizadas (formato esférico), o que ocasiona uma deposição desforme no lúmen. O acúmulo, a transferência, o conteúdo e a forma destes componentes estão diretamente ligados à intensidade da coloração de pele e de olho (Sturm, 2006; Kondo e Hearing, 2011).

A melanina é gradualmente produzida nos melanossomas que, quando maduros, são transportados ao longo das projeções dendríticas do melanócitos até os queratinócitos adjacentes da pele (Sturm *et al.*, 2006). O número de melanócitos entre os diferentes tons de pele é constante, mas peles mais escuras apresentam melanossomas mais densos e individualmente dispersos, enquanto peles mais claras apresentam melanossomas menos densos e menores (Sturm *et al.*, 2012).

Os melanossomos desenvolvem gradualmente o pigmento enquanto amadurecem (Slominski *et al.*, 2004; Lin e Fisher, 2007; Ho *et al.*, 2011). Após sintetizado, o pigmento é passado aos queratinócitos circundantes da pele e do folículo piloso (Sturm, 2006) e, por fim, para as células do epitélio pigmentar da retina (Kondo e Hearing, 2011). O acúmulo de melanina e a distribuição do melanossomos variam

quantitativamente entre indivíduos de diferentes grupos étnicos (Alaluf *et al.*, 2002; Sturm, 2006). Os melanossomos são divididos em quatro estágios de maturação (I a IV), determinados pela sua estrutura, quantidade, qualidade e arranjo da melanina produzida (Kushimoto *et al.*, 2001; Costin e Hearing, 2007) (Figura 1). O melanossomo no estágio I é uma organela esférica, com ausência da enzima tirosinase e de componentes internos estruturais. No estágio II a organela apresenta uma estrutura ovoide, atividade de TYR e a expressão de uma proteína da matriz estrutural, conhecida como PMEL17, necessária para a produção da matriz fibrilar interna, e pela deposição mínima de melanina (Berson *et al.*, 2001; Sturm, 2006; Costin e Hearing, 2007; Kondo e Hearing, 2011). No estágio III, a síntese de melanina é iniciada e o pigmento é depositado sobre fibras internas. No estágio IV de desenvolvimento, o melanossomo apresenta formato elíptico ou elipsoide. Estes estados de desenvolvimento referem à eumelanossomos (que sintetizam a eumelanina), e nos feomelanossomos (que sintetizam a feomelanina) o processo é similar com a diferença que durante o processo de maturação, há ausência de fibrilas (Costin e Hearing, 2007; Brenner e Berking, 2010).

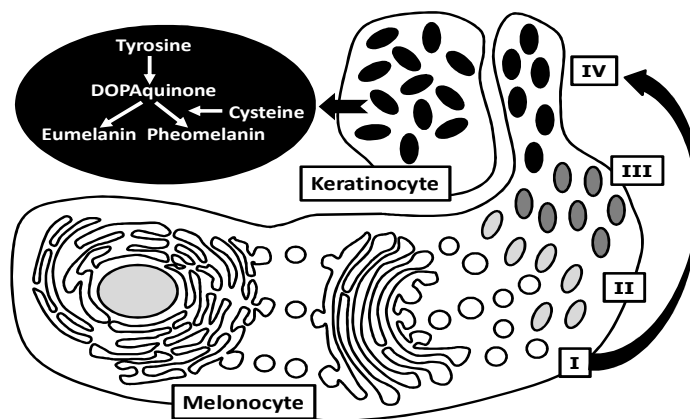


Figura 1 - Esquema de um melanócito: O mecanismo para a produção da melanina. Os quatro estágios (I, II, III e IV) de desenvolvimento dos melanossomos são mostrados deslocando-se em direção à periferia da célula. À esquerda (ampliado) está um melanossomo maduro (estágio IV) onde se vê a via de síntese de eumelanina e feomelanina de forma simplificada.

Os melanócitos dos olhos têm duas origens distintas, os que se encontram no epitélio pigmentoso da íris (IPE) que têm origem neuroectodérmica, e os melanócitos estromais, que têm a mesma origem embrionária dos melanócitos dérmicos (oriundos da crista neural), e migram através do trato uveal durante o desenvolvimento. Nas íris de coloração castanha existe uma abundância de melanócitos e de melanina na camada basal anterior e no estroma, enquanto que nas íris de coloração azul essas camadas contêm muito pouca melanina (Sturm e Larsson, 2009).

A íris, região ocular composta por tecido conectivo e muscular, é responsável pelo controle da entrada da luz incidente através de sua abertura central denominada pupila, regulando a formação das imagens na retina. Essa região é subdividida em cinco camadas, sendo a mais externa denominada borda anterior, seguida do estroma, esfíncter e músculos dilatadores e, mais internamente, o epitélio posterior pigmentado (Sturm e Frudakis, 2004). Dessas, a borda anterior e o estroma são as principais camadas

contribuintes para a variação da coloração da íris (Wilkerson *et al.*, 1996), uma vez que o epitélio posterior pigmentado apresenta pigmentação em todas as cores observadas, não contribuindo de forma relevante para a variação fenotípica final (Sturm e Frudakis, 2004). Íris de coloração marrom apresentam melanócitos com alto conteúdo de melanina na borda anterior e no estroma, enquanto em íris azuis, essas camadas possuem baixo teor de melanina, permitindo maior passagem da luz e consequente refletância de ondas curtas azuis pelas fibras de colágeno presentes. No estroma, os dendritos dos melanócitos são geralmente paralelos à superfície da íris, os quais tendem a se agrupar na borda anterior, e correspondem a aproximadamente 66% das células componentes dessas camadas, independentemente da coloração da íris (Wilkerson *et al.*, 1996).

Ao contrário do que ocorre na pele, onde a melanina é continuamente produzida e secretada, os melanossomos da íris não são secretados dos melanócitos, mas sim retidos e acumulados no citoplasma destes. As variações na coloração observadas são resultado das diferentes quantidades e tipos de melanossomos presentes nos melanócitos, sendo a proporção de eumelanina/feomelanina geralmente maior em colorações mais escuras, e colorações mais claras apresentando maior concentração do pigmento feomelanina (Sturm e Larsson, 2009).

Sabe-se que, apesar de todas as colorações de olhos possuírem um número similar de melanócitos, os olhos azuis contêm um mínimo de pigmentos e poucos melanossomos; os olhos verdes são resultado de moderados níveis de pigmentos, intensidade de melanina e grande quantidade de partículas melanossomais (Sturm e Frudakis, 2004). Entretanto, estudos acerca das proporções eumelanina/feomelanina que possam vir a determinar a cor dos olhos são ainda inconclusivos (Prota *et al.*, 1998) (Figura 2).

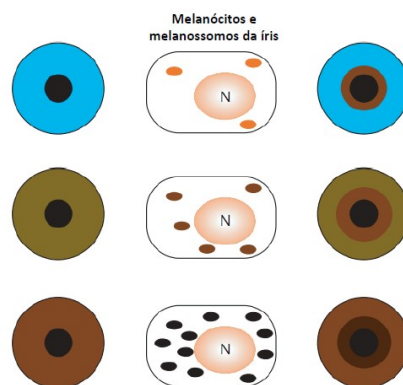


Figura 2 - Pigmentação dos olhos. Diferenças entre os tipos e quantidades de melanossomos nos melanócitos dos olhos mais claros aos mais escuros (retirado de Sturm e Frudakis, 2004).

O regulador positivo da síntese de melanina mais importante é o receptor de melanocortina 1 (MC1R). Na sua via, o MC1R ativa a CREB (*cyclicAMP response-element binding protein*) que aumenta a expressão de MITF (*Microphthalmia-associated Transcription Factor*) e sua ativação, por fosforilação, estimula a transcrição de tirosinase (TYR), de proteína 1 relacionada a tirosinase (TYRP1) e de dopacromo tautomerase (DCT) (Liu *et al.*, 2013). O primeiro passo na melanogênese é a criação da dopaquinona (DQ) a partir da oxidação de tirosina pela tirosinase (TYR) com 3,4-dihidroxi-fenilalanina (DOPA) como agente intermediário (Kondo e Hearing, 2011) (Figura 3A).

Eumelanogênese: Após a produção de DQ a sua espontânea ciclização acontece, dando origem a ciclodopa, que então faz uma reação de redução com uma molécula de DQ, resultando em uma molécula de DOPAcromo e uma de DOPA (Land *et al.*, 2003). O DOPAcromo, por sua vez, é decomposto espontaneamente por descarboxilação em pH neutro para formar 5,6-dihidroxiindole (DHI) e ácido 5,6-dihidroxiindole-2-carboxílico (DHICA) numa razão de 70:1 (Palumbo *et al.*, 1987). A enzima DOPAcromo tautomerase (DCT) tautomeriza o DOPAcromo produzindo somente DHICA (Palumbo *et al.*, 1991). DHI e DHICA são oxidadas e polimerizadas para dar origem a eumelanina (Figura 3B).

Feomelanogênese: A feomelanogênese se dá pela adição de cisteína na oxidação da DQ para produzir dois isômeros principais de DOPAcisteinila (CD): a 5SCD e a 2SCD. Ocorre uma troca redox entre a CD e a DQ para produzir CD-quinonas e DOPA. A desidratação da CD-quinona faz com que ocorra a ciclização dando origem a orto-quinona (QI) que é rearranjada e forma o intermediário 1,4-benzotiazina, que se polimeriza dando origem a feomelaninas (Napolitano *et al.*, 1994; Napolitano *et al.*, 1999; Napolitano *et al.*, 2000; Greco *et al.*, 2009; Wakamatsu *et al.*, 2009) (Figura 3C).

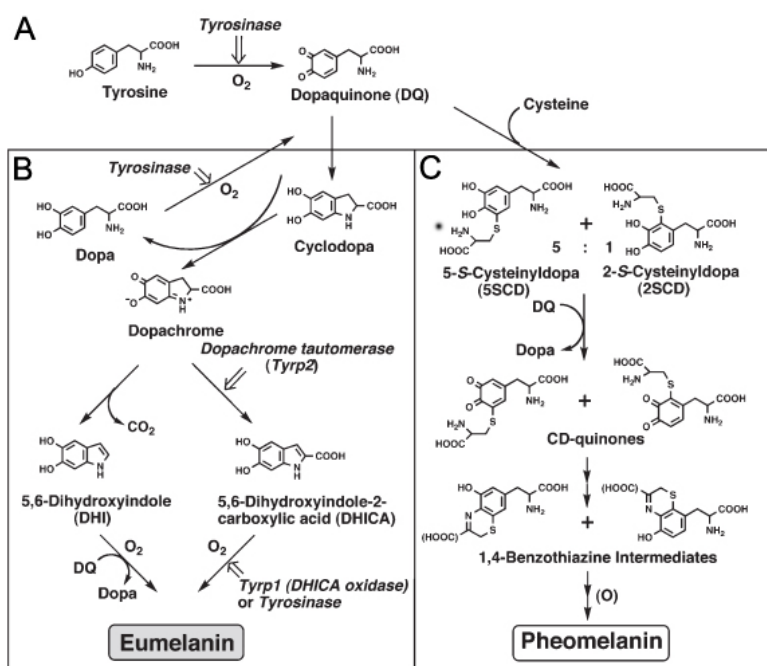


Figura 3 – Via biossintética da produção de eumelanina/feomelanina a partir de tirosina. As atividades da TRY, TYRP1 e DCT estão envolvidas na produção da eumelanina, mas apenas TYR e cisteína são necessários para a produção de feomelanina a partir de DQ (Ito e Wakamatsu, 2010).

1.2 - Pigmentação e Ancestralidade

Sabe-se que a pigmentação de pele e de olhos está ligada à evolução. Os seres humanos, diferente de outros primatas e mamíferos, não possuem pelos em todo o corpo. Uma explicação bem aceita à ausência de pelos é de que seria difícil a transpiração em lugares quentes e, assim, a regulação da temperatura seria mais eficiente na carência de pelos. Porém, a sobrevivência do indivíduo diante da quantidade reduzida de pelos na superfície do corpo implicaria na necessidade de uma proteção contra a radiação ultravioleta (UV). A principal via de proteção contra a luz UV é a presença na superfície de melanina, a qual é capaz de absorver a radiação eletromagnética no comprimento das ondas ultravioleta resguardando, assim, as moléculas de DNA, de proteínas e de outras macromoléculas (Rees, 2004; Liu *et al.*, 2013).

Observando a diferença da pigmentação e a localização geográfica das populações humanas, pode-se estabelecer uma relação entre radiação ultravioleta, perda dos pelos e manutenção da pigmentação da pele pela evolução: a pele negra oferece uma proteção maior em ambientes com alta incidência de radiação UV, como em locais de baixa latitude, enquanto a pele clara facilita a biossíntese de vitamina D em regiões de latitudes elevadas, onde a incidência de radiação UV é mediana ou baixa (Soejima *et al.*, 2007). Sendo assim, acredita-se que a história da transformação do fenótipo africano de pigmentação negra até o leque de variação melânica presente nos seres humanos de hoje se deu, pelo menos em parte, pela pressão seletiva da radiação solar, fixando-se o clareamento da pele mais em europeus e asiáticos, do que nos africanos (Liu *et al.*, 2013).

Diante da relação fortemente positiva entre pigmentação e origem étnica, poder-se-ia questionar se a presença de determinado alelo seria apenas um marcador de ancestralidade ou se, de fato, poderia ele estar diretamente envolvido na determinação fenotípica da pigmentação. Na tentativa de solucionar esta questão, muitos genes têm sido estudados, e os produtos proteicos e/ou a expressão de suas variantes alélicas têm sido associados à síntese ou não de melaninas. Porém, no presente momento é possível identificar apenas alguns SNPs em genes os quais, de fato, estão diretamente envolvidos na síntese de pigmentos de pele e de olhos, independentemente da origem étnica da população em estudo (Kenny *et al.*, 2012). Por exemplo, como será citado a seguir, o SNP rs12913832 do gene *HERC2*, o qual se encontra a 21kb *upstream* do promotor de *OCA2*, regula a expressão de *OCA2* pelo dobramento da cromatina que permite o ancoramento dos fatores de transcrição de *OCA2*. O produto da expressão de *OCA2*, a proteína P, é essencial para a síntese de melanina. O alelo A do SNP rs12913832 ao permitir a abertura de cromatina, e o recrutamento dos fatores de transcrição de *OCA2*, induz à coloração mais escura, enquanto o alelo G mantém a cromatina mais fechada, tendo menos eficácia no recrutamento destes fatores, ocasionando uma coloração mais clara (Figura 4).

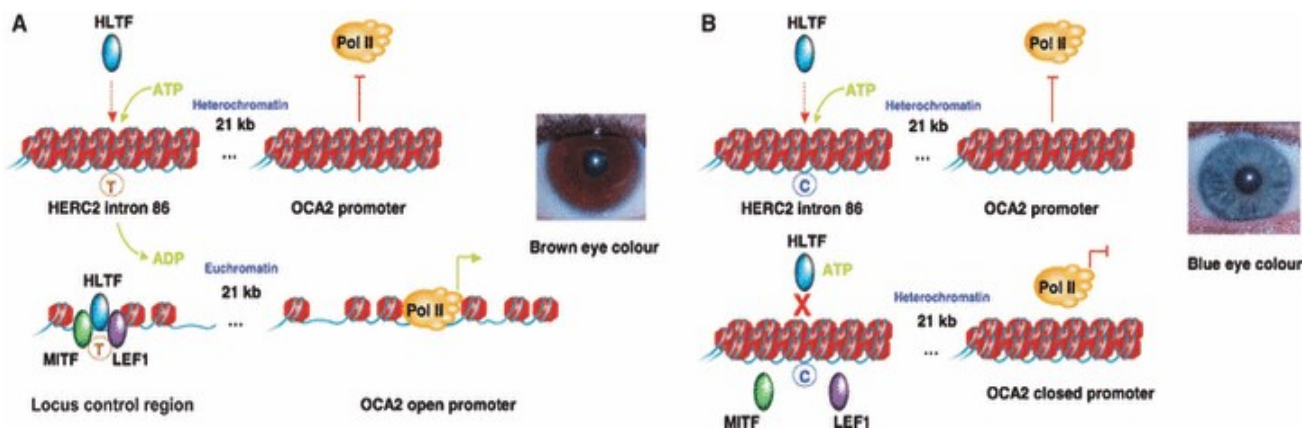


Figura 4- Modelo de determinação da cor de Iris castanho (A) e azul (B) influenciado pelo SNP rs12913832 do gene *HERC2*, segundo Sturm e Larsson, 2009.

Mesmo se localizando no interior de segmentos gênicos chave para a produção de melanina, poucos os alelos foram, contudo, já reconhecidos como sendo os próprios responsáveis pelo efeito variante de síntese de pigmento. Por não ter sido ainda completamente elucidada a implicação efetiva no fenótipo de cada variante alélica, algumas delas podem estar associadas à pele/olho escuro ou à pele/olho claro apenas por estarem em desequilíbrio de ligação com uma variante, de fato, fenótipo-efetiva. De todas as formas, em geral, têm sido usados para explicar a coloração escura aqueles alelos cuja frequência está mais elevada nas populações africanas negras (alelos originais/ancestrais) e os alelos derivados, cuja frequência está mais elevada nas populações europeias, para explicar a coloração clara. O desafio na análise da maioria dos SNPs ainda é saber se o marcador é de fenótipo ou de ancestralidade. No intuito de focar nos marcadores de fenótipo, têm sido retirados dos estudos associativos e/ou de predição de fenótipo aqueles alelos derivados (isto é, mutações polimórficas mais recentes) cujas frequências estão mais aumentadas nas populações africanas, como é o caso do alelo derivado (mais recente) do SNP rs26722 do gene *SLC45A2* (regulador do pH que controla a via da síntese de melanina, no interior do melanócito). Algumas populações africanas de fenótipo escuro mostram a presença de um alelo derivado raro (alelo A; Lys272) deste SNP e, a despeito do seu fenótipo claro, populações caucasianas têm em frequência o alelo original deste SNP (alelo G; Glu272) similares às de aborígenes australianas escuros (frequência de G ~0,98) (Nakayama *et al.*, 2006). Devido ao fato de o alelo original (G; Glu272) estar presente em grupos populacionais com diferentes fenótipos de pigmentação (caucasianos claros e aborígenes escuros), e ao fato de populações africanas de cor escura conterem ambas variantes (Lys272 e Glu272), Graf *et al.* (2005) concluíram que este polimorfismo não estaria associado com a determinação de pigmentação, mas sim que se trataria de uma variação associada à distribuição/isolamento geográfico. Assim, o alelo raro A surgiu como uma mutação recente apenas em africanos, e não interferiu na expressão da cor.

1.3 - Genes e SNPs envolvidos na determinação de pigmentação de pele e olhos

Mais de uma centena de genes com efeitos conhecidos já foram descritos em modelos animais e seus homólogos identificados em humanos (IFPCS, 2009). Esses genes podem ser divididos em grupos funcionais de acordo com a influência que seus produtos proteicos exercem na produção e regulação da

pigmentação como segue: 1- genes que codificam fatores de crescimento e transcrição para o controle do crescimento e diferenciação dos melanoblastos em melanócitos; 2- genes que codificam proteínas componentes dos melanossomos; 3- genes que controlam a biossíntese de organelas relacionadas; 4- genes que determinam a produção de eumelanina *versus* feomelanina e 5- genes envolvidos no transporte dos melanossomos.

Determinados SNPs nos genes *HERC2*, *OCA2*, *SLC24A5*, *SLC45A2*, *TYR*, *TYRP1* e *MC1R*, foram associados com a manifestação da pigmentação humana, sendo os três primeiros os responsáveis por grande parte da variação de coloração entre os continentes (Liu *et al.*, 2013).

Com base na literatura disponível, um estudo de revisão do nosso grupo selecionou oito SNPs em genes candidatos ao estudo de previsão de pigmentação em diversas populações, por estarem significativamente relacionados com a manifestação da pigmentação em seres humanos. A base do nosso estudo foi: Tully, 2007; Sulem *et al.*, 2007; Sturm *et al.*, 2008; Branicki *et al.*, 2009; Giardina *et al.*, 2011; Walsh *et al.*, 2011a; Walsh *et al.*, 2011b, Donnelly *et al.*, 2012; Allwood *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013; Walsh *et al.*, 2013. No Quadro 1, estão apresentadas informações acerca dos genes e SNPs por nós selecionados e, na Figura 5, se pode visualizar a localização de cada produto gênico ou estrutura em questão.

Quadro 1 - Genes e SNPs para predição de pigmentação em Humanos

Gene	Lócus	Proteína	rs	Varição	SNP
HERC2	15q13.1	HERC2 (350 aa)	rs916977	Íntron 12	A>G
			rs12913832	Íntron 86	A>G
OCA2	15q11.2	Proteína P (814 aa)	rs4778138	Intron 1	G>A
SLC24A5	15q21.1	NCKX5 (500 aa)	rs1426654	Ala111Thr	331G>A
SLC45A2	5p13.2	MATP (530 aa)	rs16891982	Phe374Leu	1122C>G
TYR	11q14	TYR	rs1042602	Ser192Tyr	C>A
TYRP1	9p23	TYRP1 (537 aa)	rs2733832	intragênica	C>T
MC1R	16q24.3	MC1R (317 aa)	rs8045560	intragênica	C>T

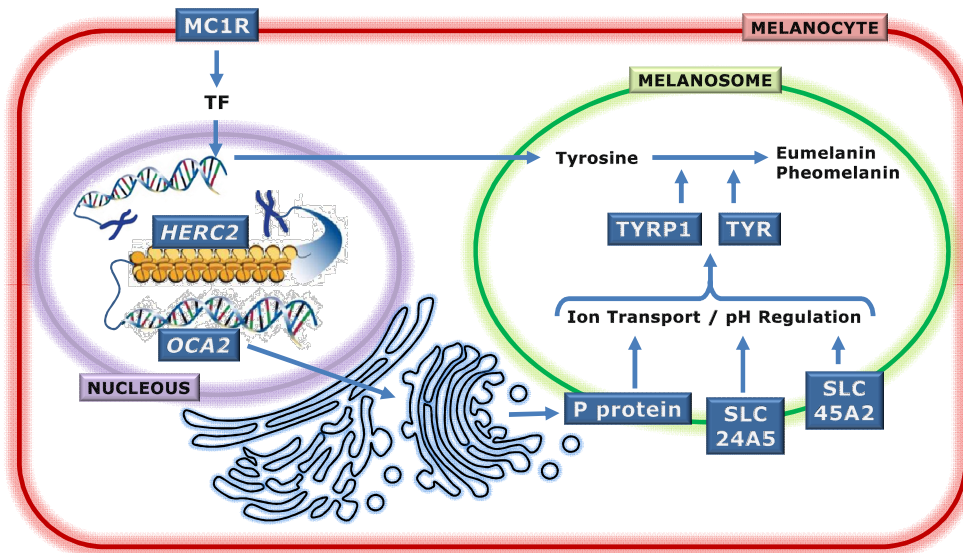


Figura 5- Indicação na estrutura celular dos genes e/ou seus produtos proteicos para predição de pigmentação em Humanos

1.3.1- Gene *HERC2*: rs916977 e rs12913832

O gene *HERC2* (locus 15q13.1) codifica a proteína *HECT domain - RCC1-like domain-containing protein 2* (ou *E3 ubiquitin-protein ligase HERC2*) envolvida no tráfego de proteínas. Ainda que a função do gene *HERC2* seja desconhecida, a sequência de DNA no interior de *HERC2* desempenha um papel estrutural no genoma e na regulação de pigmentação (Donnelly *et al.*, 2012). De acordo com Sturm *et al.* (2008), a proteína *HERC2* não está diretamente envolvida na síntese de pigmento, mas a sequência de DNA dentro da região do gene *HERC2* controla a expressão do gene *OCA2* o que, por sua vez, controla a produção de melanina (Sturm *et al.*, 2008). Tais sequências no interior de *HERC2* são *enhancers* do promotor do gene *OCA2* (Visser *et al.*, 2012).

Visser *et al.* (2012) mostraram que o SNP rs12913832 de *HERC2*, que se encontra a 21kb *upstream* do promotor de *OCA2*, regula a expressão deste gene pelo dobramento da cromatina que gera um *loop* de longo alcance que acaba por promover a expressão de *OCA2*. Esta atividade é mediada pelos fatores de transcrição HLF1, LEF1 e MITF. Porém, diferentes versões alélicas de *HERC2* impedem o desenrolamento da cromatina, o que reduz (mas não impede) a ligação dos fatores de transcrição de *OCA2*, reduzindo consequentemente sua taxa transcripcional. O alelo T (ou alelo A, considerando a fita complementar) do SNP rs12913832 permite a abertura da cromatina e consegue recrutar os fatores de transcrição de *OCA2*, o que permite a produção de melanina e ocasiona uma coloração mais escura, enquanto o alelo C (ou alelo G, considerando a fita complementar) apresenta uma baixa no recrutamento destes fatores, impedindo a síntese plena de pigmento e ocasionando uma coloração mais clara. Assim, via controle da expressão de *OCA2*, o gene *HERC2* tem o papel predominante na determinação de cor. Dados populacionais indicam que os SNPs rs916977 e rs12913832, localizados no íntron 12 e íntron 86, respectivamente, são melhores preditores de cor de olho do que três SNPs já descritos no interior do íntron 1 do próprio gene *OCA2*

(rs7495174, rs6497268 e rs11855019) (Branicki *et al.*, 2009). Estudos em outras populações também indicam o SNP rs12913832 como sendo o SNP com maior efeito na predição da cor de olhos (Allwood *et al.*, 2013).

1.3.2- Gene *OCA2*: rs4778138

O gene que, ao conter mutações deletérias, ocasiona o albinismo oculocutâneo tipo 2 (gene *OCA2*), codifica uma proteína de com 12 domínios transmembrana denominada proteína P (Sturm *et al.*, 2008). Acredita-se que a proteína P esteja envolvida no transporte de ânions, na regulação do pH melanossomal (Visser *et al.*, 2012), e que esteja envolvida no tráfego de proteínas internas como a tirosinase (TYR) e as proteínas associadas a tirosinase 1 (TYRP1) (Valenzuela *et al.*, 2011). *OCA2* por si só, independente de *HERC2*, também desempenha um papel na variação de coloração comum em olhos, cabelo e pele. Três SNPs que se encontram no intron 1 de *OCA2* mostraram ter uma forte associação com a coloração dos olhos (Liu *et al.*, 2013). Além disto, o SNP rs1800407 encontrado no exón 13 do gene *OCA2* ocasiona uma troca do tipo Arg419Gln na sequência polipeptídica da proteína P (Donnelly *et al.*, 2012), esta troca aumenta a penetrância do fenótipo de olhos azuis associados ao SNP rs12913832 (Sturm *et al.*, 2008; Walsh, *et al.*, 2011a).

A proteína P, relacionada ao transporte de sódio/sulfeto (família SLC13), pode estar diretamente implicada na regulação do pH melanossomal (Kondo e Hearing, 2011). Foi observado que a proteína P atuava na permuta de cátions Na^+/H^+ , e/ou como um transportador de glutamato. Ambas as funções indicam que este produto do gene *OCA2* está envolvido no fornecimento de substrato para a TYR. A proteína P pode ainda estar envolvida no tráfego intracelular da enzima TYR, durante a maturação dos melanossomos (Eiberg *et al.*, 2008). O pH do melanossomo regula a atividade da TYR afetando, portanto, uma série de fatores na síntese da melanina, como a taxa de produção de melanina, a proporção de eumelanina/feomelanina e a maturação de melanossomos nos melanócitos e células de melanoma. Resultados experimentais indicaram que a produção de melanina é ideal em ambiente celular com pH próximo a pH-neutro (cerca de pH= 6.8). Paralelamente, a síntese da melanina é quase ausente em pH menor que 5.5. Em um pH menos ácido, por outro lado, a melanogênese pode prosseguir sem qualquer alteração na abundância de proteínas melanogênicas (Ancans *et al.*, 2001; Fuller *et al.*, 2001).

Outro fator envolvido ainda na regulação do pH é a enzima ATPase-vacuolar (V-ATPase), presente no interior do melanossomo, a qual atua na acidificação dos melanossomos. Em estudo realizado por Fuller e colaboradores foi relatado que a V-ATPase está em menor quantidade ou, até mesmo, ausente em melanossomos originados em pele negra (Fuller *et al.*, 2001).

1.3.3- Gene *SLC24A5*: rs1426654

Baseado no que se conhece do gene *NCKX5* ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ exchanger 5), a regulação do pH melanossomal pode ser o papel da proteína codificada pelo gene *SLC24A5* (Tully, 2007). O gene *NCKX5* codifica uma proteína de 500 aminoácidos, que faz parte da família das proteínas envolvidas nas trocas de

sódio/cálcio dependente de potássio, localiza-se próxima à membrana melanossomal e atua no transporte de membrana do melanossomo (Sturm, 2006; Norton *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2013). Lamason *et al.* (2005) descobriram que *SLC24A5* está localizado em melanossomos ou seus precursores, e assumiram que ele poderia atuar acumulando Ca^{2+} no melanossomo. O gene *SLC24A5* foi descoberto primeiramente em *zebra-fish*, no qual está relacionado ao fenótipo de uma listra clara significativa. O homólogo foi identificado e caracterizado em humanos. O gene humano mostrou que uma substituição de Ala111Thr, resultante do SNP rs1426654 (de Ala111-alelo G para Thr111-alelo A) tinha um efeito similar na pigmentação humana, isto é, conferia redução de melanina (fenótipo claro). De acordo com Ginger *et al.* (2008) o *SLC24A5* está associado com a rede trans-Golgi, eles também descobriram que o alelo associado com pele mais escura alelo G (Ala111) do SNP rs1426654 teve maior atividade de troca de íons em relação ao alelo A, o qual está associado com pele mais clara (Thr111). O alelo ancestral evolutivamente conservado (Ala111) do gene *SLC24A5* também foi encontrado em alta frequência em populações africanas e asiáticas, e que o alelo derivado (Thr111) atingiu a fixação em europeus. Especificamente, a frequência para a variante Thr111 varia entre 98,7 e 100% entre as amostras da população de origem europeia, enquanto Ala111 tem uma frequência de 93-100% em amostras de africanos, nativos americanos e população do Leste Asiático da (Dimisianos *et al.*, 2009).

1.3.4- Gene *SLC45A2*: rs16891982

Originalmente identificado como um antígeno do melanoma humano (AIM1) e recentemente renomeado carregador de soluto família 45, membro 2, o gene *SLC45A2* contém sete éxons que se estendem a uma região de aproximadamente 40kb e codifica a proteína MATP de 530 aminoácidos que se supõe ter 12 domínios transmembrana (Graf *et al.*, 2007). Mutações no gene *SLC45A2* causam uma forma de albinismo em humanos (OCA4) (Vierkötter *et al.*, 2012; Tully, 2007; Sturm, 2006). Graf *et al.* (2005) relataram dois SNPs em *SLC45A2* que não estavam associados a doenças, mas sim associados com a variação normal da pigmentação humana, e também a variações entre diferentes populações: Glu272Lys (rs26722) e Phe374Leu (rs16891982). A proteína MATP desempenha um papel crucial no processamento e tráfego intracelular da tirosinase (TYR), uma das enzimas cruciais e necessárias para síntese de melanina, assim como na via de outras proteínas melanossomais (Branicki *et al.*, 2009; Vierkötter *et al.*, 2012).

O SNP rs16891982 gera o polimorfismo proteico Phe374Leu e regula a função de transporte da região transmembrana da proteína MATP. A variante Leu374 (alelo G) desempenha um papel importante no transporte de prótons, resultando em um pH ótimo intramelanossomal, o qual permite a atividade da tirosinase (TYR) e conseqüentemente a produção adequada da eumelanina (fenótipo pigmentado). A variante Phe374 (alelo C) pode alterar o transporte, o pH e a síntese do pigmento (Graf *et al.*, 2005; Tully, 2007; Vierkötter *et al.*, 2012). Nakayama *et al.* (2006) referiram o alelo C (Phe374) como alelo “tipo-Caucasiano”, já que ele resultou na redução da função da MATP, por alterar o tráfego intracelular de elementos melanossomais, criando um ambiente de decréscimo na produção de melanina. Estudando o mesmo gene, Graf *et al.* (2005) observaram que o alelo Lys272 do gene *SLC45A2* mostrou um significante

aumento nas populações asiáticas e afro-americanas quando comparadas a caucasianos. Contudo, as populações aborígenes australianas mostraram frequências alélicas similares às das populações de caucasianos. Devido ao fato do fenótipo de pigmentação dos dois últimos grupos populacionais serem bem diferentes, os autores sugeriram que o polimorfismo rs26722 não estaria associado com a determinação de pigmentação, mas apenas seria uma variação associada à distribuição ou isolamento geográfico.

1.3.5- Gene TYR: rs1042602

O gene *TYR* transcreve a tirosinase, uma importante enzima para a fase inicial da melanogênese (Liu *et al.*, 2013). O gene *TYR* foi indicado como um loci para a susceptibilidade ao vitiligo generalizado (Jin *et al.*, 2012). Variações polimórficas em *TYR* estão diretamente associadas com alterações na coloração de olhos, cabelos e pele (Sulem *et al.*, 2007). Em especial, dois polimorfismos de *TYR*, rs1042602 (Ser192Tyr) e rs1126809 (Ala402Gly), têm mostrado frequências alélicas associadas a fenótipos de diferentes colorações: alelos que aparecem em alta frequência em populações europeias e estão ausentes em populações africanas (Stokowski *et al.*, 2007). As análises enzimáticas *in vitro* revelaram que existe uma redução de aproximadamente 40% na atividade catalítica de tirosinase devido à variação Ser192Tyr (Chaki *et al.*, 2011).

1.3.6- Gene TYRP1: rs2733832

Localizado no cromossomo 9p23, o gene *TYRP1* codifica a proteína tirosinase 1, que faz parte do complexo da enzima tirosinase durante a produção de melanina (Parra, 2007; Liu *et al.*, 2013). O impacto da proteína TYRP1, assim como a da DCT, na estabilidade da proteína TYR e na produção de outras enzimas envolvidas na formação catalítica de melanina mostra que alterações no gene *TYRP1* têm um papel importante na variação normal da pigmentação humana (Sturm, 2006). Há mais de dez anos, viu-se evidências que polimorfismos no *TYRP1* estão associados à coloração de olhos em europeus (Frudakis *et al.*, 2003). Estudos proteicos mostraram que a proteína codificada por *TYRP1* foi encontrada estando elevada 2,6 vezes na pele de africanos e de indianos (pigmentação escura) se comparada à pele de Mexicanos, Chineses e Europeus (pigmentação clara) (Alaluf *et al.*, 2003). Foi ainda observado que mutações raras (não polimórficas) em *TYRP1* são responsáveis pelo albinismo oculocutâneo tipo 3 (OCA3) (Sulem *et al.*, 2007).

1.3.7- Gene MC1R: rs8045560

Até o momento, o gene *MC1R* é o mais bem caracterizado dentre os genes descritos que influenciam a variação normal de pigmentação em humanos (Gerstenblith *et al.*, 2007). Este gene apresenta um padrão peculiar de distribuição dos seus alelos entre as populações humanas: populações africanas e outras caracterizadas pela pele escura apresentam as menores variações alélicas desse gene, enquanto em populações asiáticas e europeias, esse gene é altamente polimórfico (Makova e Norton, 2005). Estudos em diferentes populações têm demonstrado que a região codificadora do gene *MC1R* apresenta mais de 70 variantes já identificadas (Gerstenblith *et al.*, 2007), com impacto significativo no fenótipo de pigmentação neste grupo étnico (Harding *et al.*, 2000; Sturm, 2006).

O gene *MC1R* transcreve para o receptor de melanocortina 1 (*MC1R*), uma proteína-G transmembrana de sete passos localizada na membrana de melanócitos (Valenzuela *et al.*, 2011) e diretamente responsável pela regulação da síntese de eumelanina/feomelanina (Makova *et al.*, 2005). A ligação do hormônio paracrino alfa-estimulante dos melanócitos (α -MSH) ao gene *MC1R* causa uma cascata de sinalização de cAMP aumentando a produção de eumelanina (Makova *et al.*, 2005; Valenzuela *et al.*, 2011), enquanto que a ligação de seu antagonista, a proteína de sinalização agouti (ASIP), resulta em menos produção de eumelanina e no aumento da produção de feomelanina (Voisey *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2012).

1.4 - Frequências alélicas dos SNPs envolvidos na determinação de pigmentação de pele e olhos em populações Africanas e Europeias

O Quadro 2 apresenta um levantamento realizado com dados de indivíduos oriundos de populações Africanas e Europeias descritas nos bancos de dados ALFRED (The ALlele FREquency Database) e HAPMAP. O ALFRED (da U.S. National Science Foundation) foi projetado para tornar os dados de frequência de alelos em amostras de populações humanas prontamente disponíveis para utilização pelas comunidades; e o projeto internacional HAPMAP é resultado de uma parceria de cientistas e agências de financiamento do Canadá, China, Japão, Nigéria, Reino Unido e Estados Unidos, que tem por finalidade desenvolver e manter um recurso público para ajudar pesquisadores a encontrar genes e estes SNPs resultantes de estudos populacionais. Consultando estas duas bases de dados, compilamos resultados de todas as populações já estudadas até maio de 2013. Todos os dados foram plotados em uma planilha prévia para, finalmente, se obter o número total de indivíduos já genotipados e a frequência de cada alelo. Estes dados estão apresentados no Quadro 2.

Quadro 2 - Genes, SNPs (rs) e Alelos associados de pigmentação em Humanos, segundo sua frequência nos conjuntos de populações Africanas e Europeias estudados nos projetos HAPMAP e ALFRED.

Gene (SNP) Alelo	PROJETO	FREQ AFRICANOS	FREQ EUROPEUS
<i>HERC2</i> (rs12913832): Alelo A	HapMap	1.000 (120/120)	0.208 (47/226)
	ALFRED	0.956 (4365/4568)	0.285 (7973/27945)
<i>HERC2</i> (rs916977): Alelo A	HapMap	0.950 (114/120)	0.133 (16/120)
	ALFRED	0.884 (1002/1134)	0.215 (756/3518)
<i>OCA2</i> (rs4778138): Alelo G	HapMap	0.733 (88/120)	0.092 (11/120)
	ALFRED	0.746 (1047/1404)	0.166 (945/5706)
<i>SLC24A5</i> (rs1426654): Alelo G	HapMap	0.987 (223/226)	0.000 (0/116)
	ALFRED	0.707 (2630/3720)	0.011 (49/4271)
<i>SLC45A2</i> (rs16891982): Alelo C	HapMap	1.000 (114/114)	0.017 (2/116)
	ALFRED	0.919 (3478/3786)	0.071 (1840/25961)
<i>TYR</i> (rs1042602): Alelo C	HapMap	1.000 (120/120)	0.571 (129/226)
	ALFRED	0.940 (1757/1870)	0.705 (3544/5026)
<i>TYRP1</i> (rs2733832): Alelo C	HapMap	0.951 (215/226)	0.398 (90/226)
	ALFRED	0.879 (181/206)	0.419 (447/1066)
<i>MC1R</i> (rs8045560): Alelo C	HapMap	0.951 (215/226)	0.465 (105/226)
	ALFRED	0.909 (1225/1348)	0.438 (1624/3706)

FONTE: <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>; <http://alfred.med.yale.edu/alfred/index.asp>.

Em estudos anteriores, foi observada a frequência alélica de cada um dos oito SNPs em populações de indivíduos com características extremamente distintas de acordo com a melanina: população com pele e olhos claros (baixo conteúdo de melanina) e população com pele e olhos escuros (alto conteúdo de melanina). Ainda não está claro quando uma variante do gene relacionada ao pigmento é expressa na pele e na íris ou quando tem expressão tecido-específica. A fim de identificar diferenças nas associações genótipo-fenótipo, o presente estudo utilizou indivíduos com características dos dois extremos, pele clara e olhos escuros.

2- OBJETIVOS

Avaliar indivíduos 'Branca de Neve' (com fenótipo de olho muito escuro e pele muito clara) com um painel de oito SNPs de genes relacionados com a pigmentação humana, e identificar quais destes SNPs poderiam explicar a expressão de cor escura do olho e de cor clara da pele.

CAPÍTULO 2 - ARTIGO CIENTÍFICO

Snow White effect (SW): Dark Eye and Light Skin subjects, according eight SNPs in pigment-related genes.

ABSTRACT

The understanding of gene function in the determination of externally visible traits (EVTs) has several uses in human population evolutionary studies and in forensic investigations. With regards to the latter, a fair amount of effort has been made to discover an easy and efficient model for the prediction of eye and skin color in humans. The obvious advantage of the prediction of such EVTs through the use of DNA is that it can be incorporated as routine procedure in forensic labs and be applied to police investigations. In the present study, we combined the genotypes of eight SNPs in pigmentation-related genes, rs4778138 (*OCA2*; SNP G>A); rs12913832 (*HERC2*; SNP A>G); rs16891982 (*SLC45A2*; SNP C>G); rs8045560 (*MC1R*; SNP C>T); rs1426654 (*SLC24A5*; SNP G>A); rs2733832 (*TYRP1*; SNP C>T); rs1042602 (*TYR*; SNP C>A); rs916977 (*HERC2*; SNP A>G), with multiple analytical approaches. A total of 116 individuals from a South of Brazil Snow White population (Dark Eye and Light Skin) were analyzed to identify the genotype-phenotype relationship of these SNPs according skin or eye color. Three SNPs showed an association with Dark Eye and Skin (DES; from African populations) and five SNPs showed an association with Light Eye and Skin (LES; from European populations). Discriminant Function Analysis (DFA) was performed to obtain the distribution of the individuals among the DES and LES clusters. rs4778138 (*OCA2*), rs12913832 (*HERC2*), and rs916977 (*HERC2*) presented an 82% relationship with the DES cluster, indicating an association with the dark eye phenotype and rs16891982 (*SLC45A2*), rs8045560 (*MC1R*), rs1426654 (*SLC24A5*), rs2733832 (*TYRP1*), and rs1042602 (*TYR*) presented a 90% relationship with the LES cluster, indicating an association with light skin phenotype.

BACKGROUND. The SNP abundance is the main reason of the current great interest in forensics, and the mapping of the human genome has made possible the development of sets of genotypes and haplotypes that can phenotypically characterize a human being [1]. SNP studies may serve to individual discrimination as well as to predict external visible traits (EVT). Among the EVTs, the pigmentation of skin, eyes, and or hair has been a good target for predicting phenotype. Genotype-phenotype association studies with iris and skin color have been focused in detecting SNPs within genes directly involved in the synthesis of pigments [2-14].

Studies has shown the presence of some genetic variations in populations with specific phenotype, for example populations with blue eyes and light skin or brown eyes and dark skin (e.g. european - blue eyes and light skin; african – brown eyes and dark skin) [15-22].

Previously we selected seven genes that are linked to the melanin synthesis and human pigmentation to investigate their significance in skin and eye color phenotypes for forensic purposes [22]. We studied rs4778138 (*OCA2*; SNP G>A); rs12913832 (*HERC2*; SNP A>G); rs16891982 (*SLC45A2*; SNP C>G); rs8045560 (*MC1R*; SNP C>T); rs1426654 (*SLC24A5*; SNP G>A); rs2733832 (*TYRP1*; SNP C>T); rs1042602 (*TYR*; SNP C>A); rs916977 (*HERC2*; SNP A>G) in individuals with Dark Eye and Skin (DES) or Light Eye and Skin (LES) from Southern of Brazil. Different versions of these genes could explain the melanin content in these two populations with diverse phenotypes.

Melanin is gradually produced in melanosomes inside melanocytes. Although the number of melanocytes in different skin colors is essentially constant, the distribution of melanosomes is not so, as darker skins have denser and individually dispersed melanosomes, while lighter skins have less dense melanosomes [23]. In the eyes, pigments are distributed in the epithelium and in the stromal cells of the iris; brown iris has an abundance of melanin while blue iris contains low levels of melanin allowing light transmittance and reflectance which results in a blue shortwave due to the presence of collagen fibers. Variations in both skin and eye color also result from the ratio of eumelanin/pheomelanin [24] but it is still unclear whether a gene is expressed only in the skin or only in the iris.

Previously our group studied the DES and LES populations showing that the eight SNPs were a usefull tool to phenotype prediction [22].

In this paper we genotyped the SNPs in the seven genes above in ‘Snow White’ subjects (i.e. high eye and low skin melanin content) in order to identify if there are differences on genotype-phenotype relationship according skin or eye color.

MATERIAL AND METHODS. *Design, subjects, and approval.* This observational cohort study was conducted with data and DNA collected from 116 selected adult subjects (over 18 years old) enrolled between February 1st, 2014 and September 31st, 2014. Subjects were selected based on their skin/eye phenotype characteristics. A form containing information about gender, age, origin, place of birth and residence was filled out by all individuals. This COLOR-genotyping project was approved by the Research

Ethics Committee of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (CAAE: 23527014.2.0000.5336), and the informed written consent for the study was obtained from all subjects.

Skin Phenotyping. The skin color of each participant was identified using the Fitzpatrick score, ranging from Type 1 to Type 6, where: 1- Highly sensitive skin, always burns, never tans; 2- Very sun-sensitive skin, burns easily, tans minimally; 3- Sun-sensitive skin, sometimes burns, slowly tans to light brown; 4- Minimally sun-sensitive skin, burns minimally, always tans to moderate brown; 5- Sun-insensitive skin, rarely burns, tans well; 6- Sun-insensitive skin, never burns, deeply pigmented. We also measured the skin amount of red (R), green (G), and blue (B) pigments on an inner and hairless portion (below elbow) of the right arm using the ACR-1023 (Instrutherm, São Paulo, Brazil), a battery-portable color analyzer equipment which employs a spectral analysis method to determine the color of the sample. Each R, G, and B values range from zero to 1023, where the minimum value (zero) represents the complete absence of color, and the maximum (1023), its complete presence. In this system, total white has a value of R=1023, G=1023, and B=1023, and total black has a value of R=0, G=0, and B=0. The RGB skin values of each person were measured three times and the average was recorded. The equipment was calibrated before each use by measuring a white plate. Potential subjects that reported having a recent or intense tan were excluded.

Eye Phenotyping. We photographed both eyes using a Canon 40D Camera, Objective Lens Canon 35-80mm, with filter 52mm, open aperture 4 – 5,6 and Lense Extention Rings, ISO 100, with Flash at 5500K (D55 illuminant), and a picture resolution of 3,888 X 2,592 pixels. To take the pictures, the camera was fixed on a tripod stand and placed at a distance of $6\text{cm} \pm 0.5\text{cm}$ from the subject's eye, having its focus locked onto the central area of the iris. The images were taken in a room with standardized artificial light conditions. The participants wearing contact lenses were required to remove them. We measured both eye amounts of R, G, and B pigments by analyzing each photo with the software COLOURS [25]. A triangular-shaped representative area of the iris covering approximately 8.500 pixels was selected in each picture and the R, G, and B values of each pixel were measured on a scale of zero to 255, where the minimum value (zero) represents the complete absence of a given color and the maximum (255) represents its complete presence. To calculate the R value, the software divides the total amount of red pigment present in each pixel of the selected area by the product of 255 times the total amount of pixels in the same area. For example (Figure 1): $409322 / (255 \times 8401) = 0.19$ – as the total amount of red in the selected area is 409322 and the total amount of pixels in the same area is 8401. The same mathematical formula is used to G and B calculations. In this system, total black has a value of R=0, G=0, and B=0, and total white has a value of R=1, G=1, and B=1. The RGB eye values were measured on both eyes and the average was recorded. The primary RGB values were then converted into HSV (hue, saturation, value of brightness) system values using standard formulas. HSV is a cylindrical-coordinate representation of points in an RGB color model. This representation maps the values into a cylinder (color wheel), where: the angle around the central vertical axis corresponds to hue (H) and the distance from the axis corresponds to saturation (S). The height corresponds to a third value (V), the system's representation of the perceived luminance (brightness) in

relation to the saturation. Potential subjects with *Heterochromia iridum* (excessively different colored irises) were excluded from the experiment.

Genotyping. Genomic DNA was extracted with a NucleoSpin® Blood kit (Macherey-Nagel Inc.). Amplification of regions flanking the SNPs were made by multiplex PCR in a volume of 25 µL with 2 to 10 ng genomic DNA, 0.2 µM of each primer (Table 1), and 1X of Qiagen Multiplex PCR Master Mix (© QIAGEN, Invitrogen). The amplification consisted of 95°C for 5 min, followed by 30 cycles of 30s at 94°C, 90s at 57°C, 90s at 72°C, and a final extension for 10 min at 72°C. After the amplification, the enzymatic purification of the PCR product using USB® ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup (Affymetrix®) was carried out according to the user's manual recommendations. SNP analysis was performed by the SNaPshot® Multiplex System ABI Prism (Applied Biosystems®, São Paulo, Brazil), using eight SNaPshot primers (Table 1). Reactions were performed in a final volume of 10 µL, containing 3.0 µL of purified multiplex PCR product, 5.0 µL of SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix, 1.0 µL of pooled SNaPshot primers (each primer at 1 µM final), and 1.0 µL of sterile water. Multiplex single base extensions were carried out for 28 cycles according to the following program: 10 seconds at 96°C, 5 seconds at 50°C, and 30 seconds at 60°C. SNaPshot products were then treated at 37°C for 1 hour with 0.8 µL of shrimp alkaline phosphatase (1.0 U/µl) and 1.2 µL of 10X SAP buffer reaction, added directly to 10 µL of the SNaPshot product. After heat inactivation of shrimp alkaline phosphatase for 15 minutes at 75°C, 1µL of the labeled products were mixed with 9.5 µL of HiDi formamide and 0.5 µL of Genescan-120 LIZ size standard. They were then separated using an ABIPRISM® 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) with POP-4 matrix and with respective run parameters: injection voltage of 1.2 Kv, injection time of 23s, run voltage of 15Kv and run time of 1200s, in a capillary of 36cm. The analysis was performed using the GeneMapper ID software version 3.2.1 (Applied Biosystems). In order to confirm the genotyping system, we performed a sequence analysis in the ABIPRISM® 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) using the same designed primers in 10% of our sample.

Cluster analysis using STRUCTURE Software: We used the eight SNPs and the STRUCTURE software to estimate clusters among subjects. The STRUCTURE Software v2.3.4 [26] analyses the data plotting probabilistically the individuals in K populations by characterization of the allele frequencies set in each locus. The individuals may be assigned in one, two or more populations if their genotype shows an admixed pattern. Our data file was composed by: row of makers (SNP and gene data), column of labels of each individual, column of population data (1 for SW; 2 for LES and 3 for DES), and the genotype data. The ADMIXTURE MODEL and CORRELATED ALLELE FREQUENCIES MODEL were chosen because the admixture between populations is a common characteristic of real genetic data, since subjects may have recent ancestors in more than one population [27]. To estimate the K value, the data was analyzed with twenty replicates for $K=1$ to $K=10$, all runs were performed with 10,000 burn-in period and 100,000 Markov Chain Monte Carlo (MCMC) repeats after burn-in, ADMIXTURE MODEL, CORRELATED ALLELE. The K values were estimated using the $\ln\text{Pr}(X|K)$ values for each simulation. With these values, it is possible to calculate the probability for each K and estimate the best K [26]. The method used to estimate the value of K calculates

the delta K and then selects the appropriate K value. The values were obtained using the website and program Structure Harvester (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester>) [28, 29]. Graphics were constructed using *Clumpp* [30] and *Distruct* [31] software.

Statistical analysis: To calculate the percentage rate to belong to a determinate cluster, we made two distinct discriminant factorial analysis (DFA) using DES and LES genotype data, for the eye percentage we used the genotype from rs4778138 (*OCA2*), rs12913832 (*HERC2*), and rs916977 (*HERC2*) and for the skin percentage we used the genotype from rs16891982 (*SLC45A2*), rs8045560 (*MC1R*), rs1426654 (*SLC24A5*), rs2733832 (*TYRP1*), and rs1042602 (*TYR*). We plotted the SW genotype data from the two groups of SNPs, one by one, to see where each sample would be in the graphic. With these analyses we were able to measure the percentage for each genotype for each SNP and thus be able to calculate the final percentage rate for each characteristic (Table 3).

RESULTS & DISCUSSION. It is still unclear whether a gene is expressed only in the skin or only in the iris, although genetic markers have been informative to predict phenotypes in human pigmentation; this field of study still requires many efforts to be really applicable.

Human skin and eye pigmentations are continuous traits and there is not a worldwide model to determine the limits of each mate category. However, in phenotype DNA prediction (PDP) studies, the use of categorized information about these continuous traits is inevitable. Thus, more accurate and more detailed pigmentation determinations may guarantee better conclusions in these PDP studies [14, 32].

We worked with 116 SW subjects that carry the phenotype from two extremes of the continuous skin and eye color distribution, black eye (from populations with Dark Eye and Skin) and light skin (from populations with Light Eye and Skin) and using reproducible methods to quantify the skin-eye pigmentation, we have obtained well-characterized information on both skin (using a surface **color analyzer**) and eye color (using digital photographs and a specially designed color quantifier software) data of these subjects is presented in Table 1. We have not analyzed the hair color because the melanin content in the hair is more strongly changed by intrinsic or extrinsic factors and the hair color is also age-dependent [33]. These changes, added to the occurrence of baldness, make hair a not very useful trait to be useful for practical forensic DNA phenotyping applications

The genotype data, from previous studies, from DES and LES from South of Brazil, considering the eight SNPs, shows that there are two distinct groups, either by discriminant function analysis (DFA) or by the structuring analysis [22].

Entering the SW individual's data in DFA and structuring analysis, they tend to group to an intermediate cluster (Figure 2-A and 2-B respectively), this may occur because they have characteristics from DES group (dark eye) and characteristics from the LES group (light skin). Thus, was possible to see that the conjunct analysis of the eight SNPs was informative to the DES and LES groups, however was not informative to identify SW individuals.

Table 2 presents the genotype frequencies of the eight selected SNPs: in African and European subjects (obtained from the population data available on the HAPMAP and ALFRED databases), DES and LES individuals from South of Brazil, and in Snow White individuals. In order to identify if there are association on genotype-phenotype relationship according skin or eye color an association Chi-square test was performed comparing SW genotype frequencies with genotype distribution in Africans and Europeans populations (HapMap/ALFRED) and in DES and LES samples from South of Brazil. The analysis of Table 2 allows identifying the approximation between the genotype frequencies of the SW subjects with DES or LES individuals, depending of the SNP.

In order to recognize the association of the genotype frequencies from SW with DES and LES individuals a new discriminant function analysis (DFA) was performed. For the Dark Eye phenotype we used rs4778138 (*OCA2*), rs12913832 (*HERC2*), and rs916977 (*HERC2*) genotype data from DES, LES and SW populations, the graphic shows that the SW group was inside the DES group (Figure 3-A), thus indicating the genotype similarity between DES and SW for these SNPs, showing that the expression of the dark color for the eye observed in the SW subjects can be explain by the rs4778138 (*OCA2*), rs12913832 (*HERC2*), and rs916977 (*HERC2*) variants.

For the Light Skin phenotype we used rs16891982 (*SLC45A2*), rs8045560 (*MC1R*), rs1426654 (*SLC24A5*), rs2733832 (*TYRP1*), and rs1042602 (*TYR*) genotype data from DES, LES and SW populations, the graph shows that the SW group was inside the LES group (Figure 3-B) this indicates the similarity among the LES group and the SW group for these SNPs, showing that the expression of the light color for the skin observed in the SW subjects can be explain by the rs16891982 (*SLC45A2*), rs8045560 (*MC1R*), rs1426654 (*SLC24A5*), rs2733832 (*TYRP1*), and rs1042602 (*TYR*) variants. All data analysis was performed using PAST 3.05 (<http://folk.uio.no/ohammer/past>).

The group of SNPs more associated with eye phenotype shown an 82% rate to belong the DES group against 18% rate to belong the LES group, this indicates that these SNPs would explain the dark eye phenotype on the Snow White population. The group of SNPs more associated with skin phenotype shown a 90% rate to belong the LES group against 10% rate to belong the DES group, this indicates that these SNPs would explain the light skin phenotype on the Snow White population.

CONCLUSION. These three SNPs, rs4778138 (*OCA2*), rs12913832 (*HERC2*), and rs916977 (*HERC2*), can explain the dark color from SW eyes.

These five SNPs, rs16891982 (*SLC45A2*), rs8045560 (*MC1R*), rs1426654 (*SLC24A5*), rs2733832 (*TYRP1*), and rs1042602 (*TYR*), can explain the light color from SW skin.

Is important highlight that the present study don't objective to investigate the power of prediction of this SNP panel, but evaluate separately which SNP can explain each phenotype.

ACKNOWLEDGMENTS. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

REFERENCES

1. Stacey GB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, Defelice M, Lochner A, Faggart M, Liu-Cordero SN, Rotimi C, Adeyemo A, Cooper R, Ward R, Lander ES, Daly MJ, Altshuler D (2002) The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296:2225–2229
2. Sulem P, Gudbjartsson DF, Stacey SN, Helgason A, Rafnar T, Magnusson KP, Manolescu A, Karason A, Palsson A, Thorleifsson G, Jakobsdottir M, Steinberg S, Pálsson S, Jonasson F, Sigurgeirsson B, Thorisdottir K, Ragnarsson R, Benediktsdottir KR, Aben KK, Kiemenev LA, Olafsson JH, Gulcher J, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K (2007) Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans, *Nat Genet* 39:443–4452
3. Kayser M, Schneider P (2009) DNA-based prediction of human externally visible characteristics in forensics: Motivations, scientific challenges, and ethical considerations. *Forensic Science International* 3:154–161
4. Sturm RA (2009) Molecular genetics of human pigmentation diversity. *Hum Mol Genet Review Issue* 18:R9-R17
5. Liu F, van Duijn K, Vingerling JR, Hofman A, Uitterlinden AG, Janssens ACJW, Kayser M (2009) Eye color and the prediction of complex phenotypes from genotypes. *Curr. Biol.* 19:R192–R193
6. Mengel-From J, Børsting C, Sanchez JJ, Eiberg H, Morling N (2010) Human eye colour and HERC2, OCA2 and MATP. *Forensic Sci Int Genet* 4(5):323-328. doi:10.1016/j.fsigen.2009.12.004
7. Walsh S, Lidenbrgh A, Zuniga SB, Sijen T, Knijff P, Kayser M, Ballantyne KN (2011a) Developmental validation of the IrisPlex system: Determination of blue and brown iris colour for forensic intelligence. *Forensic Sci Int Genet* doi: 10.1016/j.fsigen.2010.09.008
8. Walsh S, Liu F, Ballantyne KN, van Oven M, Lao O, Kayser M (2011b) IrisPlex: a sensitive DNA tool for accurate prediction of blue and brown eye colour in the absence of ancestry information. *Forensic Sci Int Genet* doi:10.1016/j.fsigen.2010.02.004
9. Spichenok O, Budimlija ZM, Mitchell AA, Jenny A, Kovacevic L, Marjanovic D, Caragine T, Prinz M, Wurmbach E. (2011) Prediction of eye and skin color in diverse populations using seven SNPs. *Forensic Sci Int Genet* doi: 10.1016/j.fsigen.2010.10.005
10. Pneuman A, Budimlija ZM, Caragine T, Prinz M, Wurmbach E (2012) Verification of eye and skin color predictors in various populations. *Legal Medicine* 14(2):78-83. doi:10.1016/j.legalmed.2011.12.005
11. Walsh S, Liu F, Wollstein A, Kovatsi L, Ralf A, Kosiniak-Kamysz A, Branicki W, Kayser M (2013) The HirisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA. *Forensic Sci Int Genet* 7:98-115
12. Ruiz Y, Phillips C, Gomez-Tato A, Alvarez-Dios J, Casares de Cal M, Cruz R, Maroñas O, Söchtig J, Fondevila M, Rodriguez-Cid MJ, Carracedo A, Lareu MV (2013) Further development of forensic eye color predictive tests. *Forensic Sci Int Genet* 7(1):28-40. doi: 10.1016/j.fsigen.2012.05.009

13. Allwood JS, Harbison S (2013) SNP model development for the prediction of eye colour in New Zealand. *Forensic Sci Int Genet* 7(4):444-452
14. Andersen JD, Johansen P, Harder S, Christoffersen SR, Delgado MC, Henriksen ST, Nielsen MM, Sørensen E, Ullum H, Hansen T, Dahl AL, Paulsen RR, Børsting C, Morling N (2013) Genetic analyses of the human eye colours using a novel objective method for eye colour classification. *Forensic Sci Int Genet* 7(5):508-515
15. Liu F, Wollstein A, Hysi PG, Ankra-Badu GA, Spector TD, et al. (2010) Digital Quantification of Human Eye Color Highlights Genetic Association of Three New Loci. *PLoS Genet* 6(5): e1000934. doi:10.1371/journal.pgen.1000934
16. Eiberg H., et al., Blue eye color in humans may be caused by a perfectly associated founder mutation in a regulatory element located within the *HERC2* gene inhibiting *OCA2* expression. (2008) *Hum. Genet.* 123 (2) 177–187
17. Sturm RA, Duffy DL, Zhao ZZ, Leite FPN, Stark MS, Hayward NK, Martin NG, Montgomery GW (2008) A single SNP in an evolutionary conserved region within intron 86 of the *HERC2* gene determines human blue-brown eye color. *The American Journal of Human Genetics* 82:424-431
18. R. Iida, et al., (2009) Genotyping of five single nucleotide polymorphisms in the *OCA2* and *HERC2* genes associated with blue-brown eye color in the Japanese population, *Cell Biochem. Funct.* 27 (5) 323–327.
19. I. Yuasa, et al., (2007) Distribution of two Asian-related coding SNPs in the *MC1R* and *OCA2* genes, *Biochem. Genet.* 45 (7–8) 535–542.
20. Soejima M, Koda Y (2007) Population differences of two coding SNPs in pigmentation-related genes *SLC24A5* and *SLC24A5*, *Int J Legal Med* 121:36-39
21. Vierkötter A, Krämer U, Sugiri D, Morita A, Yamamoto A, Kaneko N, Matsui M, Krutmann J (2012) Development of lentigines in German and Japanese women correlates with variants in the *SLC24A5*. *Gene Journal of Investigative Dermatology* 132:733–736
22. Rodenbusch R, (2014), Analysis of eight SNPs in pigmentation-related genes in Southern Brazilian subjects with simultaneous high or low skin and eye melanin content. Doctoral thesis, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
23. Sturm RA, Duffy DL (2012) Human pigmentation genes under environmental selection. *Genome Biology* 13:248. doi:10.1186/gb-2012-13-9-248
24. Sturm RA, Larsson M (2009) Genetics of human iris colour and patterns. *Pigment Cell Melanoma Res* 22:544-562
25. Otaka I, Kumagai K, Inagaki Y, Shimoyama M, Saegusa K, Hara T. (2002) Simple and inexpensive software designed for the evaluation of color. *Am J Ophthalmol* 133(1):140-142
26. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959.

27. Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure: Extensions to linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164:1567–1587.
28. Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611–2620.
29. Earl DA, Vonholdt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4(2): 359-361.
30. Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23:1801-1806.
31. Rosenberg NA (2004) Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4:137-138.
32. Liu F, Wen B, Kayser M. (2013) Colorful DNA polymorphisms in humans. *Semin Cell Dev Biol* 24(6-7):562-575. doi:10.1016/j.semcdb.2013.03.013
33. Rees JL (2003) Genetics of hair and skin color. *Annu Rev Genet* 37:67-90

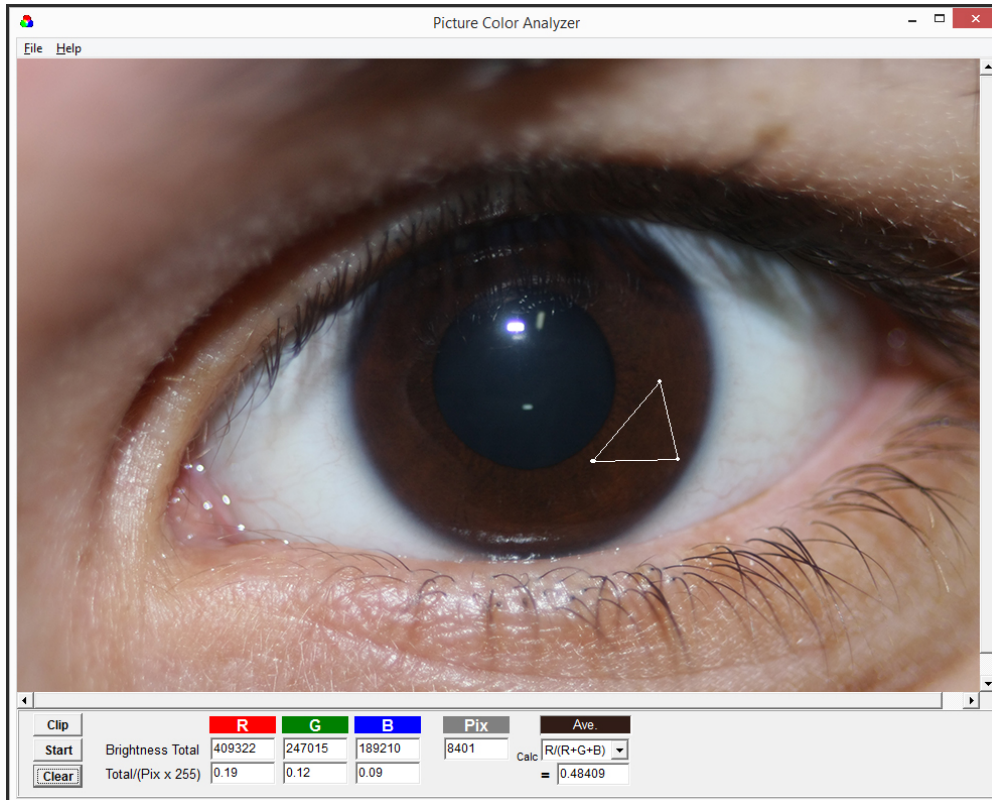


FIGURE 1- COLOURS software (Otaka *et al.*, 2002) layout. A representative triangular area of the iris covering approximately 8500 pixels was selected in each picture, and the R, G, and B values of each pixel was measured in a range scale from 0 (zero) to 255, where the minimum value (zero) is total absence of color, and the maximum value (255) is total presence. To calculate the R value, COLOURS software use the sum of Red in each pixel of the selected area divided by 255 times the total of pixels in the selected area. For example: total of Red in the selected area (409322) / 255 x total of pixels in the area (8401) = 409322 / (255 x 8401) = 0.19. The same mathematical formula is used to G and B calculations.

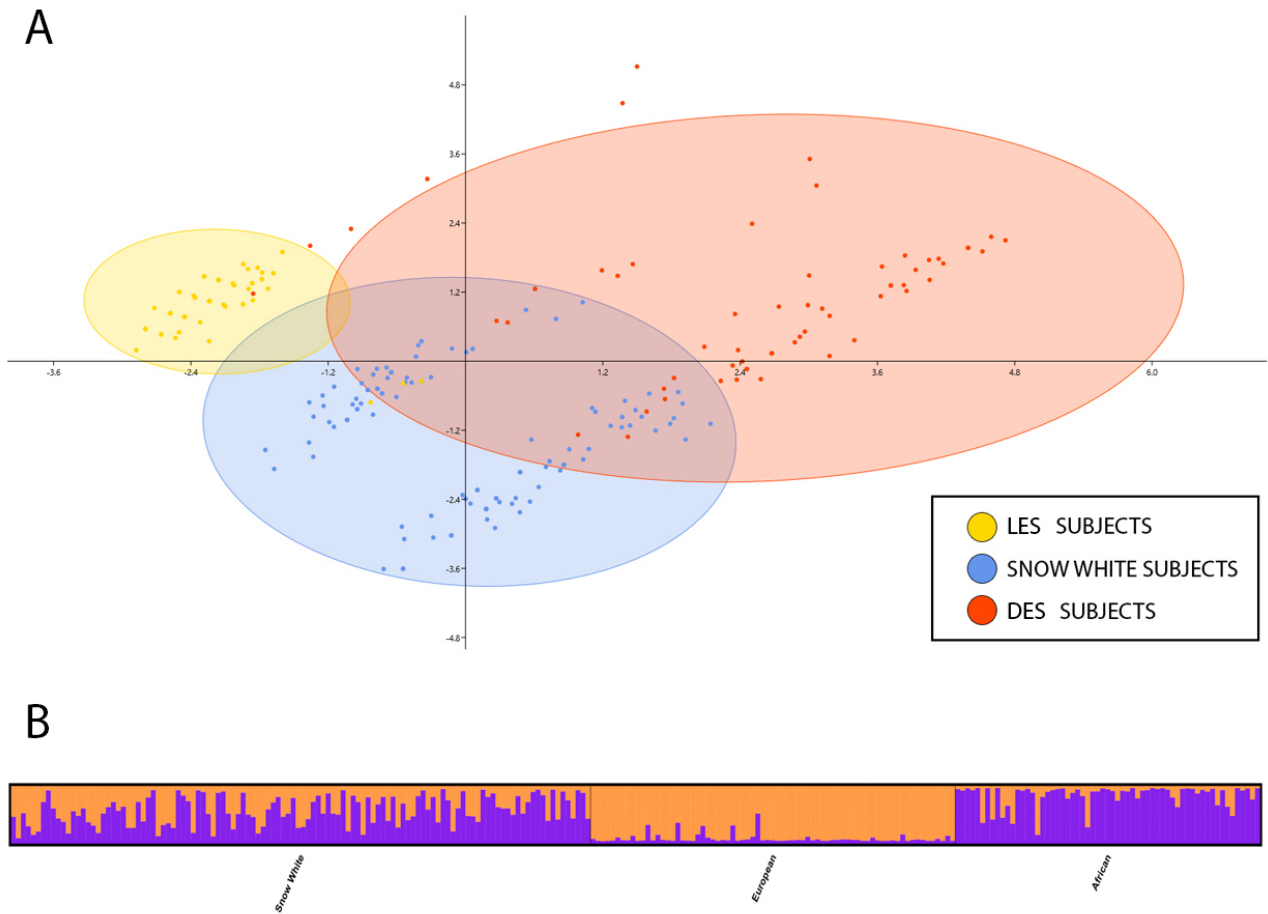


FIGURE 2 – (A) Discriminant Function Analysis (DFA) comparison of genotype from LES and DES subjects from South of Brazil and the Snow White population. **(B)** Analysis of genotype structure distribution in Snow White, European (LES from South of Brazil) and African (DES from South of Brazil) $K=2$ clusters using *Structure Software*.

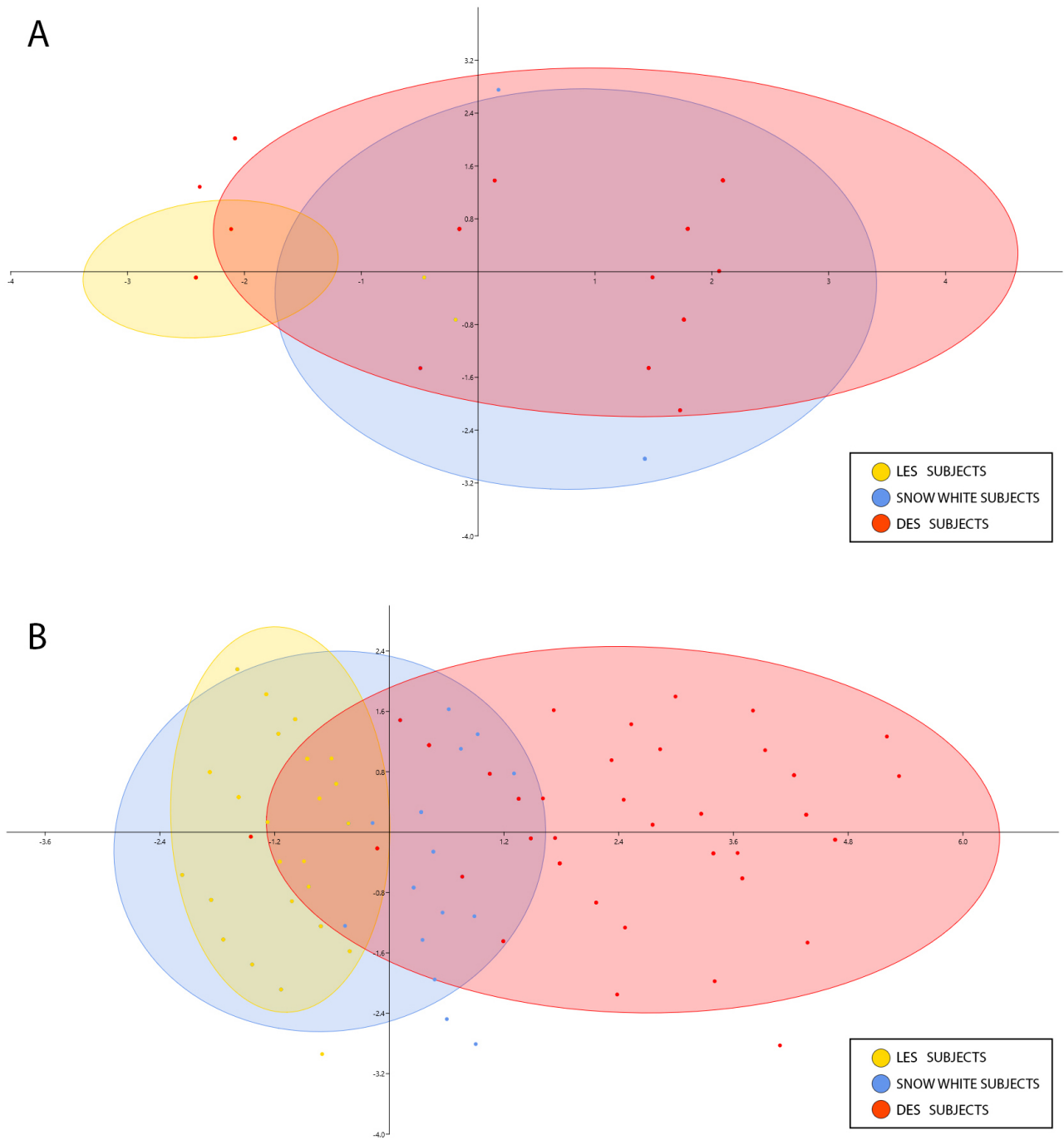


FIGURE 3- (A) Discriminant Function Analysis (DFA) comparison of genotype from LES and DES subjects from South of Brazil and the Snow White population using the set of 3 SNPs more associated with dark eye phenotype: OCA2 rs4778138, HERC2 rs12913832, and HERC2 rs12913832 **(B)** Discriminant Function Analysis (DFA) comparison of genotype from LES and DES subjects from South of Brazil and the Snow White population using the set of 5 five SNPs more associated with light skin phenotype: SLC45A2 rs16891982, MC1R rs8045560, SLC24A5 rs1426654, TYRP1 rs2733832, and TYR rs1042602.

TABLE 1- Phenotype data of 116 Snow White previously selected subjects with high melanin and low skin melanin content.

Snow White		
TOTAL	N	116
SEX	MALE [N(%)]	25(21,55)
	FEMALE [N(%)]	91(78,45)
AGE	YEARS [MEAN (SD)]	26(7.26)
SKIN TYPE*	TYPE 1 [N(%)]	116(100)
SKIN COLOR	RED [MEAN(SD)]	261.6(44.35)
	GREEN [MEAN(SD)]	199.6(40.04)
	BLUE [MEAN(SD)]	174.3(36.45)
EYE TYPE	DARK BROWN/BLACK [N(%)]	116(100)
EYE COLOR	RED [MEAN(SD)]	0.229(0.073)
	GREEN [MEAN(SD)]	0.126(0.044)
	BLUE [MEAN(SD)]	0.166(0.056)
AUTDODECLARED ORIGIN	EUROPEAN (%)	46(39,65)
	AFRICAN(%)	0(0)
	BRAZILIAN(%)	36(31,03)
	MIXED(%)	33(28,45)
	UNKNOWN(%)	1(0,86)

* See Type definitions on section 3 (Material and Methods).

TABLE 2- Genotype frequencies of each selected SNP based HAPMAP and ALFRED; LES and DES populations from South of Brazil; and Snow White populations.

RS (GENE, SNP)		AFR ¹	EUR ²	DES-RS ³	LES-RS ⁴	SW ⁵
rs4778138 (OCA2; SNP G>A)	HH	0.55	0.03	0.36	0.00	0.15
	HL	0.38	0.27	0.49	0.15	0.54
	LL	0.06	0.70	0.15	0.85	0.31
	N	762	2913	61	73	116
	P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	
rs12913832 (HERC2; SNP A>G)	HH	0.92	0.08	0.75	0.00	0.53
	HL	0.08	0.40	0.15	0.04	0.47
	LL	0.00	0.52	0.10	0.96	0.00
	N	2344	14143	61	73	116
	P	<0.001	<0.001	0.262	<0.001	
rs16891982 (SLC45A2; SNP C>G)	HH	0.78	0.00	0.05	0.00	0.00
	HL	0.21	0.13	0.46	0.04	0.09
	LL	0.01	0.87	0.49	0.96	0.91
	N	2038	13797	61	73	116
	P	<0.001	0.4051	<0.001	0.120	
rs8045560 (MC1R; SNP C>T)	HH	0.84	0.19	0.56	0.15	0.19
	HL	0.15	0.49	0.38	0.48	0.59
	LL	0.01	0.32	0.06	0.37	0.22
	N	787	1966	61	73	116
	P	<0.001	0.4778	<0.001	0.102	
rs1426654 (SLC24A5; SNP G>A)	HH	0.52	0.00	0.46	0.00	0.00
	HL	0.40	0.02	0.43	0.00	0.20
	LL	0.08	0.98	0.11	1.00	0.80
	N	1992	2251	61	73	116
	P	<0.001	<0.001	<0.001	0.178*	
rs2733832 (TYRP1; SNP C>T)	HH	0.84	0.17	0.58	0.22	0.25
	HL	0.15	0.49	0.39	0.52	0.55
	LL	0.01	0.34	0.03	0.26	0.20
	N	216	646	61	73	116
	P	<0.001	0.0954	<0.001	0.650	
rs1042602 (TYR; SNP C>A)	HH	0.89	0.49	0.77	0.37	0.35
	HL	0.10	0.42	0.20	0.51	0.49
	LL	0.01	0.09	0.03	0.12	0.16
	N	1048	2573	61	73	116
	P	<0.001	0.0412	<0.001	0.845	
rs916977 (HERC2; SNP A>G)	HH	0.79	0.04	0.49	0.00	0.24
	HL	0.20	0.34	0.41	0.05	0.47
	LL	0.01	0.62	0.10	0.95	0.29
	N	627	1819	61	73	116
	P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	

1- Populations of Africans available in HAPMAP and ALFRED projects. 2- Populations of Europeans available in HAPMAP and ALFRED projects. 3- DES (Dark Eye and Skin) Population from South of Brazil 4- LES (Light Eye and Skin) Population from South of Brazil 5- Snow White (Dark Eye and Light Skin) Population. We called as 'allele H' for the allele strongly associated with people with DES (from African populations), and as 'allele L' for the allele strongly associated with people with LES (from European populations).

* The association chi-square test was calculated with the allele data.

TABLE 3- Discriminant Function Analysis (DFA) with set of SNPs more associated with each group. Each Snow White subject was plotted in a DES-LES DFA to obtain the percentage rate to belong to each cluster.

	% To belong to DES group	% To belong to LES group
Genotypes for Eye SNPs¹	82%	18%
Genotypes for Skin SNPs²	10%	90%

1- rs4778138 (*OCA2*), rs12913832 (*HERC2*), and rs916977 (*HERC2*).

2- rs16891982 (*SLC45A2*), rs8045560 (*MC1R*), rs1426654 (*SLC24A5*), rs2733832 (*TYRP1*), and rs1042602 (*TYR*).

CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A predição de fenótipo a partir do genótipo é uma área em grande expansão. O estudo de indivíduos que possuem fenótipo de populações distintas, como por exemplo a população Branca de Neve, que possuem olhos muito escuros e pele muito clara, é importante para validar a eficácia da aplicação de genes relacionados com a pigmentação humana.

A produção de melanina que ocorre na pele e no estroma da íris segue as mesmas vias sintéticas, porém ainda é desconhecido quais são os fatores tecido específicos envolvidos.

Ao contrário do que ocorre na pele, onde a melanina é continuamente produzida e secretada, os melanossomos da íris não são secretados dos melanócitos, mas sim retidos e acumulados no citoplasma destes. As variações na coloração observadas são resultado das diferentes quantidades e tipos de melanossomos presentes nos melanócitos, sendo a proporção de eumelanina/feomelanina geralmente maior em colorações mais escuras, e colorações mais claras apresentando maior concentração do pigmento feomelanina.

Este trabalho é o primeiro a diferenciar as variantes genéticas que influenciam as vias de síntese de melanina na pele e no olho.

Os resultados obtidos no presente estudo foram utilizados em conjunto com os dados de outros estudos realizados anteriormente pelo laboratório, tendo assim um maior número de amostragens, com o objetivo de analisar indivíduos com Alto Teor de Melanina, Baixo Teor de Melanina e Branca de Neve, sendo possível a publicação de um estudo mais detalhado e com dados mais completos. Artigo publicado no Adendo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. Napolitano, C. Costantini, O. Crescenzi, G. Prota. Characterization of 1,4- benzothiazine intermediates in the oxidative conversion of 5-S-cysteinyl-dopa to pheomelanins, *Tetrahedron Lett* 35 (1994) 6365–6368.
- A. Napolitano, P. Di Donato, G. Prota, E.J. Land. Transient quinonimines and 1,4-benzothiazines of pheomelanogenesis: new pulse radiolytic and spectrophotometric evidence, *Free Radic Biol Med.* 27 (1999) 521–528.
- A. Napolitano, P. Di Donato, G. Prota. New regulatory mechanisms in the biosynthesis of pheomelanins: rearrangement vs. redox exchange reaction routes of a transient 2H-1,4-benzothiazine-o-quinonimine intermediate, *Biochim Biophys Acta.* 1475 (2000) 47–54.
- A. Palumbo, M. d'Ischia, G. Prota. Tyrosinase-promoted oxidation of 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid to melanin. Isolation and characterization of oligomer intermediates, *Tetrahedron*, 43 (1987) 4203–4206.
- A. Palumbo, F. Solano, G. Misuraca, P. Aroca, J.C. Garcia-Borron, J.A. Lozano, G. Prota. Comparative action of dopachrome tautomerase and metal ions on the rearrangement of dopachrome, *Biochim Biophys Acta.* 1115 (1991) 1–5.
- A. Slominski, D. J. Tobin, S. Shibahara, J. Wortsman. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *American Physiological Reviews* 84(2004) 1155–1228.
- A. Van Daal, A. The genetic basis of human pigmentation, *Forensic Science International* 1(2008). 541–543.
- A. Vierkötter, U. Krämer, D. Sugiri, A. Morita, A. Yamamoto, N. Kaneko, M. Matsui, J. Krutmann. Development of lentigines in german and japanese women correlates with variants in the *SLC24A5*, *Gene Journal of Investigative Dermatology* 132 (2012) 733–736.
- C.L. Wilkerson, N.A. Syed, M.R. Fisher, N.L. Robinson, H.L. Wallow, D.M. Albert. Melanocytes and iris color. Light microscopic findings, *Archives of Ophthalmology* 114(1996)437–442.
- C.C.S.d Cerqueira, T. Hünemeier, J. Gomez-Valde's, V. Ramallo, C.D. Volasko-Krause, A.A.L. Barbosa, P. Vargas-Pinilla, R.C. Dornelles, D. Longo, F. Rothhammer, G. Bedoya, S. Canizales-Quinteros, V. Acuna-Alonzo, C. Gallo, G. Poletti, R. González-Jose, F.M. Salzano, S.M. Callegari-Jacques, L. Schuler-Faccini, A. Ruiz-Linares, M.C. Bortolini for CANDELA (Consortium for the Analysis of the Diversity and Evolution of Latin America). Implications of the Admixture Process in Skin Color, *Molecular Assessment.* (2014) *PLoS ONE* 9(5): e96886. doi:10.1371/journal.pone.0096886
- E. Giardina, A. Spinella, G. Novelli. Past, present and future of forensic DNA typing, *Nanomedicine* 6 (2011) 257–270.
- E.E. Kenny, N.J. Timpson, M.Sikora, M.C. Yee, A. Moreno-Estrada, C. Eng, S. Huntsman, E.G. Burchard, M. Stoneking, C.D. Bustamante, S. Myles. Melanesian blond hair is caused by an amino acid change in *TYRP1*, *Science* 336 (2012) 554. doi: 10.1126/science.1217849

- E.J. Land, S. Ito, K. Wakamatsu, P.A. Riley. Rate constants for the first two chemical steps of Eumelanogenesis, *Pigment Cell Res.* 16 (2003) 487–493.
- E.J. Parra. Human pigmentation variation: Evolution, genetic basis, and implications for public health, *Year book of physical anthropology.* 50 (2007) 85-105.
- F. Liu, K. van Duijn, J.R. Vingerling, A. Hofman, A.G. Uitterlinden, A.C.J.W. Janssens, M. Kayser. Eye color and the prediction of complex phenotypes from genotypes, *Curr. Biol.* 19 (2009) R192–R193.
- F. Liu, B. Wenb, M. Kayser. Colorful DNA polymorphisms in humans, *Semin Cell Dev Biol* (2013).
- G.B. Stacey, S.F. Schaffner, H. Nguyen, J.M. Moore, J. Roy, B. Blumenstiel, J. Higgins, M. Defelice, A. Lochner, M. Faggart, S.N. Liu-Cordero, C. Rotimi, A. Adeyemo, R. Cooper, R. Ward, E.S. Lander, M.J. Daly, D. Altshuler. The structure of haplotype blocks in the human genome, *Science* 296 (2002) 2225–2229.
- G. Dimisianos, I. Stefanaki, V. Nicolaou, V. Sypsa, C. Antoniou, M. Poulou, O. Papadopoulos, H. Gogas, E. Kanavakis, E. Nicolaidou, A. D. Katsambas, A. J. Stratigos. A study of a single variant allele (rs1426654) of the pigmentation-related gene SLC24A5 in Greek subjects, *Experimental Dermatology* 18 (2009)175–7.
- G. E Costin, V. J Hearing. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress, *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21 (2007) 976-994.
- G. Greco, K. Wakamatsu, L. Panzella, S. Ito, A. Napolitano, M. D’Ischia. Isomeric cysteinyl dopas provide a (photo)degradable bulk component and a robust structural element in red human hair pheomelanin, *Pigment Cell Melanoma Res.* 22 (2009) 319–327.
- G. Tully. Genotype versus phenotype: Human pigmentation, *Forensic Sci Int. Genet.* 1 (2007) 100-104.
- H. Ho, R. Kapadia, S. Al-Tahan, S.; et al. WIPI1 Coordinates Melanogenic Gene Transcription and Melanosome Formation via TORC1 Inhibition, *The Journal of Biological Chemistry* 286, n. 14. (2011) 12509-12523.
- H.L. Norton, R.A Kittles, E. Parra, P. Mckeigue, X. Mao, K. Cheng, V. A. Canfield, D.G Bradley, B. Mceovoy, M. Shriver. Genetic evidence for the convergent evolution of light skin in Europeans and East Asian, *Mol Biol Evol* 24(2007) 710-22.
- H. Pulker, M.V. Lareu, C. Phillips, A. Carracedo. Finding genes that underlie physical traits of forensic interest using genetic tools, *Forensic Sci Int Genet.* 1 (2007) 100-104.
- INTERNATIONAL FEDERATION OF PIGMENT CELL SOCIETIES – IFPCS 2009: Disponível em: <http://www.espcr.org/micemut/> - Acessado em abril de 2013.
- J. Berson, D. C. Harper, D. Tenza, G. Raposo, M.S. Marks. Pmel17 initiates premelanosome morphogenesis within multivesicular bodies, *Molecular Biology of the cell* 12(2001) 3451-3464.
- J. Graf, R. Hodgson, A.Van Daal. Single nucleotide polymorphisms in the *MATP* gene are associated with normal human pigmentation variation, *Hum. Mutat.* 25 (2005) 278-284.

- J. Graf, J. Voisey, I. Hughes, A. Van Daal. Promoter polymorphisms in the MATP (*SLC24A5*) gene are associated with normal skin color variation, *Hum. Mutat.* 28 (2007) 710-717.
- J.L. Rees. The genetics of Sun sensitivity in humans, *Am. J. Hum. Genet.* 75 (2004) 739-751.
- J.S. Allwood, S.A. Harbison. SNP model development for the prediction of eye colour in New Zealand, *Forensic Science International: Genetics* 7 (2013) 444–452.
- J. Voisey, M.C. Gomez-Cabrera, D.J. Smit, J.H. Leonard, R.A. Sturm, A. van Daal. A polymorphism in the agouti signalling protein (*ASIP*) is associated with decreased levels of mRNA *Pigment Cell Res.* 19 (2006) 226–231.
- J.Y. Lin, D.E. Fisher. Melanocyte biology and skin pigmentation, *Nature* 445 (2007) 843-850.
- K. Makova, H. Norton. Worldwide polymorphism at the *MC1R* locus and normal pigmentation variation in humans, *Peptides* 26 (2005) 1901-1908.
- K. Nakayama, A. Soemantri, F.J. Bumbein Dashnyam, R. Ohtsuka, P. Duanchang, M. N. Isa, W. Settheetham-Ishida, S. Harihara, T. Ishida. Identification of novel functional variants of the melanocortin 1 receptor gene originated from asians, *Human Genet* 119(2006) 322-30.
- K. Wakamatsu, K. Ohtara, S. Ito. Chemical analysis of late stages of pheomelanogenesis: conversion of dihydrobenzothiazine to a benzothiazole structure, *Pigment Cell Melanoma Res.* 22 (2009) 474–486.
- K. Yoshida, K. Yayama, A. Hatanaka, K. Tamaki. Efficacy of extended kinship analyses utilizing commercial STR kit in establishing personal identification, *Leg. Med.* 13 (2011) 12–15.
- L.D.G. Kobachuk. Estudo de frequências alélicas de dez locos STRs do cromossomo X na população do estado do Paraná e sua contribuição na identificação humana, (2012).
- L. Yun, Y. Gu, H. Rajeevan, K.K. Kidd. Application of six IrisPlex SNPs and comparison of two eye color prediction systems in diverse Eurasia populations, *Int J Legal Med* DOI 10.1007/s00414-013-0953-1
- M.A. Jobling, P. Gill. Encoded evidence: DNA in forensic analysis, *Nature Rev. Genet.* 5 (2004) 739–751.
- M. Brenner, M. Berking. Grundlagen der Hautpigmentierung: Biochemie und regulation der melaninsynthese, *Der Hautarzt* 61(2010) 554-560.
- M. Chaki, M. Sengupta, M. Mondal, A. Bhattacharya, S. Mallick, R. Bhadra, K. Ray. Molecular and functional studies of tyrosinase variants among indian oculocutaneous albinism type 1, *Patients Journal of Investigative Dermatology* 131 (2011) 260–262.
- M. Kayser, P. Schneider. DNA-based prediction of human externally visible characteristics in forensics: Motivations, scientific challenges, and ethical considerations, *Forensic Science International* 3(2009)154–161.
- M. Kayser, P. Knijff. Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology, *Nature Reviews* 12 (2011) 179-192.

- M.P. Donnelly, P. Paschou, E. Grigorenko, D. Gurwitz, C. Barta, R.B. Lu, O.V. Zhukova, J.J. Kim, M. Siniscalco, M. New, H. Li, S.L.B. Kajuna, V.G. Manolopoulos, W.C. Speed, A.J. Pakstis, J.R. Kidd, K.K. Kidd. A global view of the *OCA2-HERC2* region and pigmentation, *Hum Genet* 131 (2012) 683-696.
- M.R. Gerstenblith, A.M. Goldstein, M.C. Fargnoli, K. Peris, M.T. Landi. Comprehensive evaluation of allele frequency differences of MC1R variants across populations, *Human Mutat* 28(2007) 495-505.
- M. Soejima, Y. Koda. Population differences of two coding SNPs in pigmentation-related genes *SLC24A5* and *SLC24A5*, *Int J Legal Med* 121 (2007) 36-39.
- M. Visser, M. Kayser, R.J. Palstra. *HERC2* rs12913832 modulates human pigmentation by attenuating chromatin-loop formation between a long-range enhancer and the *OCA2* promoter *Genome Res.* 22 (2012) 446-455.
- N. Jablonski, G. Chaplin. The evolution of human skin coloration, *Journal of Human Evolution*, v. 39(2000) 57-106.
- N. Jablonski. The Evolution of Human Skin and Skin Color, *Annual Review of Anthropology* v. 33 (2004) 585–623.
- O’Rahilly, S. Human genetics illuminates the path to metabolic disease, *Nature* 462(2009) 307-14.
- P. Sulem, D.F. Gudbjartsson, S.N. Stacey, A. Helgason, T. Rafnar, K.P. Magnusson, A. Manolescu, A. Karason, A. Palsson, G. Thorleifsson, M. Jakobsdottir, S. Steinberg, S. Palsson, F. Jonasson, B. Sigurgeirsson, K. Thorisdottir, R. Ragnarsson, K.R. Benediksdottir, K.K. Aben, L.A. Kiemeny, J.H. Olafsson, J. Gulcher, A. Kong, U. Thorsteinsdottir, K. Stefansson. Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans, *Nat. Genet.* 39 (2007) 1443–1452.
- R.A Sturm, R. Teasdale, N. Box. Human pigmentation genes: Identification, Structure and Consequences of Polymorphic Variation, *Gene* 277(2001) 49–62.
- R.A Sturm, T.N Frudakis. Eye colour: portals into pigmentation genes and ancestry, *Trends in Genetics* 20(2004) 327–332.
- R.A. Sturm. A golden age of human pigmentation genetics, *Trends Genet.* 22 (2006) 464-468.
- R.A. Sturm, D.L. Duffy, Z.Z. Zhao, F.P.N. Leite, M.S. Stark, N.K. Hayward, N.G. Martin, G.W. Montgomery, A single SNP in an evolutionary conserved region within intron 86 of the *HERC2* gene determines human blue-brown eye color. *The American Journal of Human Genetics* 82 (2008) 424-431.
- R.A. Sturm. Molecular genetics of human pigmentation diversity, *Hum. Mol. Genet. Review Issue* 18 (2009) R9-R17.
- R.A. Sturm, M. Larsson. Genetics of human iris colour and patterns, *Pigment Cell Melanoma Res.* 22 (2009) 544-562.
- R.A. Sturm, D.L. Duffy. Human pigmentation genes under environmental selection, *Genome Biology* (2012) 13:248. doi:10.1186/gb-2012-13-9-248
- R.K. Valenzuela, S. Ito, K. Wakamatsu, M.H. Brilliant. Prediction model validation: normal human pigmentation variation, *J. Forensic Res.* 2 (2011). doi:10.4172/2157-7145.1000139

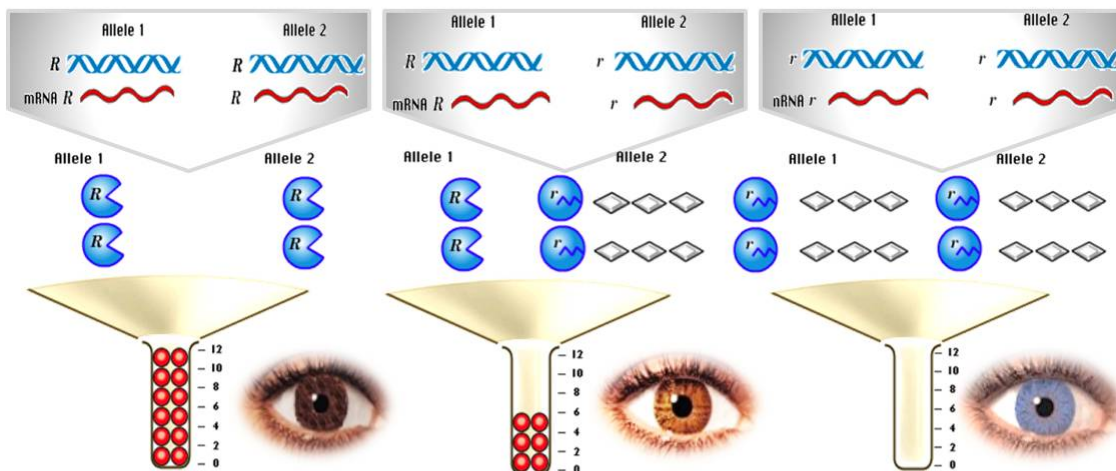
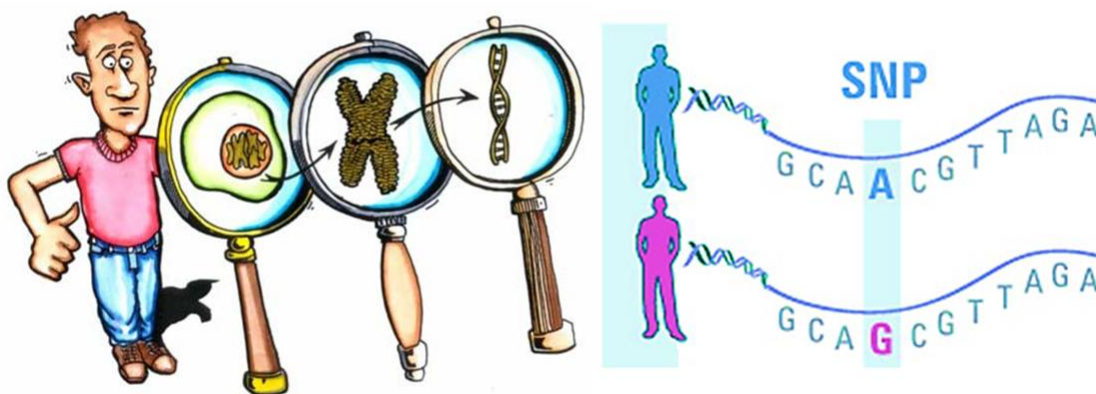
- R.L. Lamason, M.A. Mohideen, J.R. Mest, A.C. Wrong, H.L. Norton, M.C. Aros, M.J. Jurynec, X. Mao, V.R. Humphreville, J.E. Humbert, S. Sinha, J.L. Moore, P. Jagadeeswaran, W. Zhao, G. Ning, I. Makalowska, P.M. McKeigue, D. O'Donnell, R. Kittles, E.J. Parra, N.J. Mangini, D.J. Grunwald, M.D. Sriver, V.A. Canfield, K.C. Cheng. SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans, *Science* 310(2005) 1782–1786.
- R. M. Harding, E. Healy, A. J. Ray, N. S. Ellis, N. Flanagan, C. Todd, C. Dixon, A. Sajantila, I. J. Jackson, M. A. Birch-Machin, J. L. Rees. Evidence for Variable Selective Pressures at MC1R, *Am J Human Genet* 66(2000)1351-61.
- R.P. Stokowski, P.V.K. Pant, T. Dadd, A. Fereday, D.A. Hinds, C. Jarman, W. Filsell, R.S. Ginger, M.R. Green, F.J. van der Ouderaa, D.R. Cox. A genomewide association study of skin pigmentation in a south asian population, *The American Journal of Human Genetics*. 81 (2007) 1119–1132.
- R.S. Ginger, S. E. Askew, R.M. Ogborne, R.M. Wilson, D. Ferdinando, T. Dadd, A.M. Smith, S. Kazi, R.T. Szerencsei, R.J. Winkfein, P.P. Schnetkamp, M.R. Green. SLC24A5 encodes a trans-Golgi network protein with potassium-dependent sodium–calcium exchange activity that regulates human epidermal melanogenesis, *J Biol Chem* 283(2008) 5486–5495.
- S. Alaluf, D. Atkins, K. Barrett, M. Blout, N. Carter, A. Heath. Ethnic variation in melanin content and composition in photoexposed and photoprotected human skin, *Pigment Cell Res* 15(2002) 112-118.
- S. Alaluf, K. Barrett, M. Blount, N. Carter. Ethnic variation in tyrosinase and *TYRP1* expression in photoexposed and photoprotected human skin, *Pigment. Cell. Res.* 16 (2003) 35-42.
- S. Ito, K. Wakamatsu, *Chemistry of Melanins*. In: J.J. Nordlund, R.E. Boissy, V.J. Hearing, R.A. King, W.S. Oetting, J.P. Ortonne (Eds.). *The Pigmentary System. Physiology and Pathophysiology*, Blackwell Publishing; Oxford, 2006, pp. 282-310.
- S. Walsh, A. Lidenbrgh, S.B. Zuniga, T. Sijen, P. Knijff, M. Kayser, K.N. Ballantyne. Developmental validation of the IrisPlex system: Determination of blue and brown iris colour for forensic intelligence, *Forensic Sci Int. Genet.* 5 (2011a) 464-471.
- S. Walsh, F. Liu, K.N. Ballantyne, M. van Oven, O. Lao, M. Kayser. IrisPlex: a sensitive DNA tool for accurate prediction of blue and brown eye colour in the absence of ancestry information, *Forensic Sci Int. Genet.* (2011b). doi:10.1016/j.fsigen.2010.02.004
- S. Walsh, F. Liu, A. Wollstein, L. Kovatsi, A. Ralf, A. Kosiniak-Kamysz, W. Branicki, M. Kayser. The HIrisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA, *Forensic Sci Int. Genet.* 7 (2013) 98-115.
- T. Frudakis, M. Thomas, Z. Gaskin, K. Venkateswarlu, K.S. Chandra, S. Ginjupalli, S. Gunturi, S. Natrajan, V.K. Ponnuswamy, K.N. Ponnuswamy. Sequences associated with human iris pigmentation, *Genetics* 165 (2003) 2071–2083.
- T. Kondo, V.J. Hearing. Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation, *Expert Rev Dermatol.* 6 (2011) 97–108.

- T. Kushimoto, V. Basur, J. Valencia, J. Matsunaga, W.D. Vieira, V.J. Ferrans, J. Muller, E. Appella, V.J. Hearing. A model for melanosome biogenesis based on the purification and analysis of early melanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98(2001) 10698-10703.
- W. Branicki, U. Brudnik, A. Wojas-Pel. Interactions Between *HERC2*, *OCA2* and *MC1R* May Influence Human Pigmentation Phenotype, *Annals of Hum Genet*. 73 (2009) 160-170.
- Y. Jin, S.A. Birlea, P.R. Fain, T.M. Ferrara, S. Ben, S.L. Riccardi, J.B. Cole, K. Gowan, P.J. Holland, D.C. Bennett, R.M. Luiten, A. Wolkerstorfer, J.P.W. van der Veen, A. Hartmann, S. Eichner, G. Schuler, N. van Geel, J. Lambert, E.H. Kemp, D.J. Gawkrödger, A.P. Weetman, A. Taïeb, T. Jouary, K. Ezzedine, M.R. Wallace, W.T. McCormack, M. Picardo, G. Leone, A. Overbeck, N.B. Silverberg, R.A. Spritz. Genome-wide association analyses identify 13 new susceptibility loci for generalized vitiligo, *Nature Genetics* 44 (2012) 676–680.

MATERIAL INFORMATIVO APRESENTADO AOS PARTICIPANTES DA PESQUISA



PROJETO: ANÁLISE DE SNPs EM GENES DE PIGMENTAÇÃO HUMANA EM INDIVÍDUOS FENOTIPICAMENTE DISTINTOS
LABORATÓRIO DE GENÉTICA HUMANA



PASSO 1: CUMPRIMENTO, APRESENTAÇÃO E EXPLICAÇÕES



PASSO 2: TCLE



PASSO 3: DADOS

DATA DA COLETA	_____ / _____ / _____	INSTRUMENTO NÚMERO	COA	_____
DADOS PESSOAIS		Data de Nascimento		_____ / _____ / _____
DADOS EPIDEMIOLÓGICOS		Etnia		
Nacionalidade		Portuguesa Espanhola		
Raça		Branca Preta Amarela Indígena Outra		
Cor dos olhos		Azul Claro Azul Escuro Verde Marrom Claro Marrom Escuro Preto		
Cor da pele		Tipo I Tipo II Tipo III Tipo IV Tipo V Tipo VI		
Sexo		Masculino Feminino		
Profissão		_____		
OBSERVAÇÕES / COMPLEMENTAÇÕES				

NOME E ASSINATURA DE QUEM PREENCHEU O INSTRUMENTO				

PASSO 5: REGISTRO DA COR DA PELE



PASSO 4: FOTO DOS OLHOS



PASSO 6: COLETA DE CÉLULAS



PASSO 7: OBTENÇÃO E ANÁLISE DE DNA



FINAL: COMPARAÇÃO ENTRE DNA, COR DA PELE E COR DOS OLHOS.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA COLETA DE DADOS

PESQUISA: MARCADORES GENÉTICOS PARA PIGMENTAÇÃO HUMANA POP COLETA

1- Abordar o sujeito da pesquisa, cumprimentá-lo e apresentar o trabalho.

PESQUISADOR: “Bom dia/Boa tarde/Boa noite, somos do LGHM da PUCRS, estamos realizando uma pesquisa sobre os genes que determinam a coloração da pele e dos olhos, o senhor(a) gostaria de participar?”

PESQUISADOR: “São três passos simples e não demora muito tempo, faremos o seguinte: registraremos a cor da pele do seu braço com um medidor de cor; fotografaremos seus olhos e passaremos um cotonete na sua bochecha para coletar células”.

SE O SUJEITO REJEITAR: Agradecer e se despedir.

SE O SUJEITO ACEITAR: Prosseguir.

2- Passar o TCLE para que o sujeito da pesquisa assine e leve cópia.

PESQUISADOR: “Assine, por favor, e fique com uma cópia deste TCLE. Neles há explicações sobre a pesquisa, e constam os telefones de contato caso o senhor queira: 1- saber mais sobre a pesquisa; 2- sair a qualquer momento da pesquisa; 3- receber os resultados da pesquisa”.

3- Guardar o TCLE

4- Preencher completa e corretamente o Instrumento de coleta de dados do projeto.

O PESQUISADOR pergunta ao SUJEITO e preenche o Instrumento.

Lembrar-se de perguntar e anotar sobre:

1- Usa lentes de contato?

2- Usa autobronzeador?

3- Tomou banho de sol recentemente [está bronzeado]?

4- Comeu algo a pouco tempo?

5- Fotografar os dois olhos do SUJEITO.

INSTRUÇÕES:

1- Posicionar o SUJEITO em ambiente com luz artificial.

2- Ajustar a câmara para as seguintes posições: Com flash; modo macro, zoom macro máximo, sensibilidade ISO 80, modo imagem 12 megapixels com resolução de 4000X3000 qualidade máxima, apoiada em tripé.

3- Aproximar a câmara fotográfica até 6±0,5cm de distância entre o olho e a objetiva. Olho direito primeiro.

4- Disparar a foto usando flash atenuado por material translúcido.

5- Anotar a numeração, a data e o horário das fotos no Instrumento de coleta.

6- Medir a coloração do SUJEITO.

INSTRUÇÕES:

1- Posicionar o SUJEITO em ambiente com luz artificial.

2- Realizar a calibração do equipamento com o auxílio do cartão de calibração fornecido com o instrumento, encostar o sensor firmemente no cartão, pressionar os botões FUNCTION e CAL ao mesmo tempo, aguardar aproximadamente 50 segundos até o aparelho gerar o som de 3(três) BIPS e identificar R, G e B com o valor 1023, confirmando o processo de calibragem.

3- Encostar o sensor do instrumento na parte interna do braço a 5±0,5cm abaixo da dobra do cotovelo.

4- Apertar o gatilho e aguardar os valores aparecerem no visor do aparelho, realizando a medição.

5- Anotar a numeração dos dados RGB que aparecerem no visor, pressionar o botão RGB/HSL, anotar os valores de HSL que aparecerem no visor.

6- Repetir duas vezes mais os passos de 3 a 5, e anotar as três medições.

7- Coletar células da mucosa oral do SUJEITO com dois swabs.

INSTRUÇÕES:

1- Usar luvas.

2- Posicionar o SUJEITO com a boca aberta.

3- Mostrar ao SUJEITO que o swab é estéril e está fechado.

4- Abrir o swab rasgando a ponta do envelope de papel.

5- Não tirar o swab do envelope, apenas amarrotá-lo para liberar a ponta do swab.

6- Fazer esfregaço do lado direito interno da boca do SUJEITO por dez segundos, girando o swab.

7- Transferir a ponta do swab para dentro do tubo de eppendorff.

8- Com a tesoura esterilizada com hipoclorito, cortar a haste do swab, por cima do papel, tomando cuidado para que não caia nenhum vestígio do papel no eppendorff.

9- Fechar e identificar o eppendorff com o número de coleta e as iniciais do sujeito.

10- Repetir o procedimento do lado esquerdo interno da boca.

8- Encerrar o procedimento.

PESQUISADOR: “Muito obrigado(a) pela sua valiosa participação. Esteja à vontade para fazer qualquer pergunta agora ou quando quiser.”

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar de uma pesquisa da PUCRS. O título da pesquisa é 'FREQUÊNCIAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DE GENES QUE REGULAM A PIGMENTAÇÃO EM INDIVÍDUOS COM PELE MUITO CLARA E OLHOS MUITO ESCUROS: ESTUDO PARA FINS FORENSES', que tem por objetivo estudar partes do material genético que possam estar relacionadas à cor da pele e à cor dos olhos das pessoas. Para isso precisamos: 1- registrar a cor da pele do seu braço com um medidor; 2- fotografar cada um de seus olhos [não o rosto]; 3- coletar células da sua bochecha com um cotonete esterilizado.

Este estudo não trará benefícios para você diretamente, nesse momento. Mas, haverá benefícios para a sociedade se conseguir encontrar relações entre o material genético e a cor da pele e olhos da pessoa. Isso poderá ajudar a identificar pessoas desaparecidas, por exemplo.

Sinta-se à vontade para fazer qualquer pergunta sobre o estudo e esclarecer suas dúvidas. Os responsáveis pela pesquisa garantidamente lhe responderão. Caso você tenha vontade de ser retirado da pesquisa, diga isso a qualquer momento, sem necessidade de explicar. Você não será prejudicado se resolver tomar essa decisão. Apenas comunique aos pesquisadores se quiser abandonar a pesquisa e nós respeitaremos a sua decisão.

Toda e qualquer informação atualizada sobre este estudo estará à disposição de todos os que participam da pesquisa. Os resultados deste estudo poderão ser comunicados a você, sempre que você quiser. A dignidade e a privacidade dos participantes desta pesquisa, em relação a qualquer dado, serão mantidas. Os dados dos participantes da pesquisa estarão protegidos pelos pesquisadores responsáveis contra qualquer tipo de uso que não os aqui previstos. Além disto, os dados receberão um número para garantir o anonimato dos participantes da pesquisa. No estudo dos dados, a identidade do participante será desconhecida tanto pela equipe do trabalho como por qualquer outra pessoa externa.

A partir do mesmo material poderão ser futuramente feitos outros estudos. Para isso, você poderá permitir que sua amostra seja usada em novos estudos. Mesmo que esta permissão seja dada agora, estudos futuros só serão realizados se forem aprovados por um Comitê de Ética em Pesquisa.

Eu, _____ (*preencher com nome do participante da pesquisa*) fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e objetiva. Recebi informação a respeito dos procedimentos do estudo e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar. A equipe da Dra. Clarice S. Alho certificou-me de que todos os dados referentes ao participante desta pesquisa serão confidenciais, bem como sua rotina de vida não será modificada em razão desta pesquisa e que, ainda, terei a liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa se assim o desejar. Assim, como sujeito de pesquisa, dou consentimento para participar deste estudo. Eu também permito que a amostra de material genético seja armazenada na universidade, sob responsabilidade dos Pesquisadores Coordenadores, para estudos futuros. Minha permissão vale desde que os novos estudos sejam sempre devidamente aprovados por um Comitê de Ética em Pesquisa e estejam sob responsabilidade dos mesmos Pesquisadores Coordenadores. Fui informado também que, nesta situação, caso alguma informação considerada importante seja identificada no material genético analisado em decorrência da pesquisa, os pesquisadores poderão buscar a mim para oferecer acesso a tal informação.

Caso eu tenha novas perguntas sobre este estudo, posso telefonar a Dra. Clarice S. Alho nos telefones (51) 91136334 ou (51) 3320 3545 ramal 4534, ou para esclarecer sobre os meus direitos como participante deste estudo, ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso chamar também os responsáveis pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP-PUCRS no telefone (51) 3320 3000 ramal 3345. As ligações para os celulares poderão ser realizadas a cobrar. Declaro também que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Assinatura do Participante **Nome do Participante** _____/_____/20____

Assinatura do Pesquisador **Nome do Pesquisador** _____/_____/20____

Na impossibilidade de autonomia para a leitura deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o mesmo foi lido para _____ (*preencher com o nome do doador*) pelo pesquisador _____ (*preencher com o nome do pesquisador*) enquanto eu estava presente como testemunha.

Assinatura da Testemunha **Nome da Testemunha** _____/_____/20____

INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

PESQUISA: MARCADORES GENÉTICOS PARA PIGMENTAÇÃO HUMANA

DATA DA COLETA: ____ / ____ / ____

Indivíduo NÚMERO: COR

número			iniciais		

DADOS PESSOAIS

Nome: _____ Data de Nascimento: ____ / ____ / ____

Nome da Mãe: _____

Contato: _____

DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Sexo: () M () F
 Origem: () Alemã () Italiana () Africana () Indígena () Portuguesa () Espanhola
 () Brasileira () Árabe () Desconhecida () Outra: _____
 Residente em: () RS () SC () PR () Outro: _____
 Natural de: () RS () SC () PR () Outro: _____

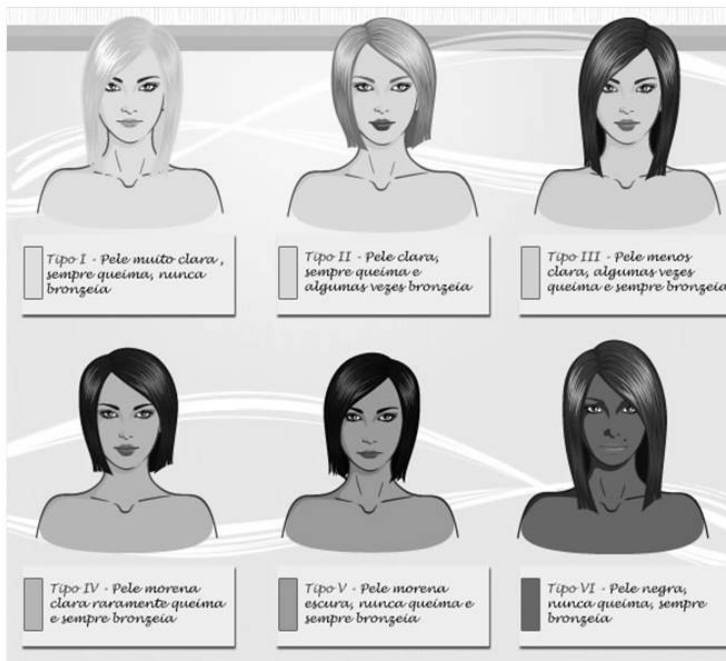
DADOS BIOLÓGICOS

COR OLHO: () Azul Claro
 () Azul Escuro
 () Verde
 () Mel (Amarelado)
 () Marrom Claro
 () Marrom Escuro
 () Preto

Número da Foto: _____

COR PELE: () Tipo I
 () Tipo II
 () Tipo III
 () Tipo IV
 () Tipo V
 () Tipo VI

Medidor: R: ____ R: ____ R: ____ Média: ____
 G: ____ G: ____ G: ____ Média: ____
 B: ____ B: ____ B: ____ Média: ____



OBSERVAÇÕES / COMPLEMENTAÇÕES

NOME E ASSINATURA DE QUEM PREENCHEU O INSTRUMENTO

--

Analysis of Eight SNPs in South Brazilian Subjects with Different Skin and Eye Melanin Content

Fernanda Rosa Sawitzki¹, Rodrigo Rodenbusch^{1,2}, Diego Wordell Gubert¹, Deborah Soares Bispo Santos Silva^{1,3}, Eduardo Filipe Avila Silva^{1,4} and Clarice Sampaio Alho^{1*}¹Faculty of Biosciences, Laboratory of Human and Molecular Genetics, PUCRS, Brazil²Scientific and Technological Development Center (CDCT), State Foundation of Production and Research in Health (FEPPS), Porto Alegre-RS, Brazil³Forensic Sciences Institute, North Carolina State University, USA⁴Department of Federal Police, Porto Alegre-RS, Brazil

Article Information

Received date: Jun 07, 2017

Accepted date: Aug 14, 2017

Published date: Aug 18, 2017

*Corresponding author

Clarice Sampaio Alho, Laboratório de Genética Forense, PUCRS. Av. Ipiranga 6681, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil, Tel: (+55) (51) 3320-3568; Email: csalho@pucrs.br

Distributed under Creative Commons CC-BY 4.0

Keywords Forensic; Human pigmentation; Phenotype; SNaPshot; SNP

Abbreviations AUC: Area under the Receiver Operating Characteristic Curve; DNA: Deoxyribonucleic Acid; EVC: Externally Visible Characteristics; FDA: Factorial Discriminant Analyses; GP: Genetic Probability; HMC: High Melanin Content; LMC: Low Melanin Content; PCR: Polymerase Chain Reaction; PGL: Calculation of Pathway Genetic Load; RGB: Red, Green, Blue; SNP: Single Nucleotide Polymorphism; STR: Short Tandem Repeat

Abstract

LMC (Low Melanin Content) and HMC (High Melanin Content) subjects have respectively low and high melanin content in both skin and eyes; LMC has white skin and blue eyes and HMC has dark skin and eyes. Comparative investigation between frequencies of genetic variants in LMC subjects versus HMC subjects may indicate which polymorphic variant is associated with melanin synthesis in skin and eyes. Coordinately, studies with Snow White-Like (SW) subjects may be informative to reveal any tissue-specific expression, since these individuals have white skin and dark eyes.

The LMC - HMC - SW model was used to analyze the allelic distribution of eight biallelic SNPs in pigment-related genes in admixed South Brazilian individuals. Based on allele frequencies of different human populations, allele "L" was used for the alleles associated with low melanin content populations (LMC subjects), and allele "H" was used for the alleles associated with high melanin content populations (HMC subjects). Allelic distribution of eight SNPs showed that 100% of LMC subjects (N=73) had less than eight H alleles, and 82% of HMC subjects (N=61) had eight or more H alleles. The AUC (Area under the Receiver Operating Characteristic Curve) value was 0.99, and the calculation of PGL (Pathway Genetic Load) and GP (Genetic Probability) showed that the SNP set presented 93% and 91% concordance between DNA genotype and phenotypes, respectively. Factorial Discriminant Analyses (FDA) performed in the SW group (light skin and dark eyes; N=116) showed a positive association between SNPs rs16891982 (SLC45A2), rs8045560 (MC1R), rs1426654 (SLC24A5), rs2733832 (TYRP1) and rs1042602 (TYR), and the LMC cluster for skin phenotype, and a positive association between SNPs rs4778138 (OCA2), rs12913832 (HERC2) and rs916977 (HERC2), and the HMC cluster for eye phenotype. The understanding of gene function in externally visible characteristics is important for the prediction of skin and eye colors in humans; the analyses presented here are an important contribution to the forensic DNA phenotyping scenario.

Communication

Forensic DNA Phenotyping (FDP) aims to predict appearance traits of a sample donor from DNA evidence left at a crime scene; a good FDP strategy may be especially useful in cases where the police have no other investigative leads, include reference DNA profiling. Skin and eye colors are important Externally Visible Characteristics (EVCs), since they are highly heritable genetic traits and are the most obvious and distinguishable externally visible characteristics to be used in human identification [1]. Hair melanin content is more prone to change by intrinsic or extrinsic factors; it is age-dependent, changing during late childhood, adolescence, adulthood, and old age, and becoming darker, gray or white at any given stage [1]. These changes, added to the occurrence of baldness, make hair a trait less useful to forensic DNA phenotyping applications.

There are hundreds of genes involved in the pigmentation process; however, for forensic purposes, a small number of SNPs have already been proved to be sufficient in the prediction of pigmentation patterns with high confidence [1]. In order to find a set of candidate SNPs able to predict EVCs, we first selected seven human genes linked to melanin synthesis (Figure 1): 1- *OCA2*: encodes the P protein involved in anion transport and in the melanosomal pH regulation, operating in the Tyrosinase (TYR) and the Tyrosinase Related Protein 1 (TYRP1) functions [2-5]. 2- *HERC2*: *HERC2* domain and *RCC1-Like domain 2* gene is located 10 Kb upstream of *OCA2* and it acts as a regulatory enhancer of *OCA2* region. The *HERC2* function is still unknown [1,2]. 3- *SLC45A2*: Solute carrier family 45 members 2 gene encodes MATP protein and regulates MATP function, with a crucial role in the trafficking processing and intracellular Tyrosinase (TYR) and protons transporting, controlling the intramelanosomal pH and the activity of Tyrosinase (TYR) [6]. 4- *MC1R*: transcribes the melanocortin 1 receptor (alpha melanocyte stimulating hormone receptor),

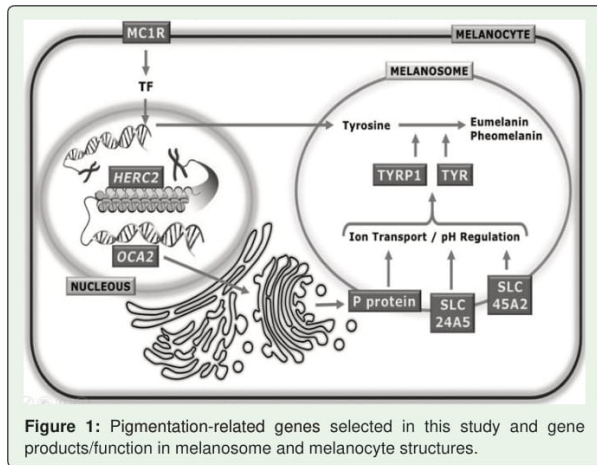


Figure 1: Pigmentation-related genes selected in this study and gene products/function in melanosome and melanocyte structures.

a G-protein located in the melanocyte membrane which is directly responsible for eumelanin/pheomelanin synthesis regulation [7]. 5- *SLC24A5*: solute carrier family 24, member 5, is responsible for accumulating Ca^{2+} in the melanosome [8]. 6- *TYRP1*: encodes the tyrosinase-related protein 1, which is necessary to melanin production [6-9]. 7- *TYR*: transcribes the tyrosinase, a crucial enzyme for the initial melanogenesis process [10]. After gene selection, SNPs were analyzed in each one of the genes using NCBI (National Center for Biotechnology; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). A large number of SNPs were identified per gene (*OCA2*: 44456; *HERC2*: 24579; *SLC45A2*: 5349; *MC1R*: 1238; *SLC24A5*: 2751; *TYRP1*: 3020; *TYR*: 13736) and SNP selection was done based on the following criteria: biallelic polymorphisms (i.e. no single insertion/deletion variants),

validation by 1000G (One Thousand Genomes Project; <http://www.internationalgenome.org>) and by HapMap (International Haplotype Map Project; <http://www.hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>), and with global **Minor Allele Frequency (MAF)** distinguishable as a common polymorphism (i.e. with no rare variant).

Next, we examined the allelic frequencies data of each selected SNP in different human populations using ALFRED (ALlele FREquency Database; <https://alfred.med.yale.edu>). In this step, we selected from ALFRED two sets of samples from extremely distinguishable subjects according to the melanin content in skin and eyes (subjects with low melanin content *versus* subjects with high melanin content), and discerned the allelic frequencies of each SNP in these two sets of samples. Thus, we selected less than 20 pre-candidate SNPs that independently could be able to distinguish those two sets of subjects (LMC *versus* HMC) by allelic frequencies. Simultaneously, we analyzed published studies with significant data on genotype-phenotype association. Finally, eight SNPs in seven genes were chosen. At each locus, allele L was used for each allele strongly associated with LMC subjects, and allele H for each allele strongly associated with HMC subjects. Table 1 presents the selected SNPs and their allele frequencies based on the populations frequencies available on ALFRED, and also data on sensibility, specificity, predictive values, relative ratio, and odds ratio (the database used to construct Table 1 is available in the supplemental file). These loci were tested in previously published genotype-phenotype association studies (Box 1). Since the eight SNPs in pigmentation-related genes presented remarkable results in all of the parameters, they were considered robust markers for color prediction.

1- HMC (High Melanin Content) subjects from populations of Africans, as available on ALFRED websites. 2- LMC (Low Melanin Content) subjects from populations of Europeans, as available on

BOX 1: Eighth locus in seven pigmentation-related genes that were previously tested in genotype-phenotype association studies.

<ul style="list-style-type: none"> • OCA2: The rs4778138 is a G>A SNP in <i>OCA2</i> intron region strongly associated with eye color [6].
<ul style="list-style-type: none"> • HERC2: The rs12913832 is an A>G SNP in <i>HERC2</i> intronic area, within <i>OCA2</i> enhancer region. The derived allele G of this SNP is associated with blue iris phenotype, being common in Europeans, particularly those of northwestern and eastern European descent [4]. The allele A (or allele T, if in the complementary DNA strand) allows chromatin opening and the <i>OCA2</i> transcription factors recruitment, which leads to darker iris, while the allele G (or allele C, if in complementary DNA strand) maintains the chromatin closed, being less effective in recruiting the aforementioned factors, which results in lighter iris [4]. The derived allele G of rs916977, other A>G SNP, in about 10 Kb far from rs12913832, has been associated with blue eyes [1].
<ul style="list-style-type: none"> • SLC45A2: The rs16891982 is the 1122C>G SNP in exon 5 of the <i>SLC45A2</i> gene. This SNP results in the non-synonymous substitution of Leucine (allele C; codon TTG on the coding/reverse DNA strand) by Phenylalanine (allele G; codon TTC on the coding/reverse DNA strand) at amino acid 374 (Leu374Phe). Rs16891982 is associated with human skin pigmentation normal variation, since it regulates the MATP function; the Leu374 variant (allele C – complementary to G on codon TTG on the coding/reverse DNA strand) plays an important role in the transport of protons, resulting in an optimum intramelanosomal pH, which allows the activity of tyrosinase (TYR) and, consequently, the adequate production of eumelanin (brow-black spectrum), while the derived Phe374 variant (allele G – complementary to C on codon TTC on the coding/reverse DNA strand) may change the transport, the pH and the synthesis of the pigment [7]. A strong association between rs16891982 and eye color has been reported [1].
<ul style="list-style-type: none"> • MC1R: The ancestral allele C of rs8045560 (C>T SNP) is associated with darker skin populations [7].
<ul style="list-style-type: none"> • SLC24A5: The rs1426654 (G>A SNP in the coding region of <i>SLC24A5</i> gene) results in non-synonymous substitution of Alanine (GCA) by Threonine (ACA) at amino acid 111 Ala111Thr. This SNP has shown evidence of natural selection; the derived allele A (Thr111) is associated with light skin pigmentation and is common in Europe, southwest Asia, and central Asia [1]. The ancestral allele (G allele; Ala111) is associated with darker skin [8].
<ul style="list-style-type: none"> • TYRP1: The ancestral allele C of rs2733832 (C>T SNP) is associated with darker skin populations [6].
<ul style="list-style-type: none"> • TYR: The rs1042602 (C>A SNP) results in the non-synonymous substitution of Serine (TCT) by Tyrosine (TAT) at amino acid 192 (Ser192Tyr) and in a reduction of about 40% in the catalytic activity of tyrosinase [10].

Citation: Sawitzki FR, Rodenbusch R, Gubert DW, Prado MJ, Silva DSBS and Alho CS. Analysis of Eight SNPs in Pigment-Related Genes in South Brazilian Subjects with High or Low Skin and Eye Melanin Content. *SM J Forensic Res Criminol.* 2017; 1(2): 1008.

Table 1: Allele frequencies and other parameters of the selected SNPs based on population data from ALFRED.

RS (Gene; SNP)		HMC Populations ¹		LMC Populations ²		P Value	Sensit	Specif	PV-1	PV-2	RR	OR
rs4778138 (<i>OCA2</i> ; SNP G>A)	Allele H (G)	0.745	(1135/1524)	0.164	(957/5826)	<0.0001	0.744	0.836	0.542	0.926	7.31	14.81
	Allele L (A)	0.256	(390/1524)	0.836	(4870/5826)							
rs12913832 (<i>HERC2</i> ; SNP A>G)	Allele H (A)	0.957	(4484/4688)	0.285	(8155/28286)	<0.0001	0.957	0.712	0.355	0.990	35.36	54.26
	Allele L (G)	0.043	(204/4688)	0.712	(20132/28286)							
rs16891982 (<i>SLC452A</i> ; SNP C>G)	Allele H (C)	0.881	(3592/4076)	0.067	(1850/27594)	<0.0001	0.881	0.933	0.660	0.982	35.77	103.28
	Allele L (G)	0.119	(484/4076)	0.933	(25744/27594)							
rs8045560 (<i>MC1R</i> ; SNP C>T)	Allele H (C)	0.915	(1440/1574)	0.440	(1730/3932)	<0.0001	0.915	0.560	0.454	0.943	7.92	13.68
	Allele L (T)	0.085	(134/1574)	0.560	(2202/3932)							
rs1426654 (<i>SLC24A5</i> ; SNP G>A)	Allele H (G)	0.725	(2890/3984)	0.011	(52/4502)	<0.0001	0.725	0.988	0.982	0.803	4.98	226.12
	Allele L (A)	0.275	(1094/3984)	0.989	(4451/4502)							
rs2733832 (<i>TYRP1</i> ; SNP C>T)	Allele H (C)	0.917	(396/432)	0.415	(537/1292)	<0.0001	0.917	0.584	0.424	0.954	9.33	15.47
	Allele L (T)	0.083	(36/432)	0.585	(755/1292)							
rs1042602 (<i>TYR</i> ; SNP C>A)	Allele H (C)	0.946	(1982/2096)	0.702	(3614/5146)	<0.0001	0.946	0.298	0.354	0.930	5.11	7.37
	Allele L (A)	0.054	(114/2096)	0.298	(1532/5146)							
rs916977 (<i>HERC2</i> ; SNP A>G)	Allele H (A)	0.890	(1116/1254)	0.214	(778/3638)	<0.0001	0.890	0.786	0.589	0.954	12.80	29.73
	Allele L (G)	0.110	(138/1254)	0.786	(2860/3638)							

ALFRED websites. ‘Allele H’: allele strongly associated with HMC people. ‘Allele L’: allele strongly associated with LMC people. Sensit: sensitivity. Specif: specificity. PV-1: predictive value for the presence of allele H in HMC populations. PV-2: Predictive Value for the presence of allele L in LMC populations. RR: Relative Ratio. OR: Odds Ratio.

To amplify the flanking SNP regions by multiplex PCR in a SNaPshot[®] System ABI Prism (Applied Biosystems), primer sequences were designed for each locus for conventional PCR and for the SNaPshot multiplex system (Table 2). Labeled products

were separated in an ABIPRISM[®]3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems[®]) and analyzed in GeneMapper ID software version 3.2.1 (Applied Biosystem[®]).

In this study, first we analyzed 134 southern Brazilian subjects belonging to categories: LMC subjects (white skin and blue eyes; N = 73) and HMC subjects (dark skin and eyes; N = 61). Each skin color participant of was identified using Fitzpatrick score and the amount of red (R), green (G), and blue (B) pigments in an inner and hairless portion (below elbow) of the right arm using the *color analyzer* ACR-1023 (Instrutherm, São Paulo, Brazil). Each eye

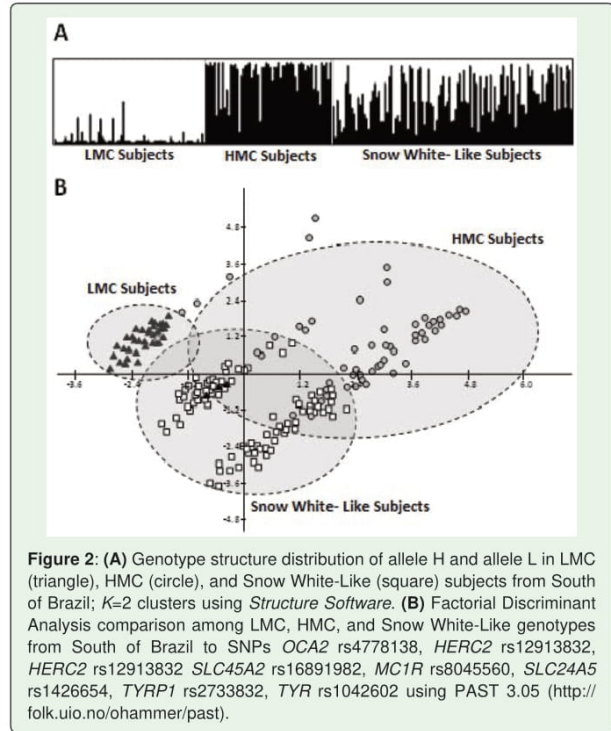
Table 2: Primer sequences per locus for conventional PCR and for the SNaPshot multiplex system.

RS (Gene; SNP)	Primer Sequence
rs916977 (<i>HERC2</i> ; SNP A>G)	F-5'- ttgtttggcacaactccaca-3' / R-5'- tttccaattgcctgacat-3' (PCR Fragment: 200pb) SNaPshot (35pb): ggcaaacctccacagtgaggatgacattgagtagaT/C
rs4778138 (<i>OCA2</i> ; SNP G>A)	F-5'- ggattcaaaaagaagtctcaagg-3' / R-5'- gctctcctttgataccagca-3' (PCR Fragment: 146bp) SNaPshot (42pb): tattgaactgaatgaaagtgaataataacatcaaaattgG/A
rs12913832 (<i>HERC2</i> ; SNP A>G)	F-5'- cagctccatcaatgttgta-3' / R-5'- ctgatgatgatagcgtgcaga-3' (PCR Fragment: 253pb) SNaPshot (56pb): ttcatggctctgtctgctgcaagaggcaggccagttcattgagcattaaA/G
rs16891982 (<i>SLC452A</i> ; SNP C>G)	F-5'- ccaagttgtgtagaccagaaa-3' / R-5'- cctcaacagcctccaatctc-3' (PCR Fragment: 211pb) SNaPshot (64pb): aagacatcctaggagagagaagactacaagaataaagtgaggaaaacacggagttgatcaC/G
rs8045560 (<i>MC1R</i> ; SNP C>T)	F-5'- aacgatgtttgggtcagca-3' / R-5'- actcaaggcatctggaatgg-3' (PCR Fragment: 289pb) SNaPshot (73pb): caccaccoccttttccatggggatctgcactcatcaccagggaagatggtggagataaccocagctctgcC/T
rs1426654 (<i>SLC24A5</i> ; SNP G>A)	F-5'- gctctccctcacccttcta-3' / R-5'- aggtggtgctaagccaat-3' (PCR Fragment: 425pb) SNaPshot (90pb): tagttgtaaagacatactttcactttataggcataacaatcattcattatgttcagccctggattgctcaggatgttcaggcG/A
rs2733832 (<i>TYRP1</i> ; SNP C>T)	F-5'- atgacctctgttccaagt-3' / R-5'- ctcttgctcatttcaa-3' (PCR Fragment: 334pb) SNaPshot (98pb): ccaaatgatcctattttgctctcgcacacctcagatgacagcagcttctgatgaatggctgaggagatacaatgctgtaagacatttcatatgcC/T
rs1042602 (<i>TYR</i> ; SNP C>A)	F-5'- actgcaagttggctttgg-3' / R-5'- gcttcatgggcaaatcaat-3' (PCR Fragment: 307pb) SNaPshot (106pb): ggccaaatgaaaaatggatcaaccacctgttaacgacatcaatattatgacctttgtctggatcattatgttcaatggatgactgctgggggcaC/A

Citation: Sawitzki FR, Rodenbusch R, Gubert DW, Prado MJ, Silva DSBS and Alho CS. Analysis of Eight SNPs in Pigment-Related Genes in South Brazilian Subjects with High or Low Skin and Eye Melanin Content. SM J Forensic Res Criminol. 2017; 1(2): 1008.

Table 3: Phenotype data from 134 LMC and HMC Southern Brazilian subjects.

		LMC	HMC
Total	N (%)	73 (54.82)	61 (45.18)
Sex	Male [N (%)]	40 (54.80)	32 (52.46)
	Female [N (%)]	33 (45.20)	29 (47.54)
Age	Years [Mean (SD)]	36.6 (13.6)	30.4 (8.7)
Skin Fitzpatrick Score	Type 1 [N (%)]	30 (41.09)	0
	Type 2 [N (%)]	43 (58.91)	0
	Type 5 [N (%)]	0	26 (42.62)
	Type 6 [N (%)]	0	35 (57.38)
Skin R-G-B Color	Red [Mean (SD)]	88.4 (13.1)	49.1 (12.9)
	Green [Mean (SD)]	70.3 (13.2)	35.3 (10.2)
	Blue [Mean (SD)]	61.8 (13.8)	27.9 (8.2)
Eye Type	Light blue [N (%)]	50 (68.49)	0
	Dark blue [N (%)]	23 (31.51)	0
	Dark brown [N (%)]	0	39 (63.94)
	Black [N (%)]	0	22 (36.06)
Eye R-G-B Color	Red [Mean (SD)]	99.4 (12.5)	59.2 (19.1)
	Green [Mean (SD)]	95.9 (12.5)	32.6 (11.7)
	Blue [Mean (SD)]	137.9 (25.2)	42.8 (14.8)
Auto Declared Origin	European	66 (90.41)	13 (21.31)
	African	0	26 (37.70)
	Amerindian	0	2 (0.03)
	Mixed	4 (5.48)	10 (16.39)
	Unknown	3 (4.11)	10 (16.39)



color participant was classified and photographed and RGB values weremeasured in both eyes by COLOURS software [<https://www.colours-software-pvt-ltd>]. Phenotype data of these subjects are presented in table 3.

Table 4: Allele frequencies and other parameters of the selected SNPs in 134 South Brazilian subjects with HMC (N=61), or LMC (n=73) patterns.

RS (Gene; SNP)		HMC SB People ¹	LMC SB People ²	P Value	Sensit	Specif	PV-1	PV-2	RR	OR
rs4778138 (<i>OCA2</i> ; SNP G>A)	Allele H (G)	0.607 (74/122)	0.075 (11/146)	<0.0001	0.607	0.892	0.871	0.655	2.52	12.75
	Allele L (A)	0.393 (48/122)	0.925 (135/146)							
rs12913832 (<i>HERC2</i> ; SNP A>G)	Allele H (A)	0.828 (101/122)	0.021 (3/146)	<0.0001	0.828	0.979	0.971	0.872	7.58	229.25
	Allele L (G)	0.172 (21/122)	0.979 (143/146)							
rs16891982 (<i>SLC45A2</i> ; SNP C>G)	Allele H (C)	0.279 (34/122)	0.021 (3/146)	<0.0001	0.279	0.980	0.919	0.622	2.43	18.67
	Allele L (G)	0.721 (88/122)	0.993 (145/146)							
rs8045560 (<i>MC1R</i> ; SNP C>T)	Allele H (C)	0.746 (91/122)	0.390 (57/146)	<0.0001	0.746	0.612	0.615	0.744	2.40	4.63
	Allele L (T)	0.254 (31/122)	0.616 (90/146)							
rs1426654 (<i>SLC24A5</i> ; SNP G>A)	Allele H (G)	0.672 (82/122)	0.000 (0/146)	<0.0001	0.672	1.000	1.000	0.785	4.65	<1000.0
	Allele L (A)	0.328 (40/122)	1.000 (146/146)							
rs2733832 (<i>TYRP1</i> ; SNP C>T)	Allele H (C)	0.770 (94/122)	0.479 (70/146)	<0.0001	0.770	0.521	0.573	0.731	2.13	3.64
	Allele L (T)	0.230 (28/122)	0.521 (76/146)							
rs1042602 (<i>TYR</i> ; SNP C>A)	Allele H (C)	0.869 (106/122)	0.623 (91/146)	<0.0001	0.869	0.377	0.538	0.775	2.39	4.00
	Allele L (A)	0.131 (16/122)	0.377 (55/146)							
rs916977 (<i>HERC2</i> ; SNP A>G)	Allele H (A)	0.697 (85/122)	0.027 (4/146)	<0.0001	0.697	0.973	0.955	0.794	4.65	82.13
	Allele L (G)	0.303 (37/122)	0.979 (143/146)							

Citation: Sawitzki FR, Rodenbusch R, Gubert DW, Prado MJ, Silva DSBS and Alho CS. Analysis of Eight SNPs in Pigment-Related Genes in South Brazilian Subjects with High or Low Skin and Eye Melanin Content. *SM J Forensic Res Criminol.* 2017; 1(2): 1008.

Table 5: Genotype frequencies and Chi-Square Test result of High Melanin Content (HMC), Low Melanin Content (LMC), HMC Subjects, LMC Subjects, and Snow White-Like (SW-L) subjects according HH (homozygote to allele H), LL (homozygote to allele L), and HL (heterozygote) per locus.

RS (Gene; SNP)		HMC	LMC	HMC Subj	LMC Subj	SW Subj
rs4778138 (<i>OCA2</i> ; SNP G>A)	HH	0.55	0.03	0.36	0.00	0.15
	HL	0.38	0.27	0.49	0.15	0.54
	LL	0.06	0.70	0.15	0.85	0.31
	N	762	2913	61	73	116
	P			>0.0001	>0.0001	0.53
rs12913832 (<i>HERC2</i> ; SNP A>G)	HH	0.92	0.08	0.75	0.00	0.47
	HL	0.08	0.40	0.15	0.04	0.00
	LL	0.00	0.52	0.10	0.96	116
	N	2344	14143	61	73	
	P			0.262	<0.0001	
rs16891982(<i>SLC45A2</i> ; SNP C>G)	HH	0.84	0.19	0.56	0.15	0.19
	HL	0.15	0.49	0.38	0.48	0.59
	LL	0.01	0.32	0.06	0.37	0.22
	N	787	1966	61	73	116
	P			>0.0001	0.120	
rs8045560 (<i>MC1R</i> ; SNP C>T)	HH	0.84	0.00	0.05	0.15	0.19
	HL	0.15	0.13	0.46	0.48	0.59
	LL	0.01	0.87	0.49	0.37	0.22
	N	2038	13797	61	73	116
	P			>0.0001	0.102	
rs1426654 (<i>SLC24A5</i> ; SNP G>A)	HH	0.52	0.00	0.46	0.00	0.00
	HL	0.40	0.02	0.43	0.00	0.20
	LL	0.08	0.98	0.11	1.00	0.80
	N			61	73	116
	P			>0.0001	0.178*	
rs2733832 (<i>TYRP1</i> ; SNP C>T)	HH	0.84	0.17	0.58	0.22	0.25
	HL	0.15	0.49	0.39	0.52	0.55
	LL	0.01	0.34	0.03	0.26	0.20
	N	216	646	61	73	116
	P			>0.0001	0.650	
rs1042602 (<i>TYR</i> ; SNP C>A)	HH	0.89	0.49	0.77	0.37	0.35
	HL	0.10	0.42	0.20	0.51	0.49
	LL	0.01	0.09	0.03	0.12	0.16
	N	1048	2573	61	73	116
	P			>0.0001	0.845	
rs916977 (<i>HERC2</i> ; SNP A>G)	HH	0.79	0.04	0.49	0.00	0.24
	HL	0.20	0.34	0.41	0.05	0.47
	LL	0.01	0.62	0.10	0.95	0.29
	N	627	1819	61	73	116
	P			>0.0001	>0.0001	

*The association chi-square test was calculated with the allele data.

There was a highly significant association between alleles H and HMC Brazilian subjects, and alleles L and LMCsubjects. All other parameters (sensitivity, specificity, predictive values, relative ratio, odds ratio) were equally remarkable (Table 4). To observe the cumulative distribution of alleles H and alleles L in the two phenotypically different color groups, we plotted the frequency data and noticed LMC subjects presented between zero and seven alleles H, while HMC subjects presented between four and 14 alleles H. No subject had 15 or 16 alleles H; the average of alleles H among the LMCsubjects was 3.3 (SD=1.49), 96% (70/73) of them had less than five alleles H, and 100% had seven or less alleles H. The average of alleles H among the HMCsubjects was 12.0 (SD=3.78), 82% (56/61) of them had eight or more alleles H. We also measured the ability of the SNP panel correctly classify those with and without the phenotypic trait (pigmentation) and obtained very high AUC (area under the receiver operating characteristic curve) value of 0.9908 in the prediction of both HMC and LMC phenotypes (SE= 0.0088; IC 95% = 0.99736-1.0). The weighted Pathway Genetic Load (PGL) scores, which tested multiple loci cumulative effect on the phenotype [11], showed HMC subjects ranged from 65.29 to 870.92 (median= 567.37; mean= 584.63; SD=262.46) and LMC from zero to 148.40 (median= 38.31; mean= 44.80; SD=30.93). There was a significant difference between the two groups (P<0.0001; Mann-Whitney Test). Genotype Probability (GP) in all 134 South Brazilian subjects showed that 80% (49/61) of HMC genotypes had the highest chance to belong to HMC group (rates from 1.95 to 8.27x10⁷; mean= 7.92 x 10⁶), and 100% (73/73) of LMC genotypes had the highest chance to belong to the LMC group (rates from 1.46x10⁴ to 7.77x10¹²; mean= 2.02 x 10¹¹). This GP analysis using the current eight SNPs genotyping system showed 91% (122/134) concordance between predicted and observed phenotype (methodology details are available on the supplemental file).

1- HMCSB People: South Brazilian subjects with dark skin and eyes. 2- LMCSB People: South Brazilian subjects with Light skin and blue eyes. We called as allele H for the allele strongly associated with people with high melanin content (HMC; from African populations, see table 1), and as allele L for the allele strongly associated with people with low melanin content (LMC; from European populations, see Table 1). Sensit: sensitivity. Specif: specificity. PV-1: predictive value to hazard of HMC people to have allele H. PV-2: predictive value to hazard of LMC people to have allele L. RR: Relative Ratio. OR: Odds Ratio.

It is still unclear when a pigment-related gene variant is expressed in both skin and iris, or when it has tissue-specific expression. In order to identify differences on genotype-phenotype associations, we studied 116 Snow White-Like subjects (SW – light skin and dark eyes) from South Brazil. Genotype data from HMC, LMC and SW subjects were verified by structuring [Suppl 4] and Factorial Discriminant Analysis (FDA). Snow White-Like subjects were grouped in an intermediate cluster, as expected since they have light skin as LMC subjects and dark eyes as HMCsubjects (Figure 2).

Association Chi-square test was performed comparing SW genotypes with genotype distribution in ALFRED-HMC, ALFRED-LMC, HMC, and LMC Southern Brazilian samples. There were no significant differences between SW genotype frequencies and HMC data in *HERC2* rs12913832 (both have dark eyes), and there were no significant differences between SW genotype frequencies and LMC

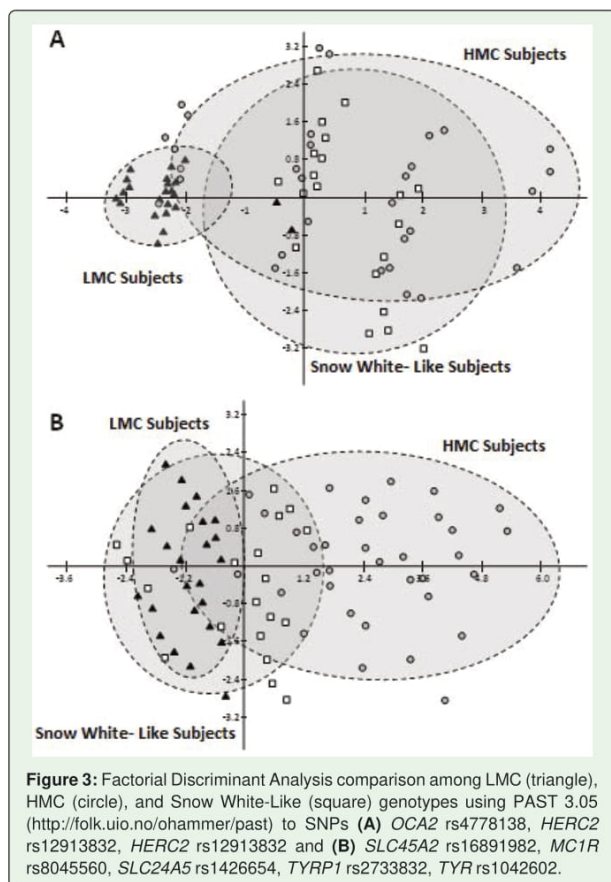


Figure 3: Factorial Discriminant Analysis comparison among LMC (triangle), HMC (circle), and Snow White-Like (square) genotypes using PAST 3.05 (<http://folk.uio.no/ohammer/past>) to SNPs (A) *OCA2* rs4778138, *HERC2* rs12913832, *HERC2* rs12913832 and (B) *SLC45A2* rs16891982, *MC1R* rs8045560, *SLC24A5* rs1426654, *TYRP1* rs2733832, *TYR* rs1042602.

data in *SLC45A2* rs16891982, *MC1R* rs8045560, *SLC24A5* rs1426654, *TYRP1* rs2733832, *TYR* rs1042602 (both have light skin) (Table 5).

Based on these results, two definitive FDA were performed using two separate clusters of loci to group the ones able to express melanin in iris (*HERC2* rs12913832, *OCA2* rs4778138, *HERC2* rs916977, we added *OCA2* and *HERC2* SNPs since they are strongly linked to rs12913832), and the ones able to express melanin in skin (*SLC45A2* rs16891982, *MC1R* rs8045560, *SLC24A5* rs1426654, *TYRP1* rs2733832, and *TYR* rs1042602) (Figure 3). SNPs *HERC2* rs12913832, *OCA2* rs4778138, *HERC2* rs916977 clustered 90% of SW subjects with HMC group and *SLC45A2* rs16891982, *MC1R* rs8045560, *SLC24A5* rs1426654, *TYRP1* rs2733832, *TYR* rs1042602 clustered 82% of SW subjects with LMC group.

Conclusion

The LMC - HMC - SW model was used to analyze eight biallelic SNPs in seven pigment-related genes in an admixture South Brazilian samples. Data revealed that SNPs rs16891982 (*SLC45A2*), rs8045560 (*MC1R*), rs1426654 (*SLC24A5*), rs2733832 (*TYRP1*), rs1042602 (*TYR*) were associated simultaneously with LMC and Snow White

clusters, indicating a link of these SNPs with skin phenotype. SNPs rs4778138 (*OCA2*), rs12913832 (*HERC2*), rs916977 (*HERC2*) were associated with HMC and Snow White clusters, demonstrating a link with eye phenotype. The understanding of gene tissue-specific expression in the externally visible characteristics tissue-specific is important for the prediction of skin and eye color in humans; we believe our analysis is an important contribution to the forensic DNA phenotyping scenario.

Supplemental File

Methodology details are available on the Supplemental File.

Acknowledgments

This work was supported by CAPES Brazil | **Edital 25/2014** | **Pró-Forenses, and CNPqBrasil** | **Edital INCT**. Fernanda Rosa Sawitzki, Rodrigo Rodenbusch, Diego WordellGubert, Eduardo Felipe Ávila da Silva and Deborah Soares Bispo Santos Silva weresupportedby CAPES. The authors would like to thank to Mayara Jorgens Prado, Bruna Schroeder, PietraGraebin and Eduardo Wildemann Capelesso for collection and organization of phenotype data.

References

- Kayser M. Forensic DNA Phenotyping: Predicting human appearance from crime scene material for investigative purposes. *Forensic Sci Int Genet.* 2015; 18: 33-48.
- Sturm RA, Duffy DL, Zhao ZZ, Leite FPN, Stark MS, Hayward NK, et al. A single SNP in an evolutionary conserved region within intron 86 of the *HERC2* gene determines human blue-brown eye color. *Am J Hum Genet.* 2008; 82: 424-431.
- Kondo T, Hearing VJ. Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation. *Expert Rev Dermatol.* 2011; 6: 97-108.
- Visser M, Kayser M, Palstra RJ. *HERC2* rs12913832 modulates human pigmentation by attenuating chromatin-loop formation between a long-range enhancer and the *OCA2* promoter. *Genome Res.* 2012; 22: 446-455.
- Valenzuela RK, Ito S, Wakamatsu K, Brilliant MH. Prediction model validation: normal human pigmentation variation. *J Forensic Res.* 2011; 2: 139.
- Liu F, Wenb B, Kayser M. Colorful DNA polymorphisms in humans. *Semin Cell Dev Biol.* 2013; 24: 562-575.
- Gerstenblith MR, Goldstein AM, Fargnoli MC, Peris K, Landi MT. Comprehensive evaluation of allele frequency differences of *MC1R* variants across populations. *Human Mutat.* 2007; 28: 495-505.
- Vierkötter A, Krämer U, Sugiri D, Morita A, Yamamoto A, Kaneko N, et al. Development of lentiginos in German and Japanese women correlates with variants in the *SLC45A2* gene. *J Invest Dermatol.* 2012; 132: 733-736.
- Alaluf S, Atkins D, Barrett K, Carter N. Ethnic variation in tyrosinase and *TYRP1* expression in photoexposed and photoprotected human skin. *Pigment Cell Res.* 2003; 16: 35-42.
- Chaki M, Sengupta M, Mondal M, Bhattacharya A, Mallick S, Bhadra R, et al. Molecular and functional studies of tyrosinase variants among Indian oculocutaneous albinism type 1 patients. *J Invest Dermatol.* 2011; 131: 260-262.
- Huebinger RM, Garner HR, Barber RC. Pathway genetic load allows simultaneous evaluation of multiple genetic associations. *Burns.* 2010; 36: 787-792.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br