

Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”

UNESP

Eliza Maria Rodrigues Fortes Almeida

Estudo da associação de polimorfismos no gene *MC1R* com cor de pele e cor de cabelo para fins forenses.

Botucatu

2012

Eliza Maria Rodrigues Fortes Almeida

Estudo da associação de polimorfismos no gene MC1R com cor de pele e cor de cabelo para fins forenses.

Trabalho Acadêmico apresentado ao Instituto de Biociências,
Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”,
Campus Botucatu, para obtenção de Bacharel em Ciências Biomédicas.

Orientadora: Prof^a. Dra. Cintia Fridman Rave

Botucatu

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Almeida, Eliza Maria Rodrigues Fortes.

Estudo da associação de polimorfismos no gene MC1R com cor de pele e cor de cabelo para fins forenses / Eliza Maria Rodrigues Fortes Almeida – Botucatu : [s.n.], 2012

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Cintia Fridman Rave

Capes: 20205007

1. Melanina. 2. Fenótipo. 3. Cor da pele. 4. Polimorfismo (Genética). 5. Genética forense. 6. Pigmentação.

Palavras-chave: MC1R; Melanina; Pigmentação humana; Predição de Fenótipos.

Dedicatória

Este trabalho é dedicado primeiramente a Deus, Paizinho que me guiou e iluminou até aqui e permitiu a concretização deste sonho.

À minha Mamis. Tão querida, dedicada, compreensível e presente! Obrigada por sempre me entender e por não medir esforços para que este momento chegasse! Você é maravilhosa!

Aos meus familiares, muito obrigada, pelo investimento, suporte, ajuda e carinho a mim prestados. Obrigada por nunca deixarem de acreditar em mim e no meu potencial.

Aos amigos, agradeço pelo apoio, pelas conversas, pelas lágrimas derramadas e por tantos momentos de alegria!

À tão querida cidade de Botucatu, por me receber e acolher tão bem! Foram muito bons os anos que passei por aí! Lembrarei sempre com carinho desta “Cidade dos Ventos”.

Agradecimentos

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, agradeço por me receber e permitir que meu trabalho fosse realizado em suas dependências.

À Dra. Cintia Fridman Rave, minha orientadora, agradeço pelo crescimento e aprendizado.

Ao Dr. Danilo Moretti Ferreira, pela supervisão e disponibilidade, contribuindo para o sucesso deste trabalho.

À Dra. Fernanda de Toledo Gonçalves, agradeço pela ajuda e dedicação para que este projeto fosse realizado e concluído.

À todos os pertencentes do LIM 40, em especial à Mari Godoy e Priscilla Pardo pelo apoio e suporte durante realização dos procedimentos e análises.

Aos funcionários do Instituto Oscar Freire, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo por estarem sempre dispostos a dar o seu melhor para o sucesso de nossos projetos.

RESUMO

A melanina é um pigmento muito importante para a espécie humana, pois além de definir a cor da pele, olhos e cabelos, está envolvida na proteção à exposição ao sol. Este pigmento possui dois sub-tipos, sendo a feomelanina, responsável pela pigmentação mais clara e a eumelanina, relacionada à pigmentação escura. É devido a esta variação nos tipos de melanina que encontramos tantos fenótipos distintos de cor de pele e cabelos. As variações no gene *MC1R* são descritas como as mais importantes para a diversidade na pigmentação, pois este gene está diretamente relacionado com o complexo processo de síntese de melanina. O uso destas variações para a predição de fenótipos por meio de informações genéticas vem sendo utilizado em países europeus para inferir características físicas de indivíduos a partir de amostras biológicas e, com isso, direcionar buscas de suspeitos de crimes, além de seu uso na identificação de vítimas. Esse estudo teve como objetivo analisar 8 dos principais polimorfismos no gene *MC1R* em uma amostra da população brasileira. Nos 91 indivíduos analisados foram observados com maior frequência os polimorfismos rs1805005:G>T, rs2228479:G>A e rs885479:G>A, relacionados a tipos específicos de cor de pele e cabelos, conforme previamente descrito na literatura. Esses dados indicam a possibilidade de realizar a predição fenotípica por meio de polimorfismos na população brasileira. Entretanto, será necessário analisar um número maior de indivíduos para podermos confirmar essas associações e realizar uma análise estatística mais detalhada.

ABSTRACT

Melanin is a very important pigment to human species, and besides defining skin, eyes and hair color, it is also involved in sun exposure protection. This pigment is classified into two subtypes: pheomelanin, which is responsible for lighter pigmentation and eumelanin, the dark pigment related. Due to this type of melanin variation it is possible to find different phenotypes of hair and skin color. The genetics MC1R variations are described as the most important for diversity in pigmentation, and this gene is directly related to the complex process of melanin synthesis. The use of these variations to phenotype prediction using genetic information has been used in Europe countries to infer physical features from biological samples, with the purpose of directing searches of criminal suspects and victims identification. The aim of this study was to analyze 8 major MC1R polymorphisms in a sample of Brazilian individuals. Analyzing 91 individuals, we observed with higher frequencies the polymorphisms rs1805005:G>T, rs2228479:G>A and rs885479:G>A, which are related to skin and hair colors, as previously showed in literature. These data suggest the possibility of predicting phenotype from genetic polymorphisms in Brazilian population. However it will be necessary to analyze a larger number of individuals to be able to confirm these associations and to perform a more detailed statistical analysis.

Sumário

RESUMO	6
ABSTRACT	7
INTRODUÇÃO	9
JUSTIFICATIVA	14
OBJETIVO	15
CASUÍSTICA E MÉTODOS	15
- Casuística	16
- Métodos	16
- Questionário	16
- Extração de DNA	17
- Amplificação do gene <i>MC1R</i>	17
- Reação de sequenciamento	18
RESULTADOS	19
DISCUSSÃO	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

INTRODUÇÃO

A pigmentação em humanos é um traço fenotípico complexo e muito variável entre indivíduos dentro de uma população ou entre populações e que, em sua maior parte, está sob controle genético (Kayser et al., 2009; Scherer et al., 2010; Sturm, 2009). A principal proteína responsável pela pigmentação da pele, cabelo e olhos é a melanina, um polímero produzido nos melanócitos cutâneos a partir de seu precursor, a tirosina. Esta variação se dá principalmente por variações bioquímicas que afetam o número de melanosomos produzidos, seu tamanho e o tipo de melanina sintetizada (Strum et al., 2004; Sulem et al., 2007), que são: a feomelanina, que está relacionada com a pigmentação vermelha e amarela, abundante em indivíduos de pele clara (ruivos e loiros), e a eumelanina, que é responsável pela pigmentação marrom e preta, presente em indivíduos com pigmentação escura e que tem como principal função a proteção da pele contra a radiação UV (Branicki et al., 2007; Oetting et al., 1999; Scherer *et al.*, 2010).

Tanto a feomelanina quanto a eumelanina são produzidas no processo de melanogênese, que ocorre em organelas chamadas melanosomos. Os eventos iniciais deste processo são catalisados pela enzima tirosinase multifuncional. A síntese da melanina começa com a oxidação enzimática de L-tirosina à L-Dopa, que por sua vez, por oxidação, é convertida em dopaquinona. Com a transformação espontânea da dopaquinona em leucodopacromo e dopacromo inicia-se uma cascata bioquímica, a qual termina com a formação do pigmento escuro chamado eumelanina. A conjugação de dopaquinona com cisteína ou glutathione resulta em cisteinildopa e glutathionildopa, que

passam por uma série de transformações, gerando finalmente um pigmento vermelho-amarelo chamado feomelanina (Rees, 2003; Strum et al., 2004). A proporção entre os tipos de melanina formada depende da atividade da tirosinase e da concentração de cisteína/glutathione. A tonalidade da pele é determinada pelo tipo e nível de melanina e as diferenças observadas, podem ser atribuídas às variações presentes nos genes de controle do processo de pigmentação (Scherer et al., 2010).

Os diversos genes envolvidos no complexo mecanismo de pigmentação em humanos vêm sendo amplamente estudados, com o objetivo de se entender melhor algumas doenças, tais como o melanoma (Kanetsky et al., 2004; Latreille et al., 2009; Williams et al., 2011), além de sua aplicabilidade na área forense, com o objetivo de predição de características fenotípicas. Dentre tantos genes já descritos na literatura, os que mais se destacam são o *MC1R*, mapeado no cromossomo 16 (Branicki et al., 2007; Dessinioti et al., 2011) o *ASIP*, mapeado no cromossomo 20 (Nan et al., 2010; Sulem et al., 2008), além do *OCA2* e *HERC2* (Donnelly et al., 2011; Ramsay et al., 1992; Visser et al., 2012), ambos localizados no cromossomo 15. As proteínas que estes genes codificam, contribuem para o controle da produção de melanina e maturação dos melanossomos, que determinam a pigmentação humana (Han et al., 2008; Scherer et al., 2010).

As variações em genes que codificam as proteínas envolvidas no complexo processo de pigmentação cutânea têm sido amplamente estudadas e são causas bem estabelecidas da diversidade fenotípica da cor da pele, dos cabelos, olhos e da sensibilidade ao sol, mas cujo resultado depende da interação entre vários deles (Branicki et al., 2007; Scherer et al., 2010; Strum et al., 2009). Spichenok et al. (2011) avaliaram polimorfismos de base única (SNPs) dos genes *SLC45A2*, *SLC45A5*, *OCA2*, *ASIP*, *TYR*, e *MC1R*, revelando que populações distintas com cor de pele semelhante, como os

européus e asiáticos (ambos de pele clara, ou seja, predomínio de feomelanina), possuem diferentes variações nos genes de pigmentação. De acordo com os autores deste estudo, essas variações poderiam ser consideradas marcadores de populações específicas, com grande aplicabilidade na área forense. Indivíduos de origem europeia apresentaram maior frequência de variações nos genes *SLC45A2*, com a variante *F374L* (rs16891982); *SLC45A5*, com *T111A* (rs1426654); *HERC2* com o polimorfismo rs12913832 e o *IRF4* (rs12203592), enquanto os Asiáticos apresentaram alterações no *OCA2* (rs1545397) e *MC1R*, com o polimorfismo *R163Q* (rs885479) e os Africanos no gene *ASIP* (rs6119471) (Spichenok et al., 2011). Entretanto, para a cor da íris, foi encontrada uma complexa interação entre os polimorfismos dos genes avaliados. Além disto, não é descartada possibilidade de marcadores adicionais serem descritos no futuro aumentando o poder de discriminação de indivíduos de origens étnicas distintas (Iida et al., 2009; Spichenok et al., 2011).

Outro estudo conduzido por Pośpiech et al. (2011), revelou que polimorfismos nos genes *HERC2* e *OCA2* estariam relacionados à coloração da íris, pois segundo os autores, por variações específicas desses genes seria possível prever com precisão as cores extremas de olhos (preto e azul). Entretanto, as cores intermediárias (verde, mel e castanho) seriam determinadas pelo efeito epistático de diversos genes, incluindo os dois avaliados no estudo, sendo necessária uma análise mais ampla para sua determinação (Pośpiech et al., 2011).

As variações existentes no gene *MC1R* são consideradas como as maiores contribuintes para a diversidade da pigmentação humana (Beaumont et al., 2008; Kayser et al., 2011; Valverde et al., 1995). Este gene se localiza no braço longo do cromossomo 16 (16q24.3), é composto por um único éxon, com tamanho de 951pb

(Branicki et al., 2007; Makova et al., 2005) que codifica uma proteína pertencente à família das proteínas G de receptores acoplados à membrana, levando à produção de eumelanina após a ligação com o hormônio estimulante de melanócitos (α -MSH) (Dessinioti et al., 2011; Parra, 2007; Yuasa et al., 2007). Este gene é considerado altamente polimórfico, apresentando mais de 100 variações descritas na literatura, todas elas resultando em proteínas com sequência bem distintas umas das outras. A variação na cor dos cabelos pode ser explicada pela redução da expressão do receptor de melanocortina na membrana do melanócito (Branicki et al., 2007). O gene *MC1R* possui efeito pleiotrópico, que é a característica de um único gene exercer múltiplos efeitos. Isto pode ser exemplificado em indivíduos que possuem as variantes R142H e R151C que, na maioria das vezes, além do cabelo ruivo possuem pele clara e sardas. Outras variações na expressão do gene causam um fenótipo menos freqüente, em que o indivíduo possui a barba ruiva, apesar de seu cabelo não ser desta cor.

Estudos da coloração dos cabelos revelam que os polimorfismos do gene *ASIP* podem explicar as diferentes tonalidades existentes entre indivíduos de uma população, bem como a sensibilidade da pele ao sol e a presença de sardas (Branicki et al., 2011; Sulem et al., 2008). A proteína ASIP tem função de ligação ao receptor de melanocortina, que é produzida pelo gene *MC1R*, e antagoniza sua função de receptor transmembrana. O polimorfismo g.8818A>G (rs6058017), encontrado no gene *ASIP*, tem sido associado com a presença de cabelo escuro e olhos castanhos em indivíduos caucasianos, demonstrando o papel fundamental do gene na determinação da pigmentação cutânea em diversas populações (Scherer, 2010), principalmente naquelas de origem européia, além de estar relacionada com as diferenças na cor da pele entre as populações de ancestralidade mista de europeus e africanos (Sulem et al., 2008) Quando há menor

expressão de ASIP ocorre à diminuição da inibição da proteína MC1R, e conseqüente aumento da eumelanina e da pigmentação escura (Scherer et al., 2010).

A área forense pode ser muito beneficiada pela predição de fenótipos por meio de informações genéticas. Isso se dá, pois por meio deste método seria possível inferir características físicas de indivíduos por meio da análise direta de amostras biológicas, podendo ser aplicável, por exemplo, no direcionamento de buscas de suspeitos, ou mesmo na caracterização de cadáveres em avançado estado de decomposição (Spichenok, 2011). Levando-se em consideração que pele e cabelo variam muito na população, ao se obter estas informações, seria possível sua associação com um indivíduo específico dentro de um grupo, ou reduzir o grupo a ser investigado. Tem sido demonstrado em várias populações que a análise dos polimorfismos presentes no gene *MC1R* permite inferência correta da pigmentação em mais de 90% das vezes (Branicki et al., 2011; Kayser et al., 2009; Pośpiech et al., 2011). Esta ponte pode ser favorecida ainda mais pelas diferenças genéticas presentes entre diferentes etnias (Branicki et al., 2007).

A análise de polimorfismos em genes que codificam cor de pele, olhos e cabelos é uma técnica já usada em diversos países da Europa visando à predição dessas características fenotípicas a partir de amostras biológicas. Esta técnica já vem sendo usada com indiscutível sucesso, por exemplo, na Holanda, em que já é regulamentada por lei desde 2003 e no Reino Unido, em que, baseado em leis existentes, já está disponível este serviço (Kayser et al., 2009). Os resultados obtidos demonstram que não há restrições quanto à utilização da metodologia, podendo ser aplicada em todas as populações, mesmo naquelas sem origem étnica definida (Spichenok et al., 2011), o que é o caso da população brasileira, além de concluírem que em populações heterogêneas, é possível detectar mais variantes dos genes (Sulem et al., 2007)

O Brasil possui uma das populações mais miscigenadas e heterogêneas do mundo, resultado de vários séculos de cruzamentos entre populações de diferentes origens. Os principais contribuintes para esta mistura foram os colonizadores portugueses, os escravos africanos e os ameríndios autóctones. Quando os colonizadores chegaram às terras brasileiras encontraram uma grande população indígena nativa, e pelo contato entre estes dois povos a miscigenação se iniciou, e seu resultado foi o começo da ocupação do território brasileiro. Uma importante diminuição na população indígena ocorreu por conta de conflitos com os colonizadores e contato com novas doenças. Em meados do século XVI, houve a introdução da escravidão africana no país, o que causou a entrada de indivíduos que contribuíram para o aumento da mistura de populações. Já na virada do século XIX para o XX, outros povos de diversas origens, tais como alemães, espanhóis, árabes, italianos e japoneses, migraram para o território brasileiro, aumentando ainda mais a complexidade étnica, resultando em uma infinidade de cores de pele e cabelos distintos (Alves-Silva et al., 2000).

Assim sendo, este projeto visa à análise de polimorfismos do gene *MC1R* em uma amostra da população brasileira com a finalidade de avaliar o poder de predição de fenótipos ligados a pigmentação com o objetivo de aplicação forense.

JUSTIFICATIVA

Traços fenotípicos como cor de pele e cabelos estão sendo considerados bastante promissores para utilização na identificação humana com fins forenses, já que são visualmente marcantes e de rápida e fácil observação. A pigmentação pode ser considerada muito relevante para a identificação por apresentar uma gama ilimitada de

variações contínuas entre os diferentes indivíduos das mais diversas populações. Sabendo-se que a análise de polimorfismos de genes envolvidos na determinação dessas características é uma técnica já usada em diversos países da Europa com sucesso, a análise desses polimorfismos na população brasileira, conhecida por ser resultante de uma grande miscigenação étnica, se faz necessária para verificar sua aplicabilidade na presente população. Mesmo que esses fenótipos sofram forte influência do ambiente em que se encontram e possam ser mascarados pela coloração artificial dos cabelos ou bronzeamento da pele, o conhecimento do provável fenótipo de um indivíduo, obtido somente a partir da análise genética de uma amostra biológica, pode constituir uma ferramenta adicional e complementar a outros elementos obtidos na investigação, auxiliando na delimitação do rol de pessoas a serem investigadas ou identificadas.

OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi avaliar o poder de predição de características físicas como cor de pele e cabelos a partir de polimorfismos do gene *MC1R*, em uma amostra de 100 indivíduos da população brasileira, com o objetivo de poder usar esses polimorfismos na aplicação forense.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

- Casuística

Foram analisados neste estudo 100 indivíduos voluntários sadios, não aparentados, de ambos os sexos, maiores de 18 anos, provenientes do complexo HC-FMUSP e Fundação Faculdade de Medicina que concordaram em participar da pesquisa após a apresentação do projeto. Os participantes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas.

- Métodos

- Questionário

Os voluntários, que concordaram em participar, foram entrevistados pelo pesquisador. Foi utilizado um questionário como instrumento de avaliação que incluía questões sobre informações sociodemográficas (sexo, idade, renda, grau de escolaridade, local de nascimento), cor da pele e cor do cabelo.

No início da entrevista, os indivíduos foram informados de que o estudo tinha como finalidade a investigação da relação entre características fenotípicas como cor de cabelo e pele com polimorfismos genéticos, e que os dados fornecidos são sigilosos e codificados, não havendo possibilidade de identificação do entrevistado.

Para a classificação da cor de cabelo, os voluntários foram questionados sobre a coloração original dos fios aos 15 anos de idade. Para se obter um padrão e um resultado mais preciso de coloração foi apresentada aos indivíduos uma grade de possíveis cores de cabelo (Figura 1), de forma que dentre as opções, ele apontasse para a cor mais

próxima da que possuía na idade de referência. Para este estudo foi utilizada a informação da auto-referência apontada na grade.

Com relação à cor de pele, os indivíduos responderam qual cor consideravam a sua pele, tendo como opções: Branca, Parda, Negra ou Amarela. As informações coletadas na forma de auto-referência foram utilizadas para classificação e cálculo de frequência com relação à cor de pele.

- Extração de DNA

Amostras de sangue periférico (4ml) dos voluntários foram coletadas em tubos contendo EDTA. A extração do DNA foi realizada pelo processo de *Salting-out*, de acordo com o protocolo de Miller et al. (1988). O DNA extraído foi eluído em tampão TE (Tris-EDTA), quantificado em espectrofotômetro Nanodrop, aliqüotado e armazenado em tubos do tipo eppendorf em freezer -20°C para genotipagem e análise de polimorfismos.

- Amplificação do gene *MC1R*

As amostras foram amplificadas para a totalidade do gene *MC1R*, por meio de uma única reação de PCR, utilizando sequências de oligonucleotídeos (*primers*) descritos por Preising et al. (2011). Os *primers* utilizados para amplificação total dos 951bp do gene *MC1R* foram MC1R-F 5' ACTTAAAGCCGCGTGACCG 3' para a fita *forward* e MC1R-R 5' AGGCCTCCAACGACTCCTTCCT 3' para a fita *reverse*. As reações de PCR totalizavam o volume de 25µl, contendo 50ng de DNA genômico, 5,0 µM de cada *primer*, 10 ul de AmpliTaq Gold® PCR Master Mix e água milli-Q. A ciclagem térmica foi realizada em

termociclador GeneAmp® PCR System 9700 da marca Applied Biosystems®, com condições de desnaturação inicial de 96°C por 11 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação de 95°C por 30 segundos, anelamento de 59°C por 30 segundos e extensão de 72°C por 1 minuto, além de extensão final de 60°C por 45 minutos.

Após este procedimento, os produtos de PCR foram purificados com a utilização de EXO/SAP, conforme instruções do fabricante.

- Reação de sequenciamento

Os produtos de PCR foram sequenciados com a utilização do *BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA), conforme protocolo do fabricante. Para sequenciamento do gene *MC1R* utilizou-se os *primers MC1Ria internal sense* 5' GGTGCTGCAGCAGCTGGACAAT 3' (Preising et al., 2011) e *MC1Rib internal antisense* 5' AGAAGACCACGAGGCACAGCAGGAC 3' (Preising et al., 2011). Após sequenciamento foi realizada eletroforese capilar com a utilização do sequenciador ABI3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA) e os resultados foram analisados em software específico denominado BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>).

Dentre todos os polimorfismos do gene *MC1R* descritos na literatura, foram analisados os 8 principais relacionados à cor de pele e cabelos, a saber: V60L (rs1805005), D84E(rs1805006), V92M (rs2228479), R142H (rs121918719), R151C (rs1805007), I155T (rs1110400), R160W (rs1805008) e R163Q (rs885479) (Valverde et al. 1995; Box et al. 1997; Smith et al. 1998, Rana et al. 1999). Foram realizadas

análises das frequências genotípicas (heterozigotos e homozigotos) e frequências alélicas dos marcadores que apresentaram variação.

RESULTADOS

Inicialmente foi proposta a análise de 100 amostras de indivíduos sadios. Entretanto, por dificuldades técnicas, não foi possível a obtenção do sequenciamento de todos os indivíduos, sendo que a amostra final foi composta por sequências de 91 indivíduos.

Apenas 5 dos 8 polimorfismos avaliados apresentaram o alelo variante na amostra de 91 indivíduos, cuja distribuição pode ser observada na Tabela 1, juntamente com os dados demográficos de interesse. Resumidamente: 12 indivíduos apresentaram apenas o SNP rs1805005:G>T (1 T/T – homozigoto mutado e 11 G/T - heterozigoto), 6 apresentaram apenas o SNP rs2228479:G>A (1 A/A – homozigoto mutado e 5 G/A - heterozigoto), 1 apresentou somente o polimorfismo rs1805007:C>T (C/T – heterozigoto), 1 apresentou o polimorfismo rs1110400:C>T (C/T – heterozigoto), 8 apresentaram o SNP rs885479:G/A (2 A/A – homozigoto mutado e 6 G/A - heterozigoto), 3 apresentaram tanto o SNP rs2228479:G>A quanto o rs885479:G/A (sendo ambos heterozigotos), 2 apresentaram tanto o polimorfismo rs1805005:G>T quanto o rs2228479:G>A (ambos em heterozigose) e 2 apresentaram tanto o SNP rs885479:G/A quanto o SNP rs1805005:G>T (ambos em heterozigose). Todas as mutações acima citadas são do tipo substituição, resultando na mudança do aminoácido formado. Nenhuma variação foi observada para os polimorfismos rs185006,

rs11547464 e rs185008 Os polimorfismos rs1805007 e rs1110400 foram observados em apenas 1 indivíduo cada, em heterozigose (Tabela 1).

Os dados das frequências genóticas e alélicas referentes aos polimorfismos que apresentaram variação podem ser observados na Tabela 2. Os polimorfismos encontrados na amostra de 91 indivíduos estão apresentados na Figura 2.

DISCUSSÃO

Analisando a distribuição do alelo selvagem do SNP rs1805005-G na nossa amostra (Tabela 2) nota-se que o mesmo foi mais frequente em indivíduos de pele amarela e em indivíduos de cabelos loiros. Entretanto, vamos desconsiderar essa associação com a pele amarela devido ao pequeno número de indivíduos nessa classe, o que resulta em uma falsa associação. Já o alelo variante rs1805005-T foi mais frequente em indivíduos de pele branca e cabelos castanhos, o que corrobora com os resultados obtidos por Palmer et al. (2000), nos quais para esta variante foi encontrada associação com cabelos loiros e castanhos, além de estar relacionada com tons claros de pele.

O SNP V60L (rs1805005) é descrito na literatura como o principal determinante de qual tipo de melanina será produzido (feomelanina ou eumelanina). Sua presença tem um efeito negativo sobre a atividade do receptor MC1R, fazendo com que a síntese de melanina seja inibida e formando-se a feomelanina (Latreille et al., 2009). Além disto, este polimorfismo vem sendo classificado como o terceiro principal polimorfismo na taxa de pigmentação dos cabelos (Valenzuela et al, 2010).

Diversos estudos encontraram associação deste polimorfismo com a ocorrência de cabelos ruivos em indivíduos caucasianos na Europa (Beaumont et al., 2007;

Raimondi et al., 2008; Walsh et al., 2013). Entretanto, para populações fora da Europa a distribuição dele é bem distinta, demonstrando baixa penetrância e, conseqüentemente, um efeito muito menor, fazendo com que o fenótipo “cabelos ruivos” seja bem mais raro nestes lugares, em que há esta manifestação somente quando ocorre combinação deste com outros alelos (Walsh et al., 2012). Isto ocorre pois este polimorfismo demonstra a redução da habilidade de ativar a adenil-ciclase durante ao processo de síntese da melanina.

O alelo selvagem do SNP rs2228479-G foi observado em maior frequência em pessoas de pele parda e nos indivíduos com cabelos pretos, enquanto que o alelo A (rs2228479-A) predominou nos fenótipos de pele amarela e cabelos castanhos (Tabela 2). O polimorfismo V92M (rs2228479) está relacionado à intensidade de resposta do cAMP durante a síntese de melanina, na etapa que envolve a formação da tirosinase multifuncional. Quando diminuída, ocorre o aumento da produção de feomelanina, relacionada com cabelos ruivos e pele clara (Beaumont et al., 2007). Entretanto este polimorfismo possui baixa penetrância (Box et al., 1997; Duffy et al., 2004) tendo resposta semelhante àquela verificada em relação ao alelo selvagem (Box et al., 1997), o que explicaria a não observação do fenótipo ruivo nos indivíduos em que se fez presente, tendo como fenótipo os cabelos castanhos. A ocorrência do fenótipo amarelo com relação à cor de pele encontrados também pode ser explicada por este fato, já que a feomelanina está diretamente ligada com a ocorrência deste fenótipo, apesar de que temos que ressaltar o baixo número amostral nessa categoria, podendo acarretar em uma falsa associação.

Quanto ao polimorfismo rs1805007, foi encontrada a variante T em apenas 1 indivíduo de cor branca e cabelos castanhos (Tabela 1), estando em concordância com

outros autores que descrevem sua maior frequência em indivíduos caucasianos (Rana et al., 1999; Beaumont et al., 2007). Com relação a cor dos cabelos, esse polimorfismo é descrito como fortemente associado ao fenótipo cabelos ruivos (Beaumont et al., 2007; Gerstenblith et al., 2007).

A variante I155T (rs1110400:T>C) foi encontrada em 1 indivíduo de pele branca e cabelos loiros, e já foi descrita associada com a presença de cabelos ruivos, porém com baixa penetrância (Pastorino et al., 2004; Raimondi et al., 2008; Quint et al., 2012), o que poderia explicar a ocorrência do polimorfismo sem a manifestação fenotípica inerente. Este polimorfismo também já foi descrito como estando associado à pele clara (Valverde et al. 1995; Smith et al. 1998; Flanagan et al. 2000), concordando com o resultado obtido no nosso estudo. Apesar disto, nesses dois últimos polimorfismos não é possível avaliar a capacidade de predição ou associação dos mesmos com as características fenotípicas devido a baixa frequência dentro da amostra analisada.

Com relação à frequência do SNP rs885479, indivíduos de pele negra não apresentaram o alelo variante A, sendo todos homozigotos GG. Esse alelo também se apresentou em maior frequência em indivíduos com cabelos pretos. O alelo A foi mais frequente em indivíduos de pele amarela e em indivíduos de cabelos loiros.

Esse polimorfismo (rs885479) foi descrito em alta frequência na população do leste da Ásia (japoneses e chineses); na população europeia, por sua vez, as variações acontecem, mas são pouco frequentes; já em africanos é um locus bastante estável, sendo raramente observada a presença da variante (Spichenock et al, 2010; Walsh et al., 2012). Nossos resultados parecem confirmar esses dados, pois a maior frequência do polimorfismo foi observada nos indivíduos de pele amarela, e em indivíduos com cabelos loiros, fenótipo bastante comum em pessoas de origem europeia. Além disto,

para o alelo selvagem (G) foi observada a maior frequência em indivíduos de cor de pele negra, na qual a taxa de mutação do alelo é bastante rara.

Alguns dos polimorfismos descritos foram encontrados associados, de forma que um mesmo indivíduo apresentou dois deles simultaneamente. Os dois indivíduos que apresentaram as variantes V60L (rs1805005) e V92M (rs2228479) relataram a cor de seus cabelos como castanho e a cor de sua pele como branca. Além desta associação, foram encontrados simultaneamente os polimorfismos V60L(rs1805005) e R163Q (rs885479), em dois indivíduos de cabelos castanhos e quanto à cor de pele, um possuía a coloração branca e o outro, parda. Segundo Beaumont et al. (2007), estes três polimorfismos (rs1805005, rs2228479, rs885479), mesmo quando associados entre si, possuem baixa penetrância, podendo ocorrer a manifestação de seus respectivos fenótipos selvagens mesmo com a presença do polimorfismo.

Nas análises deste estudo foi encontrada a presença dos polimorfismos V92M (rs2228479) e R163Q (885479) simultaneamente em três indivíduos, dois com pele amarela e cabelos castanhos e um com pele branca e cabelos castanhos. Na literatura, não foram encontradas referências desta associação, nem das alterações fenotípicas que a mesma possa gerar. Uma possível explicação seria a miscigenação da população brasileira, que permitiu, por sua grande diversidade étnico-racial, que estes dois SNPs não relacionados entre si estivessem presentes em um mesmo indivíduo.

Diante dos resultados obtidos na análise de 91 indivíduos da população brasileira pudemos observar associações previamente descritas na literatura, referente a diferentes populações, assim como novas associações, nos levando a crer que esses polimorfismos servirão para predições de fenótipos relacionados à pigmentação também na nossa população. Entretanto, devido ao baixo número de indivíduos em

algumas das sub-categorias analisadas, não é possível afirmar que essas associações sejam estatisticamente significantes. Ainda devido ao baixo número amostral dessas categorias não foi realizada a análise estatística completa, para que não houvesse a apresentação de possíveis resultados falso-positivos. Uma vez que esse projeto é apenas uma parte de um projeto maior que engloba a análise de 600 indivíduos e outros quatro genes, as análises estatísticas formais e as análises de regressão em relação a associação de mais de um polimorfismo serão realizadas na amostra total para que os resultados sejam reais.

Tabela 1: Resultados obtidos na análise de 91 indivíduos em relação a dados de cor de pele, cor de cabelo e polimorfismos do gene *MC1R*

ID				PELE		CABELOS		ID SNP	rs	rs	rs	rs	rs	rs	rs	rs
	DATA DA COLETA	SEXO	IDADE	AUTO REF.	AUTO REF.	GRADE	Troca de aminoácido	1805005	1805006	2228479	11547464	1805007	1110400	1805008	885479	
								Troca de base	V60L	D84E	V92M	R142H	R151C	I155T	R160W	R163Q
									G>T	A>C	A>G	A>G	C>T	T>C	C/T	G>A
002	26.03.2012	F	30	Branco	Castanho	Castanho										
003	27.03.2012	F	49	Branco	Castanho	Castanho										
004	27.03.2012	M	59	Branco	Castanho	Castanho										
005	27.03.2012	F	24	Branco	Preto	Preto										G/A
007	28.03.2012	F	26	Branco	Castanho	Loiro										A/A
008	28.03.2012	F	27	Pardo	Castanho	Castanho										
011	03.04.2012	M	26	Amarelo	Castanho	Castanho				G/A						G/A
012	29.03.2012	F	22	Branco	Castanho	Castanho										
015	04.04.2012	F	63	Amarelo	Castanho	Loiro										
019	17.06.2012	F	29	Branco	Loiro	Loiro										
020	19.06.2012	F	61	Negro	Castanho	Castanho				A/A						
023	23.07.2012	F	22	Branco	Loiro	Loiro										
025	24.07.2012	F	30	Branco	Castanho	Castanho				G/A						
028	24.07.2012	F	33	Branco	Castanho	Castanho										
029	24.07.2012	M	26	Branco	Preto	Castanho										
030	24.07.2012	F	24	Branco	Castanho	Castanho										
031	24.07.2012	F	36	Pardo	Castanho	Castanho										
032	24.07.2012	M	31	Branco	Castanho	Castanho		G/T		G/A						
034	25.07.2012	F	31	Branco	Castanho	Castanho		G/T		G/A						
038	25.07.2012	F	34	Pardo	Castanho	Castanho						C/T				
039	25.07.2012	F	27	Branco	Castanho	Castanho										
040	25.07.2012	F	35	Amarelo	Castanho	Castanho				G/A						G/A

Continuação Tabela 1: Resultados obtidos na análise de 91 indivíduos em relação a dados de cor de pele, cor de cabelo e polimorfismos do gene *MC1R*

ID	DATA DA COLETA	SEXO	IDADE	PELE		CABELOS		ID SNP	rs	rs	rs	rs	rs	rs	rs	rs
				AUTO REF.	AUTO REF.	GRADE	1805005		1805006	2228479	11547464	1805007	1110400	1805008	885479	
							Troca de aminoácido		V60L	D84E	V92M	R142H	R151C	I155T	R160W	R163Q
							Troca de base		G>T	A>C	A>G	A>G	C>T	T>C	C/T	G>A
067	01.08.2012	M	45	Branco	Preto	Castanho										
068	01.08.2012	F	29	Branco	Castanho	Castanho		G/T								
069	01.08.2012	F	34	Pardo	Castanho	Castanho										G/A
070	01.08.2012	M	38	Pardo	Castanho	Castanho										
073	07.08.2012	M	50	Branco	Castanho	Castanho					G/A					
074	07.08.2012	M	42	Negro	Preto	Preto										
075	07.08.2012	M	60	Branco	Castanho	Castanho										
077	08.08.2012	M	48	Pardo	Preto	Castanho										
078	08.08.2012	M	34	Pardo	Preto	Castanho										
079	08.08.2012	M	44	Branco	Loiro	Loiro										
080	08.08.2012	M	18	Pardo	Preto	Preto		G/T								
081	08.08.2012	M	27	Branco	Castanho	Castanho		G/T								
082	08.08.2012	M	54	Pardo	Castanho	Castanho										
083	08.08.2012	M	42	Negro	Castanho	Castanho		G/T								
084	08.08.2012	F	49	Pardo	Preto	Castanho										
085	08.08.2012	M	62	Branco	Castanho	Loiro										G/A
086	08.08.2012	M	62	Branco	Castanho	Castanho										
087	08.08.2012	M	51	Branco	Castanho	Castanho										G/A
089	08.08.2012	F	48	Negro	Preto	Preto										
095	09.08.2012	M	29	Branco	Loiro	Loiro										
097	09.08.2012	F	36	Branco	Castanho	Castanho										
101	09.08.2012	F	33	Pardo	Castanho	Castanho					G/A					

Continuação Tabela 1: Resultados obtidos na análise de 91 indivíduos em relação a dados de cor de pele, cor de cabelo e polimorfismos do gene *MC1R*

ID	DATA DA COLETA	SEXO	IDADE	PELE		CABELOS		ID SNP	rs 1805005	rs 1805006	rs 2228479	rs 11547464	rs 1805007	rs 1110400	rs 1805008	rs 885479	
				AUTO REF.	AUTO REF.	GRADE	Troca de aminoácido	V60L	D84E	V92M	R142H	R151C	I155T	R160W	R163Q		
							Troca de base	G>T	A>C	A>G	A>G	C>T	T>C	C/T	G>A		
130	18.09.2012	M	31	Pardo	Preto	Castanho		G/T									G/A
131	18.09.2012	F	47	Pardo	Castanho	Castanho											

Tabela 2: Frequência alélica e genotípica dos polimorfismos rs1805005, rs2228479 e rs885479 na amostra de 91 indivíduos, agrupados em subcategorias em relação à cor de cabelos e pele.

Fenótipo		POLIMORFISMOS																	
		rs1805005: G>T						rs2228479:G>A						rs885479:G>A					
		N	%	G/G	G/T	T/T	G	T	G/G	G/A	A/A	G	A	G/G	G/A	A/A	G	A	
Pele	Branca	52	0,57	0,77	0,21	0,02	0,88	0,13	0,90	0,10	0,00	0,95	0,05	0,84	0,12	0,04	0,90	0,10	
	Parda	26	0,29	0,88	0,12	0,00	0,94	0,06	0,96	0,04	0,00	0,98	0,02	0,88	3,18	0,00	0,94	0,06	
	Negra	9	0,10	0,89	0,11	0,00	0,94	0,06	0,89	0,00	0,11	0,89	0,11	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	
	Amarela	4	0,04	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,50	0,50	0,00	0,75	0,25	0,25	0,50	0,25	0,50	0,50	
Cabelos	Loiros	16	0,18	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,94	0,06	0,00	0,97	0,03	0,81	0,13	0,06	0,88	0,13	
	Castanhos	65	0,71	0,78	0,20	0,02	0,90	0,12	0,86	0,12	0,02	0,92	0,08	0,86	0,12	0,02	0,92	0,08	
	Pretos	10	0,11	0,80	0,20	0,00	0,90	0,10	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,90	0,90	0,10	0,95	0,05	

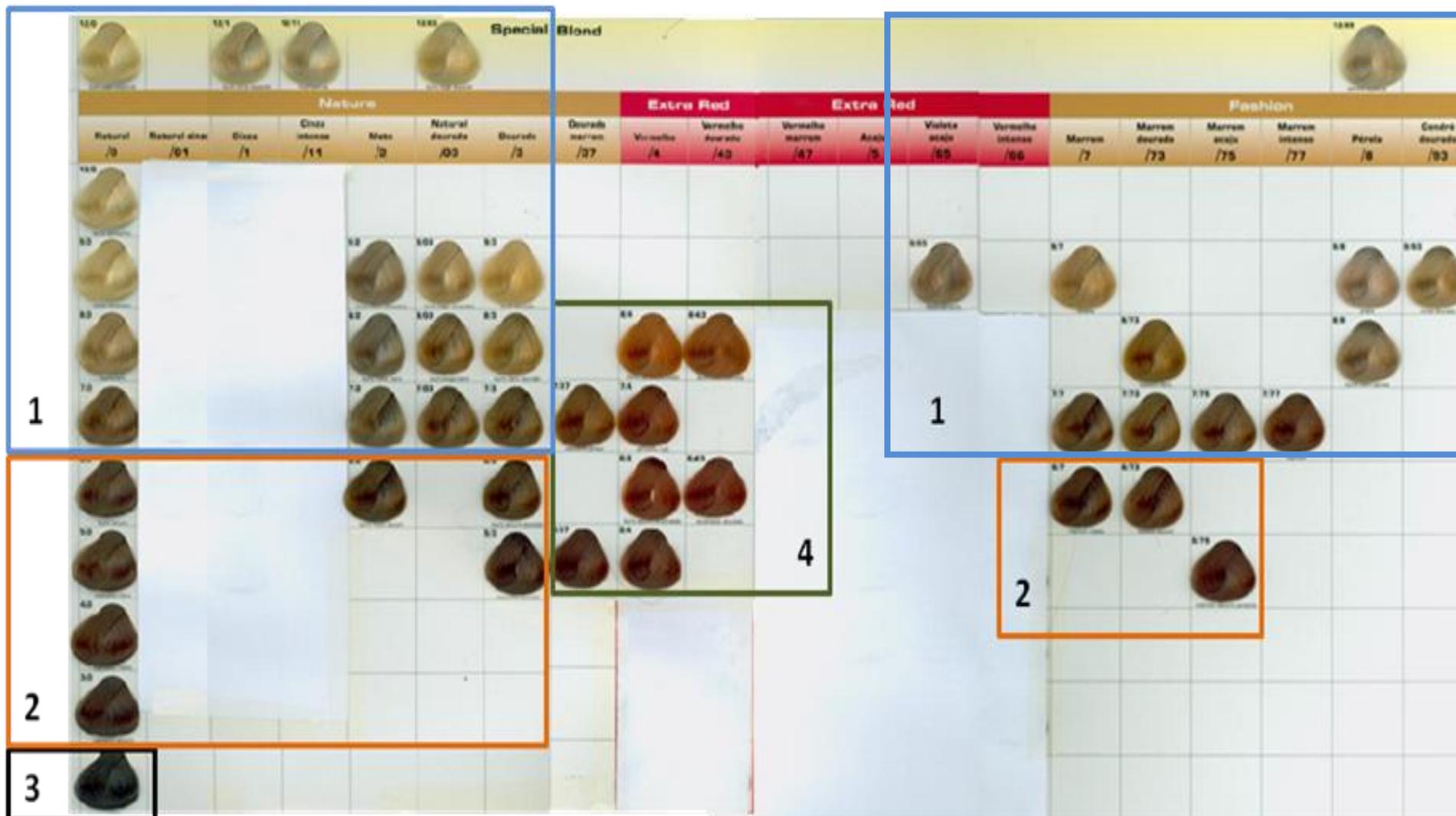


Figura 1: Grade de referência apresentada aos voluntários com relação às cores de cabelos. Para fins de classificação, as tonalidades foram arranjadas em 4 grupos: (1) Tons Loiros; (2) Tons Castanhos; (3) Tons Pretos; e (4) Tons Ruivos

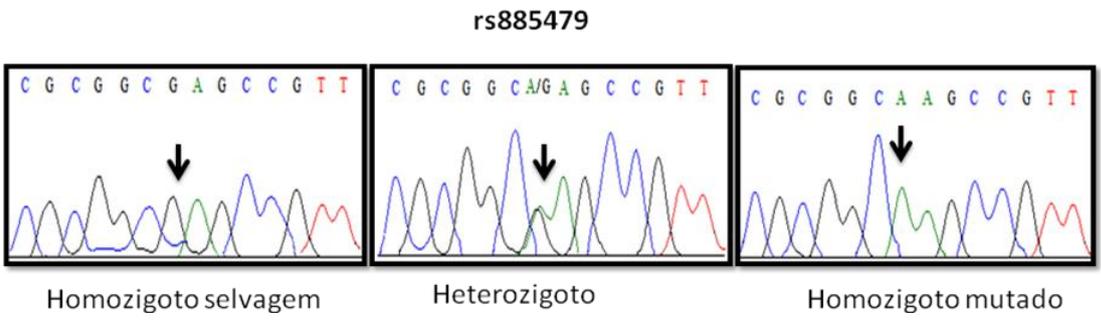
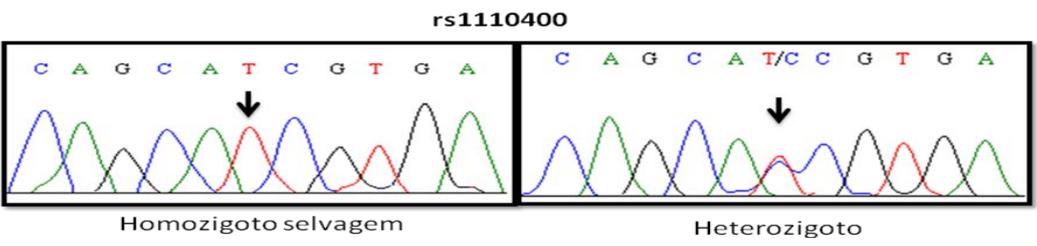
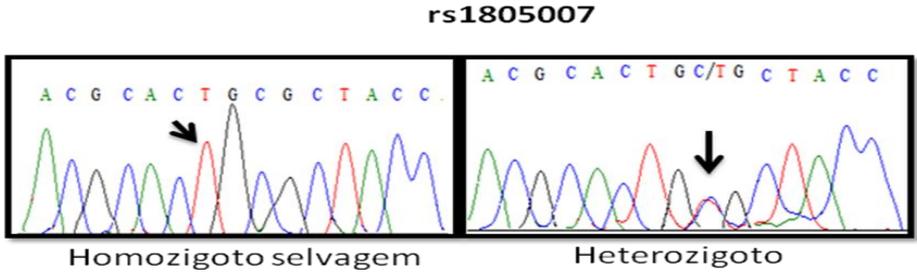
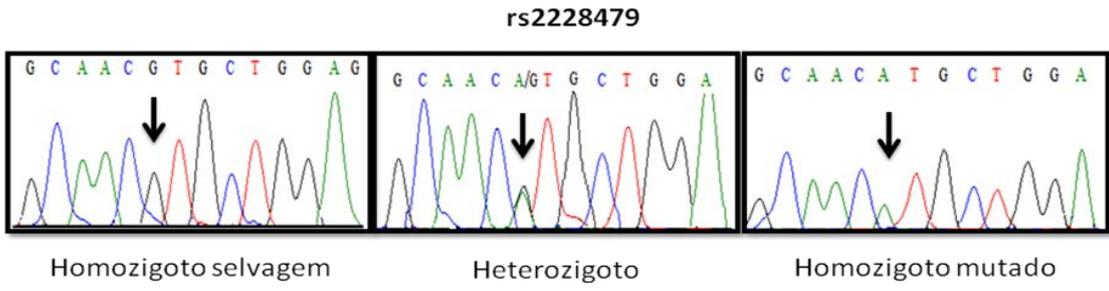
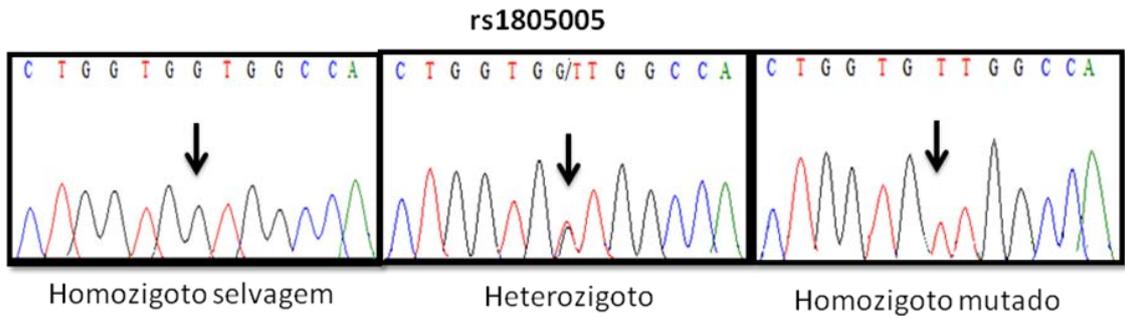


Figura 2 - Representação dos polimorfismos encontrados neste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimarães PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, Prado VF. The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages. *Am J Hum Genet* 2000; (2):444-61.

Beaumont KA, Shekar SN, Newton RA, James MR, Stow JL, Duffy DL, Sturm RA. Receptor function, dominant negative activity and phenotype correlations for *MC1R* variant alleles. *Hum Mol Genet* 2007;16(18):2249-60.

Beaumont KA, Shekar SN, Cook AL, Duffy DL, Sturm RA. Red hair is the null phenotype of *MC1R*. *Hum Mutat.* 2008; (8):E88-94.

Box NF, Wyeth JR, O'Gorman LE, Martin NG, Sturm RA. Characterization of melanocyte stimulating hormone receptor variant alleles in twins with red hair. *Hum Mol Genet* 1997; (11):1891-7.

Branicki W, Brudnik U, Kupiec T, Wolańska-Nowak P, Wojas-Pelc A. Determination of Phenotype Associated SNPs in the *MC1R* Gene. *J Forensic Sci.* 2007;52(2):349-54.

Branicki W, Liu F, van Duijn K, Draus-Barini J, Pośpiech E, Walsh S, Kupiec T, Wojas-Pelc A, Kayser M. Model-based prediction of human hair color using DNA variants. *Hum Genet* 2011;129(4):443-54.

Dessinioti C, Antoniou C, Katsambas A, Stratigos AJ. Melanocortin 1 receptor variants: functional role and pigmentary associations. *Photochem Photobiol.* 2011;87(5):978-87.

Donnelly MP, Paschou P, Grigorenko E, Gurwitz D, Barta C, Lu RB, Zhukova OV, Kim JJ, Siniscalco M, New M, Li H, Kajuna SL, Manolopoulos VG, Speed WC, Pakstis AJ, Kidd JR, Kidd KK. A global view of the OCA2-HERC2 region and pigmentation. *Hum Genet* 2011;131(5):683-96

Duffy DL, Box NF, Chen W, Palmer JS, Montgomery GW, James MR, Hayward NK, Martin NG, Sturm RA. Interactive effects of *MC1R* and *OCA2* on melanoma risk phenotypes. *Hum Mol Genet* 2004;13(4):447-61.

Flanagan N, Healy E, Ray A, Philips S, Todd C, Jackson IJ, Birch-Machin MA, Rees JL. Pleiotropic effects of the melanocortin 1 receptor (*MC1R*) gene on human pigmentation. *Hum Mol Genet* 2000; 9:2531-37.

Gerstenblith MR, Goldstein AM, Fagnoli MC, Peris K, Landi MT. Comprehensive evaluation of allele frequency differences of *MC1R* variants across populations. *Hum Mutat.* 2007; 28: 495-505

Han J, Kraft P, Nan H, Guo Q, Chen C, Qureshi A, Hankinson SE, Hu FB, Duffy DL, Zhao ZZ, Martin NG, Montgomery GW, Hayward NK, Thomas G, Hoover RN, Chanock S, Hunter DJ. A genome-wide association study identifies novel alleles associated with hair color and skin pigmentation. *PLoS Genet* 2008;4(5):e1000074.

Iida R, Ueki M, Takeshita H, Fujihara J, Nakajima T, Kominato Y, Nagao M, Yasuda T. 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.* 2009; 27(5):323-7.

Kanetsky PA, Ge F, Najarian D, Swoyer J, Panossian S, Schuchter L, Holmes R, Guerry D, Rebbeck TR. Assessment of Polymorphic Variants in the Melanocortin-1 Receptor Gene with Cutaneous Pigmentation Using an Evolutionary Approach. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13(5):808-19.

Kayser M, Schneider PM. DNA-based prediction of human externally visible characteristics in forensics: motivations, scientific challenges, and ethical considerations. *Forensic Sci Int Genet* 2009;3(3):154-61.

Kayser M, de Knijff P. Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. *Nat Rev Genet* 2011; 12(3):179-92.

Latreille J, Ezzedine K, Elfakir A, Ambroisine L, Gardinier S, Galan P, Hercberg S, Gruber F, Rees J, Tschachler E, Guinot C. *MC1R* gene polymorphism affects skin color and

phenotypic features related to sun sensitivity in a population of French adult women. *Photochem Photobiol.* 2009; 85(6):1451-8.

Makova K, Norton H. Worldwide polymorphism at the *MC1R* locus and normal pigmentation variation in humans. *Peptides.* 2005; 26(10):1901-8.

Miller AS, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16(3): 1215.

Nan H, Qureshi AA, Han J. Melanoma susceptibility variants on chromosome 20q11.22 are associated with pigmentary traits and the risk of nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol* (2010) 162(2):461-63.

Oetting WS, King RA. Molecular basis of albinism: mutations and polymorphisms of pigmentation genes associated with albinism. *Hum Mutat.* 1999;13(2):99-115.

Palmer JS, Duffy DL, Box NF, Aitken JF, O'Gorman LE, Green AC, Hayward NK, Martin NG, Sturm RA. Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype? *Am J Hum Genet* 2000; 66(1):176-86.

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

Pastorino L, Cusano R, Bruno W, Lantieri F, Origone P, Barile M, Gliori S, Shepherd GA, Sturm RA, Bianchi-Scarra G. Novel *MC1R* variants in Ligurian melanoma patients and controls. *Hum Mutat.* 2004; 24(1):103.

Pośpiech E, Draus-Barini J, Kupiec T, Wojas-Pelc A, Branicki W. Gene-gene interactions contribute to eye colour variation in humans. *J Hum Genet* 2011;56(6):447-55.

Preising MN, Forster H, Gonser M, Lorenz B. Screening of *TYR*, *OCA2*, *GPR143*, and *MC1R* in patients with congenital nystagmus, macular hypoplasia, and fundus hypopigmentation indicating albinism. *Mol Vis.* 2011;17:939-48.

Quint KD, van der Rhee JI, Gruis NA, Ter Huurne JA, Wolterbeek R, van der Stoep N, Bergman W, Kukutsch NA. Melanocortin 1 Receptor (*MC1R*) Variants in High Melanoma Risk Patients are Associated with Specific Dermoscopic ABCD Features. *Acta Derm Venereol.* 2012; 92(6):587-92.

Raimondi S, Sera F, Gandini S, Iodice S, Caini S, Maisonneuve P, Fargnoli MC. *MC1R* variants, melanoma and red hair color phenotype: a meta-analysis. *Int J Cancer.* 2008; 122(12):2753-60.

Ramsay M, Colman MA, Stevens G, Zwane E, Kromberg J, Farrall M, Jenkins T. Am J Hum Genet The tyrosinase-positive oculocutaneous albinism locus maps to chromosome 15q11.2-q12. *Am. J. Hum. Genet* 1992;51(4):879-84.

Rana BK, Hewett-Emmett D, Jin L, Chang BH, Sambuughin N, Lin M, Watkins S, Bamshad M, Jorde LB, Ramsay M, Jenkins T, Li WH. High polymorphism at the human melanocortin 1 receptor locus. *Genetics*. 1999; 151(4):1547-57.

Rees JL. Genetics of hair and skin color. *Annu Rev Genet*2003;37:67-90.

Scherer D, Kumar R. Genetics of pigmentation in skin cancer — A review, *Mutat Res*. 2010;705(2):141-53.

Smith R, Healy E, Siddiqui S, Flanagan N, Steijlen PM, Rosdahl I, Jacques JP, Rogers S, Turner R, Jackson IJ, Birch-Machin MA, Rees JL. Melanocortin 1 receptor variants in an Irish population. *J Invest Dermatol*. 1998; 111(1):119-22.

Spichenok O, Budimlija ZM, Mitchell AA, Jenny A, Kovacevic L, Marjanovic D, Caragine T, Prinz M, Wurmbach E. Prediction of eye and skin color in diverse populations using seven SNPs. *Forensic Sci Int Genet*2011;5(5):472-8.

Sturm RA. Molecular genetics of human pigmentation diversity. *Hum Mol Genet*2009;18(R1):R9-17.

Sturm RA, Frudakis TN. Eye colour: portals into pigmentation genes and ancestry. *Trends Genet*2004;20(8):327-32.

Sulem P, Gudbjartsson DF, Stacey SN, Helgason A, Rafnar T, Jakobsdottir M, Steinberg S, Gudjonsson SA, Palsson A, Thorleifsson G, Pálsson S, Sigurgeirsson B, Thorisdottir K, Ragnarsson R, Benediktsdottir KR, Aben KK, Vermeulen SH, Goldstein AM, Tucker MA, Kiemenev LA, Olafsson JH, Gulcher J, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. Two newly identified genetic determinants of pigmentation in Europeans. *Nat Genet* 2008;40(7):835-7.

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. Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. *Nat Genet* 2007;39(12):1443-52.

Valverde P, Healy E, Jackson I, Rees JL, Thody AJ. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet* 1995;11(3):328-30.

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(3):446-55

Walsh S, Liu F, Wollstein A, Kovatsi L, Ralf A, Kosiniak-Kamysz A, Branicki W, Kayser M. The HirisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA. *Forensic Sci Int Genet* 2013 Jan;7(1):98-115. doi: 10.1016/j.fsigen.2012.07.005. Epub 2012 Aug 20.

Williams PF, Olsen CM, Hayward NK, Whiteman DC. Melanocortin- 1-receptor and risk of cutaneous melanoma: a meta-analysis and estimates of population burden. *Int J Cancer*. 2011;129(7):1730-40 .

Yuasa I, Umetsu K, Harihara S, Kido A, Miyoshi A, Saitou N, Dashnyam B, Jin F, Lucotte G, Chattopadhyay PK, Henke L, Henke J. Distribution of Two Asian-Related Coding SNPs in the *MC1R* and *OCA2* Genes. *Biochem Genet* 2007;45(7-8):535-42