



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

CARLA DAIANA DEMKIO VOLASKO KRAUSE

**Estudo da Variabilidade da Região Promotora do Gene *PAX3* e sua Influência na
Pigmentação Humana**

Porto Alegre

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

CARLA DAIANA DEMKIO VOLASKO KRAUSE

**Estudo da Variabilidade da Região Promotora do Gene *PAX3* e sua Influência na
Pigmentação Humana**

Trabalho de conclusão de curso
de graduação como requisito
parcial para obtenção do grau de
bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria
Cátira Bortolini

Co-orientador: Me. Caio Cesar
Silva de Cerqueira

Porto Alegre

2013

CARLA DAIANA DEMKIO VOLASKO KRAUSE

**Estudo da Variabilidade da Região Promotora do Gene *PAX3* e sua Influência na
Pigmentação Humana**

Trabalho de conclusão de curso
de graduação como requisito
parcial para obtenção do grau de
bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria
Cátira Bortolini

Co-orientador: Me. Caio Cesar
Silva de Cerqueira

Aprovado pela banca examinadora em Julho de 2013.

Profa. Dra. Maria Cátira Bortolini

Orientadora – UFRGS

Dra. Virginia Ramallo

UFRGS

Dra. Gislene Lopes Gonçalves

UFRGS

AGRADECIMENTOS

À professora Maria Cátira Bortolini, pela orientação e pela oportunidade que me deu de participar do CANDELA.

À Tábita Hünemeier, por ter dado a ideia e o incentivo de fazer esse trabalho sobre o *PAX3*.

Ao Caio Cerqueira e à Vanessa Rodrigues Paixão Côrtes, por todo o conhecimento que me passaram, pela excelente orientação e pela atenção que dedicaram a mim durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Evolução Humana e Molecular, especialmente à Pamela Paré da Rosa, pela contribuição para o meu aprendizado sobre os *softwares* de alinhamento, e ao Rafael Bisso Machado, pela ajuda que me deu com as dicas de formatação.

A minha família, ao Mulder e especialmente ao Jevson Dalsochio, pelo carinho, compreensão e incentivo dedicados a mim em todos os momentos dessa jornada.

RESUMO

A pigmentação humana varia de maneira marcante entre as diferentes populações, sendo que por trás desta variação há uma rede complexa de genes. Um destes genes é o *PAX3*, que está envolvido na proliferação, migração e diferenciação dos melanoblastos (células precursoras dos melanócitos) da crista neural para a pele, folículos pilosos e olhos. O objetivo desse trabalho foi verificar a variabilidade molecular da região 5' UTR do gene *PAX3* e sua possível associação com fenótipos de pigmentação (cor de pele, olhos e cabelos) em uma amostra da população brasileira. Foram analisados 108 indivíduos (54 gaúchos e 54 baianos) classificados qualitativamente em 5 categorias para cor de olhos e 4 categorias para cor dos cabelos. Para a cor da pele, o índice de melanina foi medido por um espectrofotômetro de reflectância, cuja escala de cor varia de 20 a 100. Inicialmente, foi feito o desenho dos *primers* específicos para amplificar a região de interesse do *PAX3*, que foi posteriormente sequenciada. Foram encontradas 4 mutações já descritas (rs28945085, rs16863657, rs10193524 e rs45487501) e uma mutação nova (posição chr2:223164038-223164039). As frequências alélicas e genótípicas estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Na análise de associação, somente o polimorfismo rs45487501 foi associado com cor de cabelo ($\chi^2 = 9,004$; $p = 0,03$). O polimorfismo rs45487501, por sua vez, embora não associado até o momento com nenhum fenótipo de pigmentação, está reportado no banco de dados MSV3d (*database of human MisSense Variants mapped to 3D protein structure*) como uma alteração de base única que leva a alterações na estrutura 3D da proteína *PAX3*. Vale ressaltar que este SNP está localizado na região 5'UTR do gene e esta pode envolver segmentos e sítios com outras funções antes do que regulatórias. Sendo assim, é provável que esta mutação esteja envolvida na geração de variabilidade no fenótipo de coloração de cabelos nos indivíduos amostrados. Ainda que o gene *PAX3* já tenha sido amplamente associado a condições patológicas que levam a alterações na cor dos cabelos em humanos (exemplo, Síndrome de Waardenburg), e nos padrões de manchas nos pelos dos equinos, nosso trabalho é o primeiro a evidenciar a associação entre uma mutação deste gene e um fenótipo de pigmentação de cabelos normal.

PALAVRAS-CHAVE: Pigmentação. Gene *PAX3*. Polimorfismo. Sequenciamento.

ABSTRACT

The human pigmentation varies markedly among populations, and behind this variation there is a complex web of genes. One of these genes is the *PAX3*, which is involved in the proliferation, migration and differentiation of melanoblasts (melanocyte precursor cells), from the neural crest to skin, hair follicles and eyes. The main objective of this study was to investigate the molecular variability of the 5'UTR region of the *PAX3* and its possible association with phenotypes of pigmentation (skin, eyes and hair color) in two Brazilian samples. We analyzed 108 individuals (54 from Rio Grande do Sul and 54 from Bahia), qualitatively classified into 5 and 4 categories for eyes and hair color, respectively. For the skin color, the level of melanin was measured by a reflectance spectrophotometer whose color scale ranges from 20 to 100. Initially, specific primers were designed to amplify the region of interest of *PAX3*, which was sequenced. Four mutations already described (rs28945085, rs16863657, rs10193524 and rs45487501), as well as a new mutation (chr2 position: 223164038-223164039) were found. Allelic and genotype frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium. The association analysis revealed that only the rs45487501 polymorphism was associated with hair color ($\chi^2 = 9.004$, $p = 0.03$). The polymorphism rs45487501, on the other hand, although not yet associated with any pigmentation phenotype, is reported in the database MSV3d (*database of human MisSense Variants mapped to 3D protein structure*), as a substitution that promotes alterations in 3D structure of the *PAX3*. It is noteworthy that this SNP is located at 5'UTR gene region, which can involve segments and sites with other functions rather than regulatory. Thus, this mutation is likely to be involved in the generation of the hair color variability in our sample. Although the *PAX3* gene has already been widely associated with pathological conditions that lead to changes in hair color in humans (for instance, Waardenburg syndrome), and patterns of spots in equines, our work is the first to show association between this SNP and the normal hair phenotype pigmentation.

KEYWORDS: Pigmentation. *PAX3* gene. Polymorphism. Sequencing.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	7
1.1	PIGMENTAÇÃO.....	7
1.2	GENE PAX3.....	7
2	OBJETIVOS.....	10
3	METODOLOGIA.....	11
3.1	AMOSTRAS DE ESTUDO.....	11
3.2	DADOS FENOTÍPICOS.....	11
3.3	EXTRAÇÃO DE DNA, PCR E SEQUENCIAMENTO.....	12
3.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	12
4	RESULTADOS.....	14
4.1	SEQUENCIAMENTO.....	14
4.2	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	16
5	DISCUSSÃO.....	27
6	CONCLUSÃO.....	30
7	FINANCIAMENTO.....	31
	REFERÊNCIAS.....	32

1 INTRODUÇÃO

1.1 PIGMENTAÇÃO

Entender a base genética que está envolvida na variação normal da pigmentação da pele, olhos e cabelos tem sido o motivo de várias pesquisas nos últimos anos. Esses estudos buscam identificar a relação de variantes genéticas com o desenvolvimento de doenças tais como o câncer de pele e algumas anomalias na pigmentação, bem como entender a presença de algum componente adaptativo na extensa variação de pigmentação encontrada entre populações humanas.

A pigmentação é o resultado da síntese de melanina, que ocorre nos melanócitos e é armazenada em vesículas denominadas melanossomos. Essas células são encontradas na epiderme, no bulbo capilar e na íris. A variação na pigmentação humana está relacionada ao tipo de melanina produzida, bem como ao tamanho, número e densidade de melanossomos e também ao pH do ambiente melanossomal. Existem dois tipos principais de melanina: a eumelanina, que produz uma coloração no espectro castanho/preto, e a feomelanina, responsável pela coloração no espectro amarelo/vermelho. Peles escuras estão associadas a uma quantidade maior de eumelanina e apresentam maior proteção contra os danos causados pela radiação UV, enquanto que em peles mais claras ocorre o contrário (Nan *et al.*, 2009).

Muitos genes já foram identificados como tendo papel relevante na rota da pigmentação humana. Porém, ainda pouco se sabe sobre eles e seus efeitos na pigmentação normal e na susceptibilidade de doenças relacionadas (Fernandez *et al.*, 2009). Sabe-se que os genes candidatos à pigmentação atuam em diferentes fases do processo da melanogênese, bem como sobre a estabilização e o transporte de enzimas durante a síntese, a produção e a manutenção dos melanossomos e o balanço entre a síntese de diferentes tipos de melanina. Um desses genes é o *PAX3*, um dos nove genes da família *PAX* presentes em primatas e outros vertebrados, que já vem sendo alvo de estudos pelo nosso grupo de pesquisa há vários anos (Pereira *et al.*, 2006; Paixão-Côrtes *et al.*, 2011a, 2011b).

1.2 GENE *PAX3*

Os genes *PAX* desempenham um papel crítico na formação de tecidos e de órgãos durante o período embrionário, sendo eles também importantes para a manutenção da função normal de certas células após o nascimento. Os genes *PAX* codificam fatores de transcrição que fornecem instruções para síntese de proteínas que se ligam a áreas específicas do DNA. Ao fazerem isso, essas proteínas ajudam a controlar a atividade de outros genes, inclusive de alguns envolvidos na rota da pigmentação, como o *MITF*, *DCT* e *TYRP1*, por exemplo.

O gene *PAX3* está localizado no braço longo do cromossomo 2. Esse gene tanto promove quanto inibe a melanogênese nos melanócitos através da regulação da transcrição dos genes *MITF*, *DCT* e *TYRP1*. O *MITF* é um alvo *downstream* direto do *PAX3* e é reconhecido por ser um dos principais reguladores da melanogênese, devido a sua habilidade de ativar genes específicos dos melanócitos e de regular mecanismos importantes destas células, incluindo a diferenciação ou a proliferação (Kubic *et al.*, 2008). Assim, o gene *PAX3* é um regulador direto do *MITF* e indireto de outros genes da pigmentação (Figura 1).

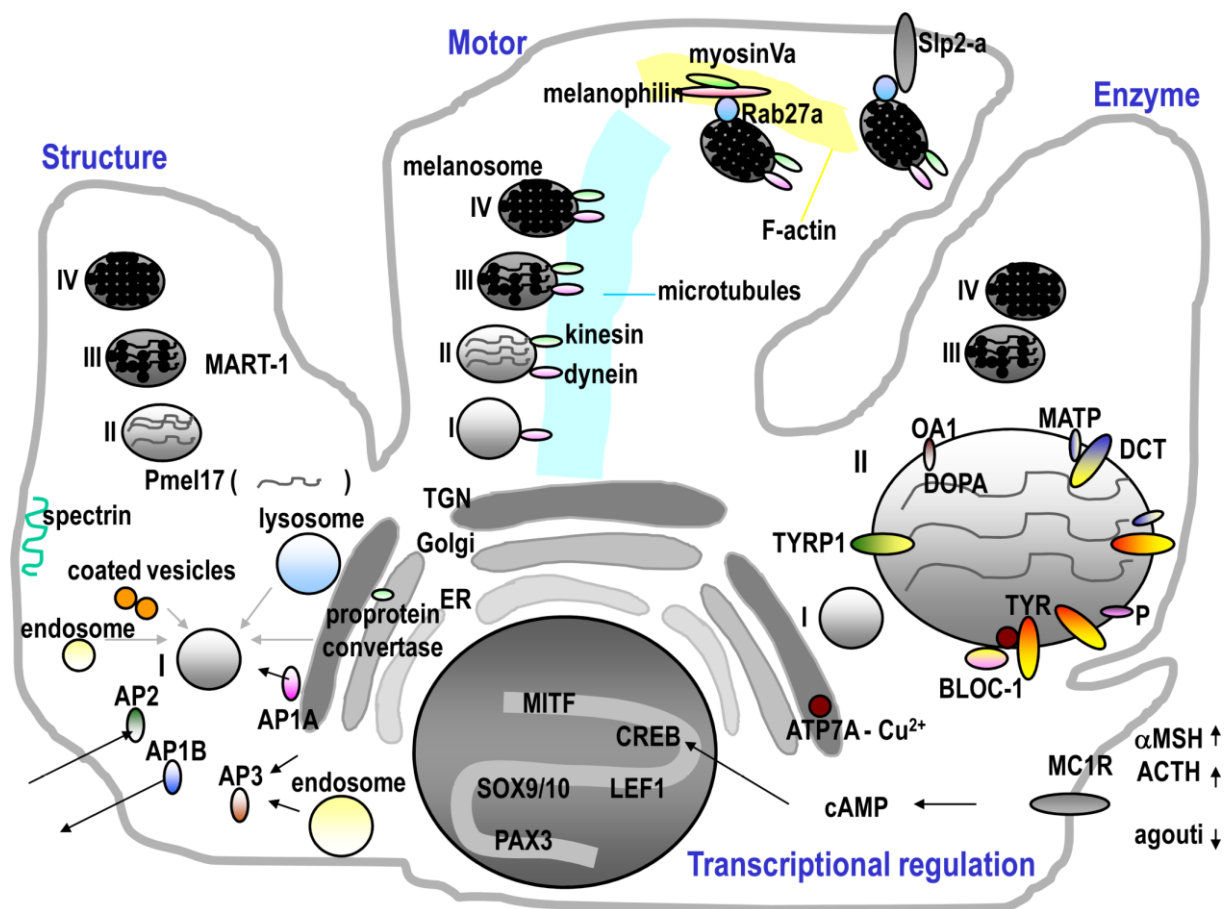


Figura 1: Fatores que afetam a pigmentação nos melanócitos. O esquema mostra os componentes envolvidos na estrutura do melanócito (esquerda), transporte (meio), enzima (direita) e fatores de transcrição (abaixo). (Fonte: Yamagushi e Hearing, 2009).

Durante o desenvolvimento embrionário, o gene *PAX3* é ativo nas células da crista neural. Essas células migram a partir da medula espinhal em desenvolvimento para regiões específicas do embrião. A proteína produzida pelo gene *PAX3* direciona a atividade de outros genes que sinalizam as células da crista neural para formar tecidos especializados ou tipos celulares, tais como músculos dos membros, ossos da face e do crânio, tecido nervoso e

também as células produtoras de pigmento: os melanócitos (Figura 2). O gene *PAX3* está envolvido na proliferação, migração e diferenciação dos melanoblastos (células precursoras dos melanócitos) da crista neural para a pele, folículos capilares e olhos, sendo os melanoblastos diretamente responsáveis pela pigmentação dessas regiões. Em humanos, mutações no *PAX3* resultam na síndrome de Waardenburg (tipos I e III), caracterizada por alterações na pigmentação dos cabelos, da pele e da íris, além de surdez neurossensorial (Bondurand *et al.*, 2000). Polimorfismos encontrados nesse gene também podem estar associados ao risco de desenvolver melanoma (Fernandez *et al.*, 2009).

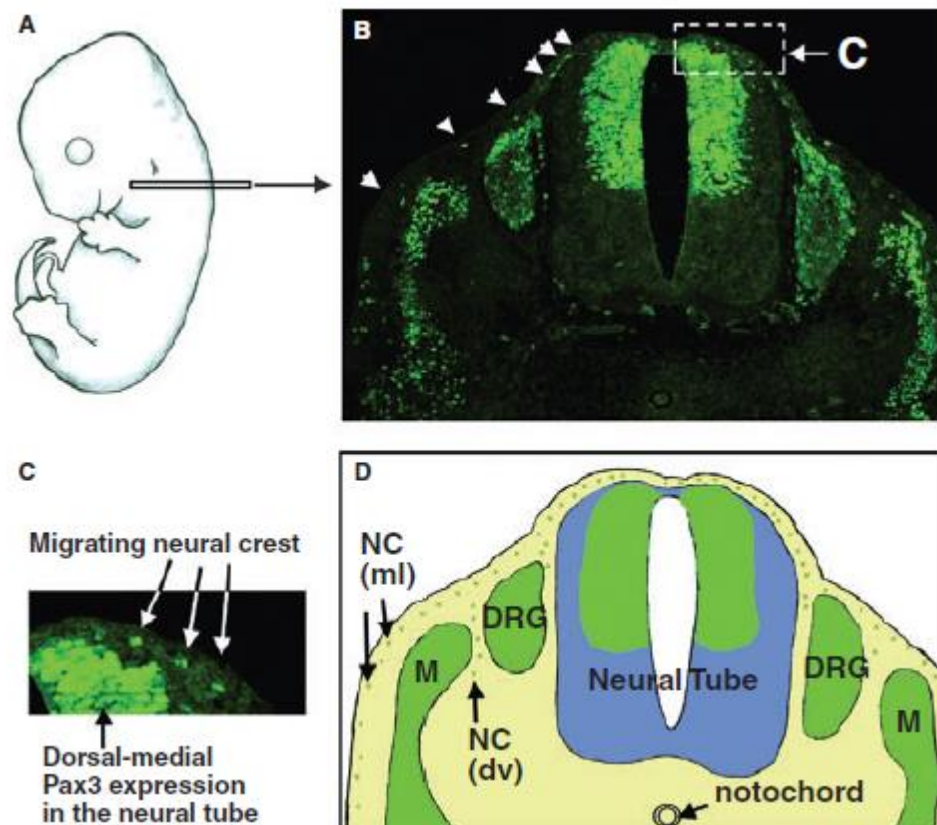


Figura 2: O gene *PAX3* é expresso durante o desenvolvimento na crista neural em migração e em outras estruturas. (A) Esquema de um embrião. (B e C) Expressão do *PAX3* na secção do embrião. Imunofluorescência revela que essa expressão ocorre na área dorsal-mediana do tubo neural e em células da crista neural em migração (pontas das setas). (D) As células da crista neural (NC) migram em duas populações principais; células dorso-ventrais [NC (dv)] e células que migram dorsal-mediolateralmente [NC (ml)] para os gânglios da raiz dorsal (DRG) e os somitos ou as células do miótomo (M). Essa última população é geralmente destinada a se tornar melanócitos (Fonte: Kubic *et al.*, 2008).

2 OBJETIVOS

Considerando todos os aspectos anteriormente abordados e a importância do gene *PAX3* para a pigmentação, o objetivo desse trabalho foi verificar se existe variação na sequência da região promotora do gene *PAX3* e se estas variações genéticas estão associadas a algum fenótipo de cor de pele, olhos e cabelos em uma amostra da população brasileira.

3 METODOLOGIA

3.1 AMOSTRAS DE ESTUDO

A amostra constitui-se em um total de 108 indivíduos voluntários do projeto “Fenótipo, ancestralidade genômica e dinâmica de mestiçagem no Brasil” vinculado ao Consórcio Internacional para Análise da Diversidade e Evolução Latino-Americana (CANDELA-*Consortium for the Analysis of the Diversity and Evolution of Latin America*; <http://www.ucl.ac.uk/silva/candela>), provenientes de duas populações miscigenadas brasileiras de origens geográficas e históricas distintas (Bahia – n= 54 e Rio Grande do Sul - n= 54). O Estado do Rio Grande do Sul é caracterizado por apresentar colonização europeia abundante e mais recente, enquanto que o Estado da Bahia apresenta uma herança africana mais visível, tanto no aspecto fenotípico quanto no cultural. Pareceres de ética favoráveis para este estudo foram fornecidos pelos Comitês de Ética em Pesquisa da UFRGS, Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (Nos. 18208/2010, 100565/2011, e 212/2010, respectivamente).

3.2 DADOS FENOTÍPICOS

O protocolo do Consórcio CANDELA consiste na toma de 67 características fenotípicas, entre elas: cor da pele, olhos e cabelos, antropometria e craniometria. A medida quantitativa da cor da pele foi obtida pelo uso de um espectrofotômetro de reflectância (DSM II ColorMeter - CyberDerm Inc., USA), o qual fornece o Índice de Melanina (IM), cujos valores variam de 20 a 100, sendo que o menor valor representa uma pele clara e o maior, uma pele escura. O IM foi obtido da região mediana proximal dos dois braços para cada voluntário. Essa localização foi escolhida porque ela captura a pigmentação constitutiva da pele (a quantidade basal de melanina, com efeitos mínimos da exposição solar) [Quillen *et al*, 2012; Shriver *et al*, 2003]. Para calcular o Índice Médio de Melanina (IMM), foi feita a média dos valores obtidos do IM de ambos os braços.

A determinação de cor de olhos e cabelos foi realizada por observação qualitativa. Os indivíduos foram classificados qualitativamente em 5 categorias de cor de olhos (azul, verde, mel, castanho claro e castanho escuro) e 4 categorias de cor dos cabelos (ruivo, loiro, loiro escuro/castanho claro e castanho escuro/preto).

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA, PCR E SEQUENCIAMENTO

O DNA foi extraído a partir do pellet de células brancas de 4mL de sangue total com CTAB, utilizando protocolo modificado de Doyle & Doyle (1990). A amplificação via PCR foi realizada com um conjunto de 3 sets de *primers* específicos desenhados para este trabalho (Tabela 1) utilizando-se o programa Primer3 (<http://simgene.com/Primer3>).

Após a amplificação, os fragmentos foram purificados com exonuclease I e fosfatase alcalina (Amersham Biosciences; GE Healthcare), e sequenciados em um ABI 3730/3730x Sequence Analyzer.

O alinhamento, a verificação da qualidade das sequências e a anotação das mutações encontradas foram realizados com o *software* CodonCode Aligner 3.0.3. Posteriormente, todos os cromatogramas foram visualizados e conferidos manualmente. Nesta análise, buscaram-se possíveis mutações na sequência de nucleotídeos. Essas alterações foram anotadas e os genótipos foram montados. Todas as alterações foram checadas quanto ao seu registro nos bancos de dados públicos de genomas (Ensembl, UCSC Genome Browser) e nos bancos de SNPs (dbSNP, Hapmap).

Tabela 1: *Primers* usados para amplificar a região promotora do gene *PAX3*.

<i>Primer</i>	Sequência <i>Forward</i> (5'>3')	Sequência <i>Reverse</i> (5'>3')	Tamanho do Fragmento
1	TTACCGCTGACCCCAGAAAG	TTGGTAAGTGCCAGCGAACT	770 pb
2	AAAGGGAAAAACCTGCCCGA	GGAGGGGGCACAATTCCAATA	724 pb
3	CGGGAGGACCCCTTAACAAG	GGGCGGAAAAGTTTGGTACG	802 pb

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As frequências alélicas e genótípicas foram estimadas por contagem direta e o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi testado. Para os cálculos de estatísticas descritivas utilizou-se o software SPSS 17.0, por meio do qual também foram feitas análises de qui-quadrado para verificar a existência de associação dos polimorfismos encontrados com as características qualitativas (cor dos olhos e dos cabelos). Também foram realizados os testes de ANOVA (ou seu correspondente não paramétrico Kruskal-Wallis, quando os dados exigiram) para comparar os índices de melanina e os genótipos respectivos. Os testes de Kolmogorov-Smirnov e de Levene foram realizados para verificar a normalidade das medidas quantitativas (IMM) bem como a homogeneidade de variâncias, respectivamente. Um valor $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Para as análises estatísticas, 3 grupos foram considerados: amostra total (n=108), gaúchos (n=54) e baianos (n=54). Primeiramente, os polimorfismos foram testados para cor dos olhos e cor dos cabelos, levando-se em conta todas as categorias de cor de cada característica. Após, cada fenótipo foi agrupado em duas categorias (azul/verde e outros, para cor dos olhos; ruivo/loiro e outros, para cor dos cabelos) e os polimorfismos foram novamente testados para cada grupo. Em relação à cor da pele, não foi feita a divisão em categorias, visto tratar-se de uma característica quantitativa neste trabalho.

Foi realizada também uma comparação fenotípica entre gaúchos e baianos para cor de olhos, cor de cabelos e cor de pele. Para as 2 primeiras características, as análises foram feitas com todas as categorias e depois para as categorias agrupadas. Para a última, foi feita somente a análise quantitativa.

Para saber o índice de diversidade genética da população estudada, foi calculado o índice de diversidade de nucleotídeos (π) através do *software* DNAsp 5.10. Após, comparou-se o índice de diversidade entre gaúchos e baianos, através do teste de diversidade entre populações. Esse teste permite inferir qual população tem maior variabilidade molecular, considerando as mutações encontradas na região genômica de interesse.

4 RESULTADOS

4.1 SEQUENCIAMENTO

Foram encontradas 5 mutações na região promotora do gene *PAX3*, 4 delas já descritas e registradas nos bancos de dados públicos de genomas e uma mutação nova (posição chr2:223164038-223164039). A tabela 2 e as figuras 3-6 apresentam a descrição dessas mutações.

Tabela 2: Descrição das mutações encontradas na região promotora do gene *PAX3*.

Posição na sequência	Posição no cromossomo 2	Mudança nucleotídica	dbSNP rs
1111	223164551	C>G	rs28945085
1144	223164518	T>C	rs16863657
1624	223164038	C>G	-
1634	223164028	G>C	rs10193524
1675	223163987	C>T	rs45487501

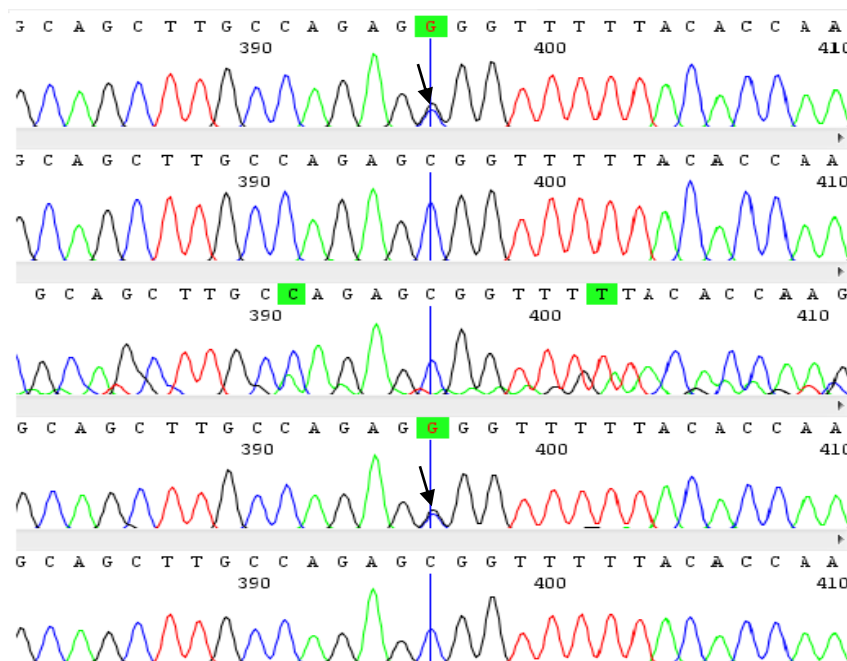


Figura 3: Mutação encontrada na posição 1111 da sequência analisada, evidenciando a troca de uma citosina por uma guanina. Picos verdes correspondem à adenina, picos vermelhos à timina, picos azuis à citosina e picos pretos à guanina. As setas indicam a ocorrência de 2 heterozigotos CG.

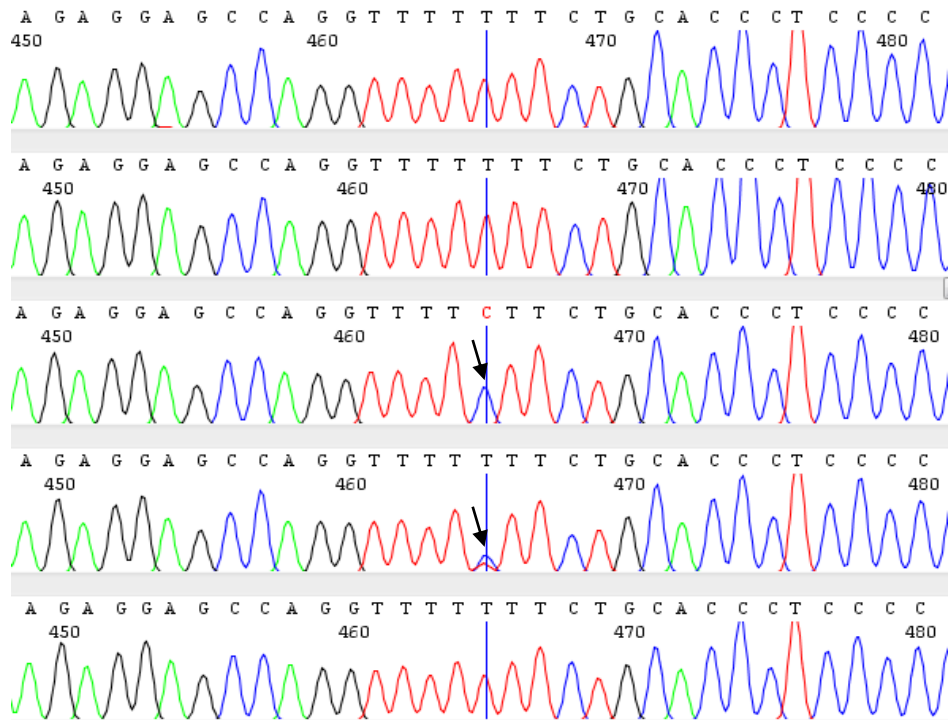


Figura 4: Mutação encontrada na posição 1144 da sequência analisada, evidenciando a troca de uma timina por uma citosina. A primeira seta indica a ocorrência de um homocigoto CC e a segunda, de um heterocigoto TC.

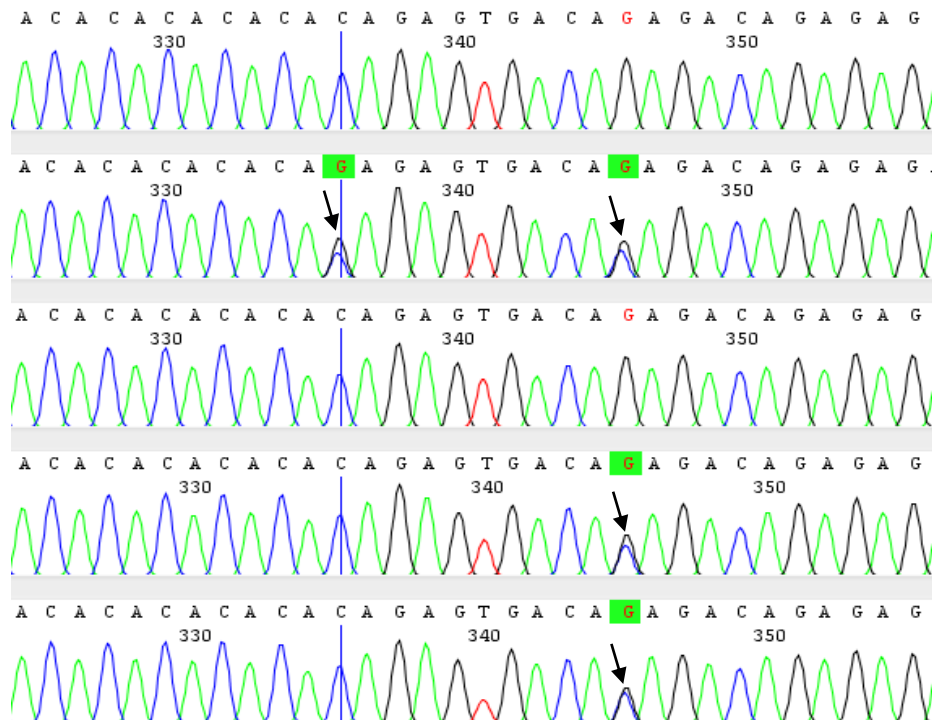


Figura 5: Mutações encontradas nas posições 1624 e 1634 da sequência analisada, evidenciando a troca de uma citosina por uma guanina e de uma guanina por uma citosina, respectivamente. A primeira seta (da esquerda para a direita) indica a ocorrência de um heterocigoto CG; as outras 3 setas da direita indicam a ocorrência de 3 heterocigotos GC.

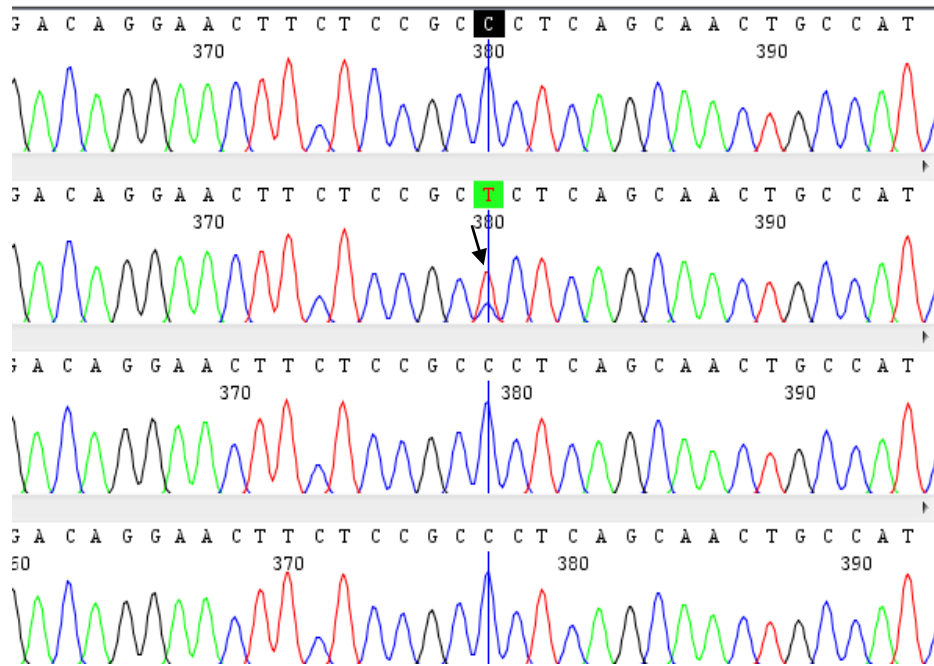


Figura 6: Mutação encontrada na posição 1675 da sequência analisada, evidenciando a troca de uma citosina por uma timina. A seta indica a ocorrência de um heterozigoto CT.

4.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As frequências genóticas dos 5 polimorfismos estudados estavam de acordo com o esperado para o EHW. Na Tabela 3, estão representadas as frequências alélicas e genóticas da população estudada no presente trabalho e também de outras populações.

Na análise de associação dos polimorfismos com as características fenotípicas, obteve-se um valor estatisticamente significativo ($p=0,029$) quando o polimorfismo **rs16863657** foi testado para a cor dos olhos agrupada somente em gaúchos (Tabela 5). Porém, essa associação não é encontrada quando o polimorfismo é testado sem o agrupamento, tanto no grupo de gaúchos (Tabela 5), quanto para a amostra total (Tabela 4).

Observou-se também uma associação do polimorfismo **rs45487501** com a cor dos cabelos na amostra total (Tabela 7), tanto na análise com todas as categorias ($p=0,03$), quanto na análise das categorias agrupadas ($p=0,007$). Contudo, esse polimorfismo foi detectado predominantemente em gaúchos na amostra total ($n=32$), mas a associação se manteve quando somente os gaúchos foram analisados para todas as categorias ($p=0,03$) e para as categorias de cor dos cabelos agrupadas ($p=0,008$) [Tabela 8].

O polimorfismo **rs28945085** mostrou-se associado à cor dos cabelos em baianos, tanto para todas as categorias de cor ($p=0,043$), quanto para as categorias agrupadas ($p=0,019$) [Tabela 9]. Porém, essa associação não se manteve no grupo da amostra total ($p=0,488$ para todas as categorias e $p=0,863$ para as categorias agrupadas).

Para a cor de pele, nenhum dos polimorfismos mostrou-se associado, tanto para a amostra total (Tabela 10), quanto para os grupos de gaúchos (Tabela 11) e de baianos (Tabela 12).

Neste trabalho, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas de cor dos olhos entre gaúchos e baianos (Tabela 13), tanto na análise de todas as categorias de cor ($p=0,038$), quanto para as categorias agrupadas ($p=0,028$). Embora a frequência de indivíduos loiros e ruivos tenha sido mais alta entre os gaúchos e a frequência de indivíduos com cabelo escuro tenha sido mais alta entre baianos, não houve uma diferença estatisticamente significativa entre esses dois grupos ($p=0,267$ para a análise das 4 categorias de cor e $p=0,086$ para as categorias agrupadas) [Tabela 14]. Também foram encontradas diferenças na cor de pele (Tabela 15) entre os dois grupos ($p=0,008$): gaúchos têm um IMM de 46,53, mais baixo do que o dos baianos (62,47), o que corrobora a história demográfica para ambos os grupos.

No teste do índice de diversidade, obteve-se um valor de π (diversidade de nucleotídeos) de 0,00046 para a amostra total. No teste de diversidade entre os 2 grupos, obteve-se um valor de π de 0,00045 para os gaúchos e de 0,00047 para os baianos. O índice foi calculado somente considerando a região de abrangência do *primer 2* (na qual estão localizados os polimorfismos rs28945085 e rs16863657), pois para essa região obteve-se o sequenciamento de todas as amostras. Já a região de abrangência do *primer 3* (onde foram encontrados os outros 3 polimorfismos) não foi considerada para esse teste, pois obteve-se, até o momento, somente o sequenciamento de 32 indivíduos provenientes do Rio Grande do Sul.

Tabela 3: Frequências genotípicas e alélicas para os 5 SNPs na amostra da população estudada e em outras populações.

Genótipos/Alelos	rs28945085			rs16863657			Mutação nova			rs10193524			rs45487501		
	1=C/2=G			1=T/2=C			1=C/2=G			1=G/2=C			1=C/2=T		
	Bra	Afr*	Eur*	Bra	Afr*	Eur*	Bra	Afr	Eur	Bra	Afr*	Eur*	Bra	Afr*	Eur*
11	0,916	1,000	0,750	0,769	0,617	0,700	0,625	-	-	0,219	0,667	0,182	0,969	0,917	1,000
12	0,844	0,000	0,250	0,204	0,283	0,283	0,375	-	-	0,594	0,333	0,500	0,031	0,083	0,000
22	0,000	0,000	0,000	0,028	0,100	0,017	0,000	-	-	0,188	0,000	0,318	0,000	0,000	0,000
1	0,958	1,000	0,875	0,870	0,758	0,842	0,813	-	-	0,516	0,833	0,432	0,984	0,958	1,000
2	0,042	0,000	0,125	0,130	0,242	0,158	0,188	-	-	0,484	0,167	0,568	0,016	0,042	0,000

Obs.: Bra = Brasileiros; Afr = Africanos; Eur = Europeus.

* Frequências obtidas de EGP – PANEL e HapMap.

Tabela 4: Análise de associação dos polimorfismos com a cor dos olhos na amostra total e amostra parcial.

Polimorfismos	Genótipos	Todas as categorias					X ²	p	Categorias agrupadas		X ²	p
		Azul	Verde	Mel	Castanho Claro	Castanho escuro			Azul/Verde	Outros		
rs28945085	CC	14 (14,1)	22 (22,2)	10 (10,1)	14 (14,1)	39 (39,4)	2,293	0,724	36 (36,4)	63(63,6)	0,033	0,856
	CG	0 (0)	3 (33,3)	1 (11,1)	2 (22,2)	3 (33,3)			3 (33,3)	6(66,7)		
	GG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			0 (0)	0 (0)		
TOTAL (108)		14 (13)	25 (23,1)	11 (10,2)	16 (14,8)	42 (38,9)			39 (36,1)	69(63,9)		
rs16863657	TT	12 (14,5)	22 (26,5)	8 (9,6)	10 (12,0)	31 (37,3)	6,808	0,490	34 (41,0)	49 (59,0)	4,063	0,118
	TC	2 (9,1)	2 (9,1)	3 (13,6)	5 (22,7)	10 (45,5)			4 (18,2)	18 (81,8)		
	CC	0 (0)	1 (33,3)	0 (0)	1 (33,3)	1 (33,3)			1 (33,3)	2 (66,7)		
TOTAL (108)		14 (13,0)	25 (23,1)	11 (10,2)	16 (14,8)	42 (38,9)			39 (36,1)	69 (63,9)		
C1624G	CC	1 (5)	7 (35,0)	1 (5)	4 (20,0)	7 (35,0)			8 (40,0)	12 (60,0)		
	CG	1 (8,3)	4 (33,3)	4 (33,3)	0 (0)	3 (25,0)			5 (41,7)	7 (58,3)		

TOTAL (32)	GG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			0 (0)	0 (0)		
		2 (6,2)	11 (34,4)	5 (15,6)	4 (12,5)	10 (31,4)			13 (40,6)	19 (59,4)		
							6,220	0,163			0,009	0,926
rs10193524	GG	1 (14,3)	1 (14,3)	1 (14,3)	0 (0)	4 (57,1)			2 (28,6)	5 (71,4)		
	GC	1 (5,3)	5 (26,3)	4 (21,1)	4 (21,1)	5 (26,3)			6 (31,6)	13 (68,4)		
	CC	0 (0)	5 (83,3)	0 (0)	0 (0)	1 (16,7)			5 (83,3)	1 (16,7)		
TOTAL (32)		2 (6,2)	11 (34,4)	5 (15,6)	4 (12,5)	10 (31,2)			13 (40,6)	19 (59,4)		
							9,800	0,188			5,194	0,095
rs45487501	CC	2 (6,5)	11 (35,5)	5 (16,1)	4 (12,9)	9 (29,0)			13 (41,9)	18 (58,1)		
	CT	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)			0 (0)	1 (100)		
	TT	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			0 (0)	0 (0)		
TOTAL (32)		2 (6,2)	11 (34,4)	5 (16,6)	4 (12,5)	10 (31,2)			13 (40,6)	19 (59,4)		
							4,041	0,649			0,706	0,401

Obs.: números entre parênteses indicam porcentagem. Para os baianos, ainda não se obteve os dados dos SNPs rs10193524, rs45487501 e da mutação nova (região do *primer* 3), pois foram sequenciadas somente amostras da região dos *primers* 1 e 2.

Tabela 5: Análise de associação dos polimorfismos com a cor dos olhos no grupo de gaúchos.

Polimorfismos	Genótipos	Todas as categorias					X ²	p	Categorias agrupadas		X ²	p
		Azul	Verde	Mel	Castanho Claro	Castanho escuro			Azul/Verde	Outros		
rs28945085	CC	10 (21,3)	12 (25,5)	7 (14,9)	4 (8,5)	14 (29,8)			22 (46,8)	25 (53,2)		
	CG	0 (0)	3 (42,9)	1(14,3)	2 (28,6)	1(14,3)			3 (42,9)	4 (57,1)		
	GG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			0 (0)	0 (0)		
TOTAL (54)		10 (18,5)	15 (27,8)	8 (14,8)	6 (11,1)	15 (27,8)			25 (46,3)	29 (53,7)		
							4,528	0,284			0,038	0,845
rs16863657	TT	10 (22,7)	13 (29,5)	6 (13,6)	3 (6,8)	12 (27,3)			23 (52,3)	21 (47,7)		
	TC	0 (0)	1 (11,1)	2 (22,2)	3 (33,3)	3 (33,3)			1 (11,1)	8 (88,9)		
	CC	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			1 (100)	0 (0)		
TOTAL (54)		10 (18,5)	15 (27,8)	8 (14,8)	6 (11,1)	15 (27,8)			25 (46,3)	29 (53,7)		
							10,849	0,112			6,179	0,029
C1624G	CC	1 (5,3)	7 (36,8)	1 (5,3)	3 (15,8)	7 (36,8)			8 (42,1)	11 (57,9)		

	CG	1 (8,3)	4 (33,3)	4 (33,3)	0 (0)	3 (25)			5 (41,7)	7 (58,3)		
	GG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			0 (0)	0 (0)		
TOTAL (31)		2 (6,5)	11 (35,5)	5 (16,1)	3 (9,7)	10 (32,3)			13 (41,9)	18 (58,1)		
							5,487	0,230			0,001	0,981
rs10193524	GG	1 (14,3)	1 (14,3)	1 (14,3)	0 (0)	4 (57,1)			2 (28,6)	5 (71,4)		
	GC	1 (5,6)	5 (27,8)	4 (22,2)	3 (16,7)	5 (27,8)			6 (33,3)	12 (66,7)		
	CC	0 (0)	5 (83,3)	0 (0)	0 (0)	1 (16,7)			5 (83,3)	1 (16,7)		
TOTAL (31)		2 (6,5)	11 (35,5)	5 (16,1)	3 (9,7)	10 (32,3)			13 (41,9)	18 (58,1)		
							9,104	0,246			4,914	0,094
rs45487501	CC	2 (6,7)	11 (36,7)	5 (16,7)	3 (10)	9 (30)			13 (43,3)	17 (56,7)		
	CT	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)			0 (0)	1 (100)		
	TT	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			0 (0)	0 (0)		
TOTAL (31)		2 (6,5)	11 (35,5)	5 (16,1)	3 (9,7)	10 (32,3)			13 (41,9)	18 (58,1)		
							4,111	0,637			0,746	0,388

Obs.: números entre parênteses indicam porcentagem.

Tabela 6: Análise de associação dos polimorfismos com a cor dos olhos no grupo de baianos.

Polimorfismos	Genótipos	Todas as categorias					X ²	p	Categorias agrupadas		X ²	p
		Azul	Verde	Mel	Castanho Claro	Castanho escuro			Azul/Verde	Outros		
rs28945085	CC	4 (7,7)	10 (19,2)	3 (5,8)	10 (19,2)	25 (48,1)			14 (26,9)	38 (73,1)		
	CG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (100)			0 (0)	2 (100)		
	GG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			0 (0)	0 (0)		
TOTAL (54)		4 (7,4)	10 (18,5)	3 (5,6)	10 (18,5)	27 (50)			14 (25,9)	40 (74,1)		
							2,397	1,000			0,727	0,394
rs16863657	TT	2 (5,1)	9 (23,1)	2 (5,1)	7 (17,9)	19 (48,7)			11 (28,2)	28 (71,8)		
	TC	2 (15,4)	1 (7,7)	1 (7,7)	2 (15,4)	7 (53,8)			3 (23,1)	10 (76,9)		
	CC	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (50)	1 (50)			0 (0)	2 (100)		
TOTAL (54)		4 (7,4)	10 (18,5)	3 (5,6)	10 (18,5)	27 (50)			14 (25,9)	40 (74,1)		
							6,027	0,693			0,517	1,000

Obs.: números entre parênteses indicam porcentagem. Para os baianos, ainda não se obteve os dados dos SNPs rs10193524, rs45487501 e da mutação nova (região do *primer 3*), pois foram sequenciadas somente amostras da região dos *primers 1 e 2*.

Tabela 7: Análise de associação dos polimorfismos com a cor dos cabelos na amostra total e parcial.

Polimorfismos	Genótipos	Todas as categorias				X ²	p	Categorias agrupadas		X ²	p
		Ruivo	Loiro	Loiro escuro/ Castanho claro	Castanho escuro/ Preto			Ruivo/Loiro	Outros		
rs28945085	CC	3 (3)	10 (10,1)	36 (36,4)	50 (50,5)			13 (13,1)	86 (86,9)		
	CG	1 (11,1)	0 (0)	3 (33,3)	5 (55,6)			1 (11,1)	8 (88,9)		
	GG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			0 (0)	0 (0)		
TOTAL (108)		4 (3,7)	10 (9,3)	39 (36,1)	55 (50,9)			14 (13)	94 (87)		
						2,377	0,488			0,03	0,863
rs16863657	TT	3 (3,6)	9 (10,8)	31 (37,3)	40 (48,2)			12 (14,5)	71 (85,5)		
	TC	1 (4,5)	0 (0)	7 (31,8)	14 (63,6)			1 (4,5)	21 (95,5)		
	CC	0 (0)	1 (33,3)	1 (33,3)	1 (33,3)			1 (33,3)	2 (66,7)		
TOTAL (108)		4 (3,7)	10 (9,3)	39 (36,1)	55 (50,9)			15 (13)	94 (87)		
						6,443	0,331			2,931	0,182
C1624G	CC	0 (0)	2 (10,0)	11 (55,0)	7 (35)			2 (10)	18 (90)		
	CG	1 (8,3)	1 (8,3)	2 (16,7)	8 (66,7)			2 (16,7)	10 (83,3)		
	GG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			0 (0)	0 (0)		
TOTAL (32)		1 (3,1)	3 (9,4)	13 (40,6)	15 (46,9)			4 (12,5)	28 (87,5)		
						5,954	0,074			0,305	0,581
rs10193524	GG	0 (0)	0 (0)	3 (42,9)	4 (57,1)			0 (0)	7 (100)		
	GC	1 (5,3)	1 (5,3)	10 (52,6)	7 (36,8)			2 (10,5)	17 (89,5)		
	CC	0 (0)	2 (33,3)	0 (0)	4 (66,7)			2 (33,3)	4 (66,7)		
TOTAL (32)		1 (3,1)	3 (9,4)	13 (40,6)	15 (46,9)			4 (12,5)	28 (87,5)		
						8,988	0,116			2,815	0,247
rs45487501	CC	0 (0)	3 (9,7)	13 (41,9)	15 (48,4)			3 (9,7)	28 (90,3)		
	CT	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			1 (100)	0 (0)		
	TT	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			0 (0)	0 (0)		
TOTAL (32)		1 (3,1)	3 (9,4)	13 (40,6)	15 (46,9)			4 (12,5)	28 (87,5)		
						9,004	0,03			7,226	0,007

Obs.: números entre parênteses indicam porcentagem. Para os baianos, ainda não se obteve os dados dos SNPs rs10193524, rs45487501 e da mutação nova (região do *primer 3*), pois foram sequenciadas somente amostras da região dos *primers 1 e 2*.

Tabela 8: Análise de associação dos polimorfismos com a cor dos cabelos no grupo de gaúchos.

Polimorfismos	Genótipos	Todas as categorias				X ²	p	Categorias agrupadas		X ²	p
		Ruivo	Loiro	Loiro escuro/ Castanho claro	Castanho escuro/ Preto			Ruivo/Loiro	Outros		
rs28945085	CC	3 (6,4)	7 (14,9)	18 (38,3)	19 (40,4)	1,218	0,839	10 (21,3)	37 (78,7)	1,828	0,176
	CG	0 (0)	0 (0)	3 (42,9)	4 (57,1)			0 (0)	7 (100)		
	GG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			0 (0)	0 (0)		
TOTAL (54)		3 (5,6)	7 (13)	21 (38,9)	23 (42,6)			10 (18,5)	44 (81,5)		
rs16863657	TT	3 (6,8)	6 (13,6)	17 (38,6)	18 (40,9)	6,727	0,344	9 (20,5)	35 (79,5)	5,153	0,072
	TC	0 (0)	0 (0)	4 (44,4)	5 (55,6)			0 (0)	9 (100)		
	CC	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)			1 (100)	0 (0)		
TOTAL (54)		3 (5,6)	7 (13)	21 (38,9)	23 (42,6)			10 (18,5)	44 (81,5)		
C1624G	CC	0 (0)	2 (10,5)	10 (52,6)	7 (36,8)	5,359	0,142	2 (10,5)	17 (89,5)	0,247	0,619
	CG	1 (8,3)	1 (8,3)	2 (16,7)	8 (66,7)			2 (16,7)	10 (83,3)		
	GG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			0 (0)	0 (0)		
TOTAL (31)		1 (3,2)	3 (9,7)	12 (38,7)	15 (48,4)			4 (12,9)	27 (87,1)		
rs10193524	GG	0 (0)	0 (0)	3 (42,9)	4 (57,1)	8,444	0,14	0 (0)	7 (100)	2,738	0,263
	GC	1 (5,6)	1 (5,6)	9 (50)	7 (38,9)			2 (11,1)	16 (88,9)		
	CC	0 (0)	2 (33,3)	0 (0)	4 (66,7)			2 (33,3)	4 (66,7)		
TOTAL (31)		1 (3,2)	3 (9,7)	12 (38,7)	15 (48,4)			4 (12,9)	27 (87,1)		
rs45487501	CC	0 (0)	3 (10)	12 (40)	15 (50)	8,897	0,03	3 (10)	27 (90)	6,975	0,008
	CT	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			1 (100)	0 (0)		
	TT	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			0 (0)	0 (0)		
TOTAL (31)		1 (3,2)	3 (9,7)	12 (38,7)	15 (48,4)			4 (12,9)	27 (87,1)		

Obs.: números entre parênteses indicam porcentagem.

Tabela 9: Análise de associação dos polimorfismos com a cor dos cabelos no grupo de baianos.

Polimorfismos	Genótipos	Todas as categorias				X ²	p	Categorias agrupadas		X ²	p
		Ruivo	Loiro	Loiro escuro/ Castanho claro	Castanho escuro/ Preto			Ruivo/Loiro	Outros		
rs28945085	CC	0 (0)	3 (5,8)	18 (34,6)	31 (59,6)	8,622	0,043	3 (5,8)	49 (94,2)	5,493	0,019
	CG	1 (50)	0 (0)	0 (0)	1 (50)			1 (50)	1 (50)		
	GG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			0 (0)	0 (0)		
TOTAL (54)		1 (1,9)	3 (5,6)	18 (33,3)	32 (59,3)			4 (7,4)	50 (92,6)		
rs16863657	TT	0 (0)	3 (7,7)	14 (35,9)	22 (56,4)	6,668	0,468	3 (7,7)	36 (92,3)	0,709	1,000
	TC	1 (7,7)	0 (0)	3 (23,1)	9 (69,2)			1 (7,7)	12 (92,3)		
	CC	0 (0)	0 (0)	1 (50)	1 (50)			0 (0)	2 (100)		
TOTAL (54)		1 (1,9)	3 (5,6)	18 (33,3)	32 (59,3)			4 (7,4)	50 (92,6)		

Obs.: números entre parênteses indicam porcentagem. Para os baianos, ainda não se obteve os dados dos SNPs rs10193524, rs45487501 e da mutação nova (região do *primer* 3), pois foram sequenciadas somente amostras da região dos *primers* 1 e 2.

Tabela 10: Análise de associação dos polimorfismos com a cor da pele na amostra total e parcial.

Polimorfismos	Genótipos	N	IMM	X ²	p
rs28945085	CC	99	56,24	3,677	0,055
	CG	9	35,33		
	GG	0			
	TOTAL	108			
rs16863657	TT	83	54,11	0,329	0,848
	TC	22	54,59		
	CC	3	64,67		
	TOTAL	108			
C1624G	CC	20	17,95	1,274	0,259
	CG	12	14,08		

	GG	0			
	TOTAL	32			
rs10193524	GG	7	19,29	1,327	0,515
	GC	19	14,95		
	CC	6	18,17		
	TOTAL	32			
rs45487501	CC	31	16,25	0,238	0,626
	CT	1	12,00		
	TT	0			
	TOTAL	32			

Obs.: para os baianos, ainda não se obteve os dados dos SNPs rs10193524, rs45487501 e da mutação nova (região do *primer 3*), pois foram sequenciadas somente amostras da região dos *primers 1 e 2*.

Tabela 11: Análise de associação dos polimorfismos com a cor da pele no grupo dos gaúchos.

Polimorfismos	Genótipos	N	IMM	X ²	p
rs28945085	CC	47	28,62	1,828	0,176
	CG	7	20,00		
	GG	0			
	TOTAL	54			
rs16863657	TT	44	27,11	0,247	0,884
	TC	9	28,67		
	CC	1	34,00		
	TOTAL	54			
C1624G	CC	19	17,79	1,901	0,168
	CG	12	13,17		
	GG	0			
	TOTAL	31			
rs10193524	GG	7	18,29	0,897	0,639
	GC	18	14,72		
	CC	6	17,17		

	TOTAL	31			
rs45487501	CC	30	16,17	0,312	0,576
	CT	1	11,00		
	TT	0			
	TOTAL	31			

Tabela 12: Análise de associação dos polimorfismos com a cor da pele no grupo dos baianos.

Polimorfismos	Genótipos	N	IMM	X ²	p
rs28945085	CC	52	27,96	1,208	0,272
	CG	2	15,50		
	GG	0			
	TOTAL	54			
rs16863657	TT	39	28,05	0,282	0,868
	TC	13	25,54		
	CC	2	29,50		
	TOTAL	54			

Obs.: para os baianos, ainda não se obteve os dados dos SNPs rs10193524, rs45487501 e da mutação nova (região do *primer* 3), pois foram sequenciadas somente amostras da região dos *primers* 1 e 2.

Tabela 13: Comparação da cor dos olhos entre gaúchos e baianos.

População (n)	Todas as categorias de cor de olho					X ²	p	Categorias agrupadas		X ²	p
	Azul	Verde	Mel	Castanho Claro	Castanho escuro			Azul/Verde	Outros		
Gaúchos (54)	10 (71,4)	15 (60)	8 (72,7)	6 (37,5)	15 (35,7)			25 (64,1)	29 (42)		
Baianos (54)	4 (28,6)	10 (40)	3 (27,3)	10 (62,5)	27 (64,3)			14 (35,9)	40 (58)		
TOTAL (108)	14	25	11	16	42	10,055	0,038	39	69	4,856	0,028

Obs.: números entre parênteses indicam porcentagem.

Tabela 14: Comparação da cor dos cabelos entre gaúchos e baianos.

População (n)	Todas as categorias de cor dos cabelos				X ²	p	Categorias agrupadas		X ²	p
	Ruivo	Loiro	Loiro escuro/ Castanho claro	Castanho escuro/ Preto			Ruivo/Loiro	Outros		
Gaúchos (54)	3 (75)	7 (70)	21 (53,8)	23 (41,8)			10 (71,4)	44 (46,8)		
Baianos (54)	1 (25)	3 (30)	18 (46,2)	32 (58,2)			4 (28,6)	50 (53,2)		
TOTAL (108)	4	10	39	55	4,164	0,267	14	94	2,954	0,086

Obs.: números entre parênteses indicam porcentagem.

Tabela 15: Comparação da cor da pele entre gaúchos e baianos.

População	N	IMM	X ²	p
Gaúchos	54	46,53	6,997	0,008
Baianos	54	62,47		
TOTAL	108			

5 DISCUSSÃO

O *background* genético das populações brasileiras é caracterizado por diferentes níveis de contribuição dos seus grupos ancestrais (nativos americanos, europeus e africanos), e diferenças marcantes têm sido relatadas quando as populações de diferentes regiões geográficas são estudadas (Hünemeier *et al*, 2007; Marrero *et al*, 2007; Lins *et al*, 2010; Santos *et al*, 2010). Essas diferenças indicam que alguns alelos são específicos para uma população e não para outra, devendo ser evitados para inferências gerais. Assim, podemos encontrar associação de um marcador com um determinado fenótipo em uma população e não em outra. É o que pode estar acontecendo com os polimorfismos rs16863657 e rs28945085.

O polimorfismo rs16863657 foi associado com a cor dos olhos agrupada somente em gaúchos, e não em baianos. Podemos observar que a frequência de olhos claros (azuis/verdes) é maior na amostra dos gaúchos (n=25) do que na dos baianos (14), o que possivelmente explica esse resultado. Se essa frequência fosse semelhante nos dois grupos, talvez essa associação também fosse encontrada na amostra total.

Foi encontrada uma associação do polimorfismo rs28945085 com cabelos em baianos, mas essa associação não se manteve na amostra dos gaúchos. Isso pode ser um reflexo das diferenças na ancestralidade dos dois grupos: os gaúchos têm um *background* genético em maior parte europeu, enquanto que os baianos têm uma herança genética africana maior (dados não publicados do Consórcio CANDELA, comunicação pessoal). Outro trabalho recente do nosso grupo, também com indivíduos da amostra CANDELA, corrobora esta visão. Cerqueira *et al* (2013) verificaram a possível associação de 18 SNPs em 9 genes e 1 pseudogene com o Índice de Melanina em 2 populações miscigenadas brasileiras (gaúchos e baianos), mas somente 3 SNPs mostraram uma associação significativa nas 2 populações.

O polimorfismo rs45487501, associado no presente estudo com pigmentação dos cabelos, está reportado no banco de dados MSV3d (<http://decryphon.igbmc.fr/msv3d/cgi-bin/home>), como uma alteração de base única que leva a alterações na estrutura 3D da proteína PAX3. Sendo assim, é provável que esta alteração esteja acarretando alguma mudança fenotípica na amostra de indivíduos estudada. Dados do projeto 1000 Genomas, mostram que este polimorfismo está presente em 2% da população africana e 1% da população de Porto Rico amostrada, o que parece reportar uma provável origem africana para esta mutação (Tabela 16).

Tabela 16. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo rs45487501 em diferentes populações humanas.

Populações	Número amostral	Frequência Alélica		Frequência Genotípica		Referência
		A	G	A G	G G	
Todas Populações	1092	0.005	0.995	0.011		1000 Genomes Project
Africanos	246	0.022	0.978	0.045	0.955	1000 Genomes Project
Leste Asiáticos	286		1.000		1.000	1000 Genomes Project
Afro-americanos	61		1.000		1.000	1000 Genomes Project
Europeus	85		1.000		1.000	1000 Genomes Project
Latino Americanos*	181	0.003	0.997	0.006	0.994	1000 Genomes Project
<i>Colombianos</i>	60		1.000		1.000	1000 Genomes Project
<i>Mexicanos</i>	66		1.000		1.000	1000 Genomes Project
<i>Porto Riquenhos</i>	55	0.009	0.991	0.018	0.982	1000 Genomes Project
<i>Brasileiros</i>	108	0,016	0,984	0,031	0,969	Presente estudo

* Inclui colombianos de Medellin, mexicanos de Los Angeles e porto-riquenhos.

Alterações no gene *PAX3* resultam em conhecidas mudanças na coloração de cabelos, como o que ocorre na síndrome de Waardenburg, por exemplo. Indivíduos afetados apresentam anomalias na pigmentação, como a presença de manchas brancas no corpo e no cabelo, olhos azuis brilhantes ou heterocromia da íris, além de outros aspectos, como surdez, *distopia canthorum*, anormalidades musculoesqueléticas nos membros e defeitos neurológicos. Porém, isso não depende somente do *PAX3*, pois essas mudanças ocorrem também com a participação de outros genes, tais como *MITF*, *EDN3*, *EDNRB*, *SOX10* e *SNAI2* (Pingault *et al*, 2010). O mesmo acontece com o fenótipo das manchas brancas nos pelos de cavalos, que é equivalente à síndrome de Waardenburg. Esses animais apresentam uma mancha branca grande na cabeça e nas patas, olhos azuis e são frequentemente surdos. Hauswirth *et al* (2012) sugerem que mutações independentes no *PAX3* e no *MITF*, juntamente com variantes conhecidas nos genes *EDNRB* e *KIT*, explicam uma grande proporção de cavalos com fenótipos mais extremos de manchas brancas.

Os fenótipos mencionados acima ressaltam a importância deste gene nas rotas de pigmentação dos pelos em mamíferos afetados por alguma condição patológica. Sendo assim, a associação encontrada entre o polimorfismo rs45487501 da região promotora do gene *PAX3* e coloração de cabelos ruivos no presente trabalho, parece indicar a primeira associação entre uma mutação deste gene e um fenótipo de pigmentação normal.

Uma limitação do nosso trabalho é o pequeno tamanho amostral. Ressaltamos que estamos cientes desta limitação e, como perspectiva, pretendemos aprofundar as análises e

verificar a associação em um número amostral maior para confirmar os achados. Em nossa visão, acreditamos que o polimorfismo rs45487501 pode realmente estar contribuindo fortemente para o fenótipo de pigmentação em nossa amostra, conforme supramencionado. As outras associações devem ser vistas com cuidado e as análises com maior tamanho amostral irão confirmar ou não os achados aqui apresentados.

6 CONCLUSÃO

A pigmentação humana varia de maneira marcante entre diferentes populações, mas a base genética por trás deste fenômeno ainda não é completamente conhecida. O objetivo desse trabalho foi verificar a variabilidade molecular da região 5'UTR do gene *PAX3* e sua possível associação com fenótipos de pigmentação (cor de pele, olhos e cabelos) em uma amostra da população brasileira. Foram encontradas 4 mutações já descritas (rs28945085, rs16863657, rs10193524 e rs45487501) e uma mutação nova (posição chr2:223164038-223164039). A análise de associação mostrou que o polimorfismo rs45487501 está associado com cor de cabelo ($\chi^2 = 9,004$; $p = 0,03$). Revelamos também que o polimorfismo rs45487501, embora não associado até o momento com nenhum fenótipo de pigmentação, está reportado no banco de dados MSV3d como uma alteração de base única que leva a alterações na estrutura 3D da proteína PAX3. Sendo assim, é provável que esta mutação esteja envolvida na geração de variabilidade no fenótipo de coloração de cabelos nos indivíduos amostrados. Ainda que o gene *PAX3* já tenha sido amplamente associado a condições patológicas que levam a alterações na cor dos cabelos em humanos (síndrome de Waardenburg, por exemplo), e nos padrões de manchas nos pelos dos equinos, nosso trabalho é o primeiro a evidenciar a associação entre uma mutação deste gene e um fenótipo de pigmentação de cabelos normal.

7 FINANCIAMENTO

Este trabalho teve apoio financeiro da CAPES, PRONEX – FAPERGS e do CNPq.

REFERÊNCIAS

- Bondurand, N; Pingault, V; Goerich, DE *et al.* (2000). Interaction among *SOX10*, *PAX3* and *MITF*, three genes altered in Waardenburg syndrome. *Human Molecular Genetics*. Vol 9, nº 13. 1907-1917.
- Cerqueira, C.C.S; Hünemeier, T; Gomez-Valdes, J.A *et al.* (2013). Forensic implications of the genetics evaluation of skin color phenotype in two distinct admixed Brazilian populations. *Forensic Science International: Genetics* (artigo submetido).
- Doyle, JJ and Doyle, JL (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Fernandez, LP; Milne, RL; Pita, G. *et al.* (2009) Pigmentation-related genes and their implication in malignant melanoma susceptibility. *Experimental Dermatology*. 18: 634–642.
- Hünemeier, T; Carvalho, C; Marrero, AR *et al.* (2007) . Niger-Congo Speaking Populations and the Formation of the Brazilian Gene Pool: mtDNA and Y-Chromosome Data. *American Journal of Physical Anthropology* 133:854–867.
- Hauswirth R, Haase B, Blatter M, Brooks SA, Burger D, *et al.* (2012) Mutations in *MITF* and *PAX3* Cause “Splashed White” and Other White Spotting Phenotypes in Horses. *PLoS Genet* 8(4): e1002653.
- Kubic, JD; Young, KP; Plummer, RS; *et al.* (2008). Pigmentation PAX-ways: the role of Pax3 in melanogenesis, melanocyte stem cell maintenance, and disease. *Pigment Cell Melanoma Res.* 21: 627–645.
- Lins, T; Vieira, RG; Abreu, BS *et al.* (2010). Genetic Composition of Brazilian Population Samples Based on a Set of Twenty Eight Ancestry Informative SNPs. *American Journal of Human Biology* 22:187–192.
- Marrero, AR; Bravi, C; Stuart, S *et al.* (2007). Pre- and Post-Columbian Gene and Cultural Continuity: The Case of the *Gaúcho* from Southern Brazil. *Human Heredity* 64:160–171.
- Nan, H; Kraft, P; Qureshi, AA; *et al.* (2009). Genome-wide association study of tanning phenotype in a population of European ancestry. *J Invest Dermatol.* 129: 2250–2257.
- Paixão-Côrtes, VR; Braga, T; Salzano, FM *et al.* (2011a). *PAX9* and *MSX1* transcription factor genes in non-syndromic dental agenesis. *Archives of oral biology.* 56: 337 – 344.
- Paixão-Côrtes, VR; Meyer, D; Pereira, TV; *et al.* (2011b). Genetic Variation among Major Human Geographic Groups Supports a Peculiar Evolutionary Trend in *PAX9*. *PLoS ONE.* 6: e15656.
- Pereira, TV; Salzano, FM; Mostowska, A *et al.* (2006). Natural selection and molecular evolution in primate *PAX9* gene, a major determinant of tooth development. *PNAS.* 103: 5676–5681.
- Pingault, V; Ente, D; Moal, FD *et al.* (2010). Review and Update of Mutations Causing Waardenburg Syndrome. *Human Mutation.* Vol. 31, No. 4, 391–406
- Quillen, EE; Bauchet, M; Biggam, AW *et al.* (2012). *OPRM1* and *EGFR* contribute to skin pigmentation differences between Indigenous Americans and Europeans. *Hum Genet.* 131: 1073–1080.

Santos, NPC; Ribeiro-Rodrigues, EM; Ribeiro-dos-Santos, AKC *et al.* (2010). Assessing Individual Interethnic Admixture and Population Substructure Using a 48-Insertion-Deletion (INSEL) Ancestry-Informative Marker (AIM) Panel. *Human Mutation*. Vol. 31, No. 2, 184–190.

Shriver, MD; Parra, EJ *et al.* (2003). Kittles, Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping. *Hum. Genet.* 112: 387–399.

Yamaguchi, Y e Hearing, VJ. (2009). Physiological factors that regulate skin pigmentation. *Biofactors*. 35(2): 193–199.