

MESTRADO

MEDICINA LEGAL

Marcadores genéticos e determinação da cor dos olhos

Andreia Raquel Pinto Machado

M

2019



ANDREIA RAQUEL PINTO MACHADO

MARCADORES GENÉTICOS E DETERMINAÇÃO DA COR DOS OLHOS

Dissertação de Candidatura ao Grau de Mestre em Medicina Legal submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Professor Doutor Rui Manuel de Medeiros Melo Silva

Categoria – Professor Afiliado

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar e Coordenador do Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral do Centro de Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto

Coorientador – Mestre Augusto José André Nogueira

Categoria – Doutorando em Biomedicina

Afiliação – Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral do Centro de Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto

Supervisora laboratorial – Doutora Ana Luísa Pereira Teixeira

Categoria – Investigadora Júnior

Afiliação – Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral do Centro de Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto

*“Success is the result of perfection, hard work,
learning from failure, loyalty, and persistence.”*

Colin Powell

Agradecimentos

Ao concluir esta etapa do meu percurso académico, não poderia deixar de agradecer a todas as pessoas que contribuíram, de uma forma direta ou indireta, para a execução deste projeto.

Ao meu orientador, Professor Doutor Rui Medeiros, um muito obrigada pelas orientações científicas que proporcionou e por todo o conhecimento partilhado.

Um enorme obrigada, Mestre Augusto Nogueira, por tudo o que aprendi consigo, pela ajuda incansável e preocupação constante, por aturar as minhas persistentes dúvidas e desassossegos, por ter ido para além do seu dever e ter utilizado o seu tempo pessoal para me proporcionar correções e sugestões para melhorar este trabalho. Obrigada por toda a paciência e compreensão demonstrada. Se esta dissertação chegou a bom porto, a si se deve.

Um agradecimento especial à Doutora Ana Luísa, pela orientação e ajuda ao longo de todo o trabalho desenvolvido.

Um agradecimento a todos os membros do Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral do IPO-Porto por proporcionarem um excelente ambiente de trabalho e pela disponibilidade em ajudar sempre que necessário. Obrigada a vocês, Brunelly, Joana e Bela, por terem sido a minha primeira linha de apoio no laboratório.

Obrigada às amigas que o Mestrado me deu: Inês, por seres a primeira a embarcar e colocar em prática todas as ideias que proponho; Cátia, por teres partilhado comigo a melhor viagem que fiz na vida e por toda a tua paciência e preocupação nos meus dilemas de vida; Mariana, por todo o carinho escondido nas constantes brincadeiras e por me acompanhares nesta aventura de terminar o mestrado; Liliana e Francisca, pela companhia, amizade e por me transmitirem boas energias. Sem dúvida que esta etapa não teria feito o mínimo sentido sem vocês. Momentos que guardo para sempre.

Obrigada a ti Flávia, que estiveste sempre presente para me fazer continuar a lutar em cada adversidade, a ti Laura, que tinhas sempre aquele conselho que eu precisava de ouvir, a ti Bernardo, por toda a amizade e carinho 24 horas por dia, a ti Rúben, Maria João, Rita Sardão e Cátia que estiveram sempre presentes. Um obrigada especial, Rita Santos e Sara por terem sido os meus pilares e as melhores colegas de casa que poderia ter pedido, devo-vos imenso. Agradeço-te Sofia, por me fazeres ver que existe sempre um lado positivo em tudo e a ti Claudio por me fazeres constantemente sonhar e acreditar que tudo é possível. Obrigada a vocês todos, que começaram este longo percurso comigo em



Aveiro e me proporcionaram as melhores recordações como aluna do ensino superior. Saudades, muitas!

Um enorme obrigada Bruno, por seres o meu “irmão” e melhor amigo há 22 anos. Grata pela perseverança, compreensão, positivismo e fé que sempre depositaste em mim, fazendo-me acreditar, que um dia, este momento também chegaria para mim. Obrigada por nunca largares a minha mão e viajares comigo nas minhas dúvidas e inquietações. Agradeço-te também a ti, Cristina, por seres o meu ponto de abrigo e por trazeres sempre um pouco de lucidez aos meus pensamentos. Porque vocês os dois são a família que eu escolho e que não poderia pedir melhor. Um agradecimento especial à Iolanda por todos os anos que partilhamos, por estar comigo nos piores momentos, mas também por criar os melhores. Ao Steve, obrigada, pela paciência, pelas brincadeiras, mas também pelos momentos sérios, pela companhia nas longas horas de trabalho e por tentares ensinar-me tudo o que sabes. Sabem que podem contar comigo para tudo, obrigada pela amizade e confiança.

Por fim, mas não menos importante, um agradecimento aos meus familiares, por acreditarem sempre nas minhas capacidades. Especialmente aos meus pais, por manterem o equilíbrio nos momentos de crise. Agradeço por fim a ti, Anabela, minha irmã do coração, por toda a paciência, por toda a ajuda e por me teres dado a pessoa mais importante na minha vida, a tua filha, minha afilhada Leonor que amo muito.



Resumo

A pigmentação da íris enquanto característica física tem um papel importante na diversidade humana. O sistema biológico que determina a pigmentação está sob um forte controlo genético, resultante da interação entre múltiplos genes sendo, por isso, responsável pelo aparecimento de fenótipos altamente diversificados. A expressão dos genes *HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2 (HERC2)*, *Oculocutaneous Albinism II (OCA2)*, *Solute Carrier Family 45 member 2 (SLC45A2)*, *Tyrosinase (TYR)*, *Solute Carrier Family 24 member 4 (SLC24A4)* e *Interferon Regulatory Factor 4 (IRF4)* parecem ser capazes de explicar parte desta variação fenotípica. Particularmente, as suas variantes genéticas *HERC2* rs12913832, *OCA2* rs1800407, *IRF4* rs12203592, *SLC24A4* rs12896399, *TYR* rs1393350 e *SLC45A2* rs16891982 uma vez que estão associadas à expressão de diferentes padrões de pigmentação da íris.

No presente trabalho, os objetivos foram estimar as distribuições genotípicas e alélicas dos polimorfismos genéticos anteriormente mencionados e avaliar a sua influência no desenvolvimento de diferentes tipos de pigmentação da íris. Este estudo foi realizado usando cento e trinta amostras biológicas de células do epitélio bucal de estudantes do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto. A genotipagem dos polimorfismos foi efetuada por discriminação alélica, através da metodologia *TaqMan (Applied Biosystems)*, utilizando a técnica *Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR)*.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as frequências dos genótipos e os diferentes tipos de pigmentação da íris para os polimorfismos *OCA2* rs1800407 ($P=0,397$), *IRF4* rs12203592 ($P=0,512$), *SLC24A4* rs12896399 ($P=0,602$), *TYR* rs1393350 ($P=0,563$) e *SLC45A2* rs16891982 ($P=0,166$). Contudo, para o polimorfismo *HERC2* rs12913832 foi possível observar uma associação significativa entre a distribuição genotípica e os diferentes padrões de pigmentação da íris ($P<0,001$). Adicionalmente, foi também demonstrado para o polimorfismo *HERC2* rs12913832, que os indivíduos portadores do genótipo GG comparativamente aos indivíduos portadores dos genótipos AA/AG apresentam uma maior suscetibilidade para a pigmentação intermédia (castanha esverdeada) ($OR=51,50$; IC 95%=5,89-450,33; $P<0,001$), verde ($OR=68,67$; IC 95%=7,43-634,72; $P<0,001$) e azul da íris ($OR=6,00$; IC 95%=1,00-35,91; $P<0,001$). Deste modo, a identificação e caracterização de variantes genéticas em genes chave associados à expressão da pigmentação da íris poderão contribuir para prever e caracterizar este traço fenotípico, a partir da criação de potenciais perfis genéticos de suscetibilidade.



Abstract

Iris pigmentation as a physical characteristic plays an important role in human diversity. The biological pathway that determines the pigmentation is under strong genetic control, resulting from the multi-gene interaction being, therefore, responsible for the manifestation of highly diversified phenotypes. The expression of HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2 (*HERC2*), Oculocutaneous Albinism II (*OCA2*), Solute Carrier Family 45 member 2 (*SLC45A2*), Tyrosinase (*TYR*), Solute Carrier Family 24 member 4 (*SLC24A4*) and Interferon Regulatory Factor 4 (*IRF4*) genes might explain some of this phenotypic variation. Particularly, the genetic variants *HERC2* rs12913832, *OCA2* rs1800407, *IRF4* rs12203592, *SLC24A4* rs12896399, *TYR* rs1393350 and *SLC45A2* rs16891982 are associated with the expression of different iris pigmentation patterns.

In the present work we estimated the genotypic and allelic distributions of the above-mentioned genetic polymorphisms and assessed their influence on the development of different iris pigmentation types. This study was developed using one hundred and thirty biological samples of oral epithelium cells from students from Abel Salazar Institute for the Biomedical Sciences of University of Porto. The genotyping of the polymorphisms was performed by allelic discrimination through TaqMan methodology (Applied Biosystems), using Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) technique.

The results obtained in this study demonstrated that no statistically significant differences were observed between genotype frequencies and different iris pigmentation types for *OCA2* rs1800407 ($P=0,397$), *IRF4* rs12203592 ($P=0,512$), *SLC24A4* rs12896399 ($P=0,602$), *TYR* rs1393350 ($P=0,563$) e *SLC45A2* rs16891982 ($P=0,166$) polymorphisms. However, for *HERC2* rs12913832 polymorphism was possible to observe a significant association between genotypic distribution and different iris pigmentation patterns ($P<0,001$). Additionally, was also demonstrated for *HERC2* rs12913832 polymorphism that individuals with GG genotype comparatively to individuals carrier of AA/AG genotypes present a higher susceptibility to intermediate pigmentation (green-hazel) (OR=51,50; IC 95%=5,89-450,33; $P<0,001$), green (OR=68,67; IC 95%=7,43-634,72; $P<0,001$) e blue of iris (OR=6,00; IC 95%=1,00-35,91; $P<0,001$). Thus, the identification and characterisation of genetic variants in key genes associated with iris pigmentation will help to predict and characterise this phenotypic trait from the creation of potential genetic profiles of susceptibility.



Índice Geral

Agradecimentos.....	i
Resumo	iii
Abstract	iv
Índice Geral	v
Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas.....	ix
1. Introdução	3
1.1. Conceitos gerais – Pigmentação	3
1.2. Pigmentação da íris.....	6
1.3. Genética da pigmentação da íris	8
1.4. Variabilidade genética da pigmentação da íris	10
1.4.1. Polimorfismos <i>OCA2</i> rs1800407 e <i>HERC2</i> rs12913832	11
1.4.2. Polimorfismo <i>SLC24A4</i> rs12896399.....	12
1.4.3. Polimorfismo <i>TYR</i> rs1393350.....	12
1.4.4. Polimorfismo <i>SLC45A2</i> rs16891982.....	12
1.4.5. Polimorfismo <i>IRF4</i> rs12203592	12
1.5. Aplicações nas Ciências Forenses	13
2. Objetivos.....	17
2.1. Objetivo geral.....	17
2.2. Objetivos específicos	17
3. Material e métodos.....	21
3.1. População	21
3.2. Procedimentos Laboratoriais.....	22
3.2.1. Extração de DNA genómico	22
3.2.2. Quantificação de DNA genómico.....	23



3.2.3. Genotipagem dos polimorfismos	23
3.3. Análise dos resultados	26
4. Resultados	29
4.1. Distribuição das frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos <i>OCA2</i> rs1800407, <i>HERC2</i> rs12913832, <i>IRF4</i> rs12203592, <i>SLC24A4</i> rs12896399, <i>TYR</i> rs1393350 e <i>SLC45A2</i> rs16891982.	29
4.2. Distribuição das frequências genotípicas dos polimorfismos <i>OCA2</i> rs1800407, <i>HERC2</i> rs12913832, <i>IRF4</i> rs12203592, <i>SLC24A4</i> rs12896399, <i>TYR</i> rs1393350 e <i>SLC45A2</i> rs16891982 de acordo com os diferentes padrões de pigmentação da íris.	31
4.3. Influência do polimorfismo <i>HERC2</i> rs12913832 na suscetibilidade para pigmentação clara e azul da íris	37
5. Discussão	41
6. Conclusão	47
7. Referências	51
8. Anexos	59
Anexo A – Questionário	59



Índice de Figuras

Figura 1 – Mecanismo da melanogénese.....	5
Figura 2 – Mecanismo de formação e maturação de melanossomas na íris.....	7
Figura 3 – Representação de um <i>Real-Time PCR</i> relativo ao polimorfismo <i>HERC2</i> rs12913832 (Azul: genótipo GG; Verde: genótipo AG; Vermelho: genótipo AA; Cinza: controlos negativos; X: indeterminado).....	25
Figura 4 – Representação das curvas de fluorescência correspondentes a cada genótipo para o polimorfismo <i>HERC2</i> rs12913832 (A- genótipo AA; B – genótipo AG e C – genótipo GG).....	25



Índice de Tabelas

Tabela I – Caraterísticas da população em estudo.....	21
Tabela II – Caraterísticas dos assays utilizados.....	24
Tabela III – Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos <i>OCA2</i> rs1800407, <i>HERC2</i> rs12913832, <i>IRF4</i> rs12203592, <i>SLC24A4</i> rs12896399, <i>TYR</i> rs1393350 e <i>SLC45A2</i> rs16891982, bem como o valor de P do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, na população em estudo.....	30
Tabela IV – Frequências dos genótipos <i>OCA2</i> rs1800407 na população em estudo de acordo com os diferentes tipos de pigmentação da íris.....	31
Tabela V – Frequências dos genótipos <i>HERC2</i> rs12913832 na população em estudo de acordo com os diferentes tipos de pigmentação da íris.....	33
Tabela VI – Frequências dos genótipos <i>IRF4</i> rs12203592 na população em estudo de acordo com os diferentes tipos de pigmentação da íris.....	34
Tabela VII – Frequências dos genótipos <i>SLC24A4</i> rs12896399 na população em estudo de acordo com os diferentes tipos de pigmentação da íris.....	35
Tabela VIII – Frequências dos genótipos <i>TYR</i> rs1393350 na população em estudo de acordo com os diferentes tipos de pigmentação da íris.....	36
Tabela IX – Frequências dos genótipos <i>SLC45A2</i> rs16891982 na população em estudo de acordo com os diferentes tipos de pigmentação da íris.....	37
Tabela X – OR relativos à suscetibilidade para os portadores do genótipo GG do polimorfismo <i>HERC2</i> rs1293832 apresentarem pigmentação intermédia, verde ou azul..	38



Lista de Abreviaturas

A

A	Adenina
ASIP	<i>Agouti-signaling protein</i>

B

bp	Pares de base
----	---------------

C

C	Citosina
---	----------

D

DHI	5, 6 – dihidroxiindol
DHICA	5, 6 – dihidroxiindol – 2 ácido carboxílico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOPA	3,4 - dihidroxifenilalanina
dp	Desvio padrão

E

EVCs	Caraterísticas físicas externas
------	---------------------------------

H

HERC2	<i>HETC and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2</i>
HLTF	<i>Helicase-like transcription factor</i>

G

G	Guanina
GPR143	<i>G protein-coupled receptor 143</i> (ou OA1)

I

IC	Intervalo de confiança
IRF	Fatores de transcrição de interferões
IRF4	<i>Interferon Regulatory Factor 4</i>



K

kb	Kilobase
kDa	Kilodaltons

L

LEF1	<i>Lymphoid Enhancer-Binding Factor 1</i>
------	---

M

MATP	<i>Membrane-Associated Transporter protein</i>
melanina DHI	Indol – 5, 6 – quinone
melanina DHICA	Indol – 5, 6 – quinone – ácido carboxílico
mg/mL	Miligramas por mililitro
MGB	<i>Minor Groove Binder</i>
MITF	<i>Microphthalmia-associated Transcription Factor</i>
mL	Mililitros
MYO5A	<i>Myosin-Va</i>

N

N	Tamanho da amostra
nm	Nanómetros

O

OCA2	<i>Oculocutaneous Albinism II</i>
OR	<i>Odds Ratio</i>

P

P	Probabilidade
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
Pmel17	<i>Premelanosome protein</i>

R

RFLPs	<i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>
RPE	Epitélio pigmentar da retina
RUV	Radiação Ultravioleta
RUVa	Radiação Ultravioleta tipo A
RUVb	Radiação Ultravioleta tipo B



S

SLC24A4	<i>Solute Carrier Family 24, member 4</i>
SLC24A5	<i>Solute Carrier Family 24 member 5</i>
SLC45A2	<i>Solute Carrier Family 45 member 2</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>

T

T	Timina
TFAP2A	<i>Transcription Factor Activating enhancer-binding Protein 2 alpha</i>
TYR	<i>Tyrosinase</i>
TYRP1	<i>Tyrosinase-Related protein 1</i>
TYRP2	<i>Dopacromo tautomerase (ou Tyrosinase-Related protein 2)</i>

U

μL	Microlitro
----	------------

V

VNTRs	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>
-------	--

X

χ ²	Qui-Quadrado
----------------	--------------





Introdução

1. Introdução

1.1. Conceitos gerais – Pigmentação

A pigmentação caracteriza-se pela concentração de substâncias com coloração designadas por pigmentos em algumas células ou tecidos do organismo [1]. Atualmente encontram-se identificados vários tipos de pigmentos no corpo humano, como os betacarotenos, a hemoglobina e a melanina. Os betacarotenos são pigmentos carotenoides antioxidantes apenas obtidos pela dieta e quando ingeridos em excesso provocam uma coloração amarela na pele, denominada por hiperqueratose. Por sua vez, a hemoglobina constituída estruturalmente por átomos de ferro é responsável pela cor vermelha do sangue. A melanina é um tipo de proteína produzida nos melanócitos a partir de um aminoácido chamado tirosina e tem como principais funções conferir coloração à pele e proteger o DNA das células contra a radiação ultravioleta emitida pelo sol [1].

No ser humano, as pigmentações mais visíveis são a da pele, íris e cabelo, sendo a sua expressão dependente da interação entre fatores genéticos e ambientais [2-5]. A expressão da pigmentação pode ser modificada com o passar do tempo devido a diversas doenças, como por exemplo, a insuficiência renal e o albinismo [6-8]. A pigmentação da pele é considerada um dos melhores exemplos de seleção natural que ocorre no corpo humano. A associação entre as evidências genéticas que demonstram o papel da seleção natural no estabelecimento de fenótipos de pigmentação escura perto do equador e ligeiramente pigmentados próximo dos polos, exige uma análise mais atenta da natureza do agente seletivo primário, a radiação ultravioleta (RUV) [9].

As diferenças na força, distribuição sazonal e bioatividade da radiação ultravioleta tipo A (RUVa) e da radiação ultravioleta tipo B (RUVb) têm vindo a ser reconhecidas, mas a relevância dessas variáveis na evolução da pigmentação da pele humana ainda não se encontra completamente esclarecida.

Durante muito tempo, a principal interface física entre o corpo humano e a radiação solar foi a exposição direta da pele aos diferentes tipos de RUV e, devido a esse facto, na África equatorial, membros do primeiro género *Homo* foram sujeitos à ação conjunta de RUVa e RUVb. A RUVa é indolor e penetra na pele em grande profundidade, até às células da derme. Além disso, este tipo de radiação é considerado o principal produtor de radicais livres e pode afetar prejudicialmente as células a longo prazo, desencadeando desordens pigmentares (melasma, manchas pigmentadas) e fotoenvelhecimento. Este processo de envelhecimento caracteriza-se pela modificação da orientação das fibras de elastina e de colagénio, provocando o relaxamento e a perda de firmeza da pele e o aparecimento de



rugos [10]. Por sua vez, a RUVb é muito energética e apenas pode penetrar nas camadas superficiais da epiderme. Este tipo de radiação é responsável pelo bronzeado, pelas queimaduras bem como pelas reações alérgicas e cânceros cutâneos.

A variação da pigmentação epidérmica é uma característica marcante dos seres humanos e está diretamente correlacionada com a localização geográfica e tipo de ambiente aos quais estão expostos [9]. Neste sentido, encontra-se bem evidenciado que as populações localizadas em latitudes mais baixas têm pigmentação mais escura do que as populações em latitudes mais altas, sugerindo que a pigmentação da pele é uma adaptação à exposição aos diferentes níveis de RUV. Por outro lado, como as regiões equatoriais estão sujeitas a mais RUV do que as regiões temperadas, as populações dessas zonas têm uma maior capacidade de aumentar a produção de eumelanina e, conseqüentemente, apresentar pigmentação mais escura [11]. Em contraste, a biossíntese da vitamina D3 em resposta à diminuição dos níveis de RUV, pode conduzir a seleção de pigmentação clara em altas latitudes.

As características físicas externas (EVCs) que têm por base alterações de pigmentação resultam da presença e distribuição da melanina [12]. A melanina é sintetizada em células denominadas por melanócitos e este processo ocorre dentro de organelos especializados chamados melanossomas [11]. A síntese da melanina ocorre a partir de aminoácidos de fenilalanina, os quais são posteriormente convertidos em tirosina pela enzima fenilalanina hidroxilase ou diretamente a partir de aminoácidos de tirosina que se encontram no citosol dos melanócitos [13]. Através dos transportadores específicos de tirosina que se localizam na membrana do melanossoma, os aminoácidos são transportados para o lúmen deste organelo. Na membrana do melanossoma existem as enzimas tirosinase e dopacromo tautomerase, as quais são glicoproteínas que têm um domínio interno (voltado para o interior do melanossoma), um domínio transmembranário e outro citoplasmático. A tirosinase é a enzima mais importante do processo, porque intervém na base de formação de ambos os tipos de pigmentos de melanina e um déficit desta proteína provoca uma doença denominada de albinismo, a qual é caracterizada pela incapacidade de produzir eumelanina [7, 14]. A tirosina hidroxilase, ativa a tirosinase e esta converte a tirosina em 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) e posteriormente em dopaquinona [15]. Na presença de grupos tiol (-SH) da cisteína, a dopaquinona é convertida em cisteinil-dopa que leva à formação de feomelanina. Na ausência de cisteína a dopaquinona é convertida em dopacromo. Este, por sua vez pode ser oxidado via espontânea em 5, 6 – dihidroxiindol (DHI) e via enzimática em 5, 6 – dihidroxiindol – 2 ácido carboxílico (DHICA) pela enzima dopacromo tautomerase (também conhecida por *Tyrosinase-Related protein 2* – TYRP2). Estes 2 monómeros estão na sua forma inativa e para se tornarem ativos o



DHI é convertido de forma espontânea em indol – 5, 6 – quinone e posteriormente é polimerizado dando origem à melanina DHI e o DHICA converte-se em indol – 5, 6 – quinone – ácido carboxílico, sofrendo depois polimerização originando a melanina DHICA. Todo este processo denomina-se por melanogénese e desta biossíntese resultam dois tipos de melanina: a eumelanina, composta pela melanina DHI e DHICA, e a feomelanina (Figura 1) [1, 16].

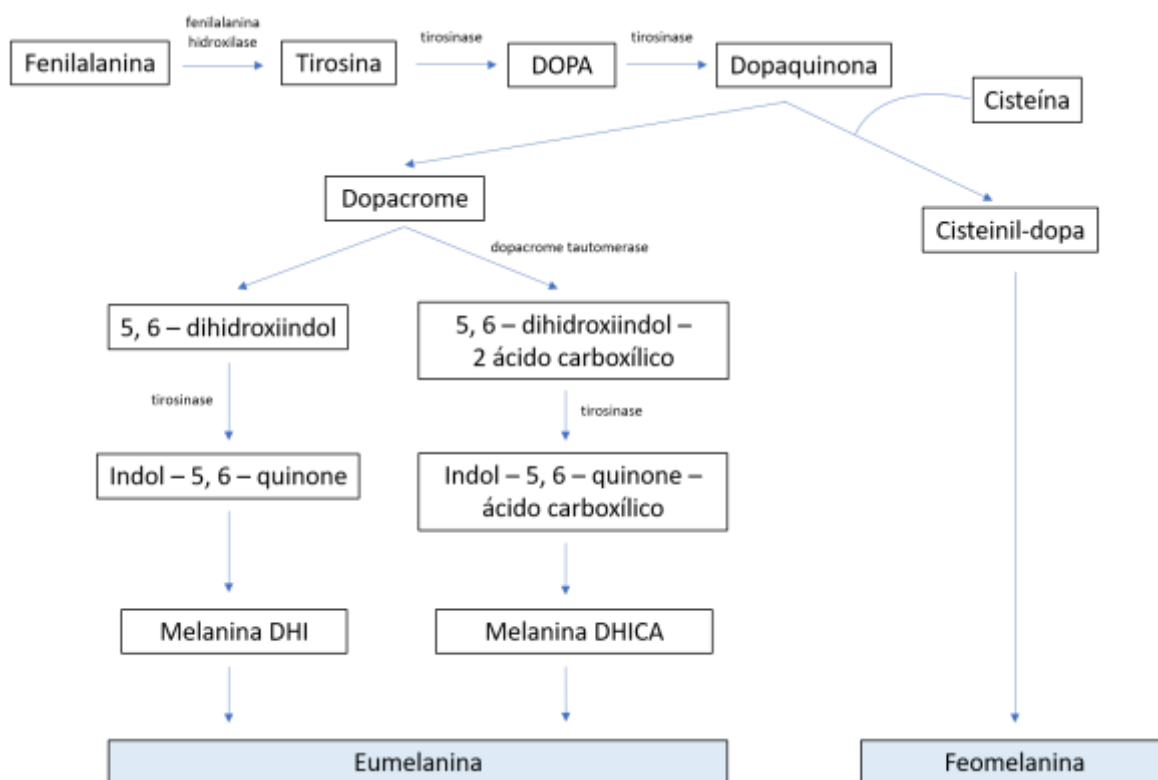


Figura 1 – Mecanismo da melanogénese

A eumelanina, a forma mais comum de melanina, trata-se de um biopolímero que capta luz, sintetizado nos melanossomas e que se caracteriza como um pigmento castanho (melanina DHICA, baixa solubilidade) ou preto (melanina DHI, insolúvel). Por sua vez, a feomelanina é considerado um pigmento amarelo alaranjado produzido por uma via sintética alternativa [17-19]. Sabe-se que os melanossomas que contêm este polímero diferem estruturalmente dos que possuem eumelanina e os próprios pigmentos têm características distintas no que diz respeito à fototoxicidade e potenciais de oxidação. A grande e contínua variação de fenótipos da pigmentação encontra-se por isso, dependente da forma de armazenamento e da razão diferencial entre estes dois tipos de pigmentos [13, 18].



1.2. Pigmentação da íris

A íris faz parte da constituição do olho, estando localizada atrás da córnea e do humor vítreo e à frente da lente e corpo ciliar. É constituída por dois músculos lisos com ações contrárias (dilatação e contração), nomeadamente o músculo esfíncteriano, o qual circula e contrai a pupila sob o efeito da luz brilhante e o músculo dilatador que expande a abertura quando a pupila contrai. Estes músculos controlam o tamanho da pupila que se encontra localizada no centro da íris e determinam a quantidade de luz que chega ao tecido sensorial da retina.

A íris humana começa a formar-se durante o terceiro mês de gestação e as estruturas que criam o seu padrão distinto estão completas no oitavo mês de gestação. Contudo, a expressão da pigmentação continua a definir-se nos primeiros anos após o nascimento. As camadas da íris têm origem embrionária ectodérmica e mesodérmica, sendo constituída do interior para o exterior, por um epitélio pigmentado escuro, músculos dilatadores e esfíncterianos pupilares, um estroma fortemente vascularizado e uma camada anterior de cromatóforos e melanócitos com uma densidade geneticamente determinada pelos grânulos de melanina. A cor da íris é determinada principalmente pela densidade do estroma e pelo seu conteúdo de melanina.

Na íris, a melanina é sintetizada exclusivamente por uma pequena população de células que inclui os melanócitos e o epitélio pigmentar da retina (RPE). Os melanócitos derivam embriologicamente da crista neural e acumulam-se na coroide ou no estroma da íris onde desempenham um papel crítico na fotoproteção do olho [20]. Por sua vez, o RPE está implicado na fotoabsorção, fornecendo um suporte estrutural e funcional aos fotorreceptores e desempenhando também um papel fundamental no desenvolvimento da retina e das vias visuais [21, 22].

Na íris, apesar destas diferenças embriológicas e funcionais, tanto os melanócitos como o RPE têm a capacidade de sintetizar pigmentos de melanina no interior dos melanossomas [14]. Estes fazem parte da via secretora/endocítica e, com base nestas características, são frequentemente relacionados com os lisossomas. O melanossoma é um organelo que possui diversos compartimentos, cuja principal função é a defesa da célula, protegendo-a de precursores de melanina que podem oxidar as membranas lipídicas [14, 20]. Os melanossomas possuem proteínas que servem de base à deposição da melanina, assim como proteínas envolvidas na regulação da biossíntese da melanina (melanogénese) [9, 11]. O pH dos melanossomas é um fator crucial para a síntese de melanina quer nos melanossomas em fase inicial, em que o pH ácido contribui para estabilizar a L-DOPA impedindo a auto-oxidação, quer durante a maturação do



melanossoma, em que o aumento do pH otimiza a atividade da tirosinase para a produção de melanina [7].

Os melanossomas passam por uma série de fases de maturação correspondendo as fases 2 e 3, a organelos imaturos não pigmentados e parcialmente pigmentados, respectivamente. Por sua vez, os melanossomas da fase 4 correspondem a organelos maduros completamente melanizados, cuja estrutura interna fica completamente preenchida pelo pigmento eumelanina (Figura 2) [20, 23]. Neste processo intervêm variadas proteínas como a tirosinase com atividade enzimática, as proteínas *Tyrosinase-Related protein 1* (TYRP1) e TYRP2 e a proteína estrutural *Premelanosome protein* (Pmel17), a qual é o principal constituinte da matriz interna dos organelos. Além destes elementos, intervêm também os transportadores de membrana P, incluindo o *Membrane-Associated Transporter protein* (MATP) e o *Solute Carrier Family 24 member 5* (SLC24A5), envolvidos no controle do pH, osmolaridade e conteúdo de cálcio do melanossoma, respectivamente e finalmente o *G protein-coupled receptor 143* (GPR143), também conhecido como OA1 [8, 9, 14, 19]. Posteriormente, as vesículas enchem-se de estruturas filamentosas dispostas paralelamente, nas quais os grânulos de melanina sintetizados são depositados.

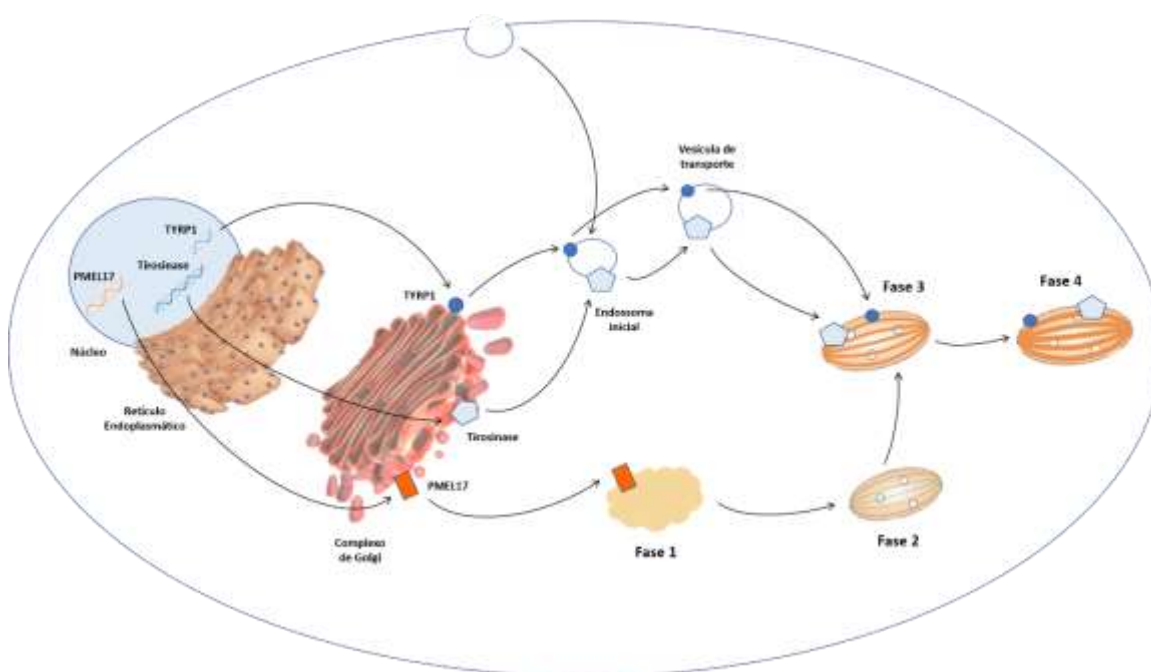


Figura 2 – Mecanismo de formação e maturação de melanossomas na íris.



A pigmentação dos melanócitos e do RPE na íris é determinada geneticamente, sendo que as diferenças fisiológicas na cor dos olhos entre indivíduos não dependem do número de melanócitos, mas do número e tamanho dos melanossomas, da quantidade e qualidade da melanina que contêm e da sua eficiência [24, 25]. As bases moleculares para tais diferenças são consequências de variações genéticas nos genes implicados na biogénese do melanossoma. Além disso, a natureza da variação da cor dos olhos humanos é contínua, desde os tons mais claros de azul até aos tons mais escuros de castanho, sendo esta a cor ancestral presumida, anterior a mutações [11].

Nas tonalidades escuras dos olhos, níveis mais altos de melanina absorvem mais luz, enquanto que a ausência desse pigmento no estroma tende a dispersar a luz e absorve a maior parte da cor, exceto azul [26, 27]. Os tons intermédios complexos, incluindo verde e avelã resultam de diversas quantidades de melanina que refletem a luz de tonalidades mistas. Além disso, diferentes tons destas variações de cor intermédias são determinados pela espessura e densidade da própria íris [28].

1.3. Genética da pigmentação da íris

Nos últimos anos, têm havido alguns avanços científicos na compreensão do sistema de pigmentação, sobretudo devido a estudos em modelos animais e ainda a importantes descobertas através do estudo de desordens da pigmentação no ser humano [1]. Existem várias evidências que parecem demonstrar uma seleção natural independente para diferentes genes relacionados com a pigmentação, entre as populações africanas, europeias e asiáticas. A partir de alguns estudos genómicos e funcionais, foi possível identificar os genes com impacto na biogénese dos melanossomas e na via biossintética da melanina, os quais podem explicar a diversidade encontrada na pigmentação humana [23].

Neste sentido, vários genes incluindo o *HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2 (HERC2)*, *Oculocutaneous Albinism II (OCA2)*, *SLC24A5*, *Solute Carrier Family 45 member 2 (SLC45A2)*, *Tyrosinase (TYR)*, *TYRP1*, *Agouti-signaling protein (ASIP)*, *Solute Carrier Family 24 member 4 (SLC24A4)*, *Myosin-Va (MYO5A)* e *Interferon Regulatory Factor 4 (IRF4)* têm sido associados aos diferentes padrões de expressão da pigmentação da íris e têm sido usados como potenciais fatores preditivos desta característica física [2, 24, 27, 29, 30]. A pigmentação da íris trata-se, portanto, de um fenótipo polimórfico influenciado por múltiplos genes estando, por isso, sob um forte controlo genético, embora inicialmente fosse vista como um simples traço mendeliano



recessivo [31-33]. A variabilidade da cor dos olhos é sobretudo significativa na Europa, constituindo-se um traço altamente diferencial.

Entre os genes mencionados, dois genes vizinhos no cromossoma 15, *HERC2* (locus 15q13) e *OCA2* (locus 15q11.2), são identificados como sendo os genes de maior importância na determinação da pigmentação dos olhos, cabelos e pele em europeus [11, 25, 34-37]. O gene *OCA2* contém 24 exões abrangendo uma região de 345 kb e codifica uma proteína de 838 aminoácidos que contém 12 domínios transmembranares e integra a membrana melanossômica. Lee *et. al* avaliaram a função do gene *OCA2* no processo de melanogénese e concluíram que a proteína *OCA2* poderá ser um transportador de tirosina, um substrato crucial na produção de melanina, sendo que a sua oxidação é considerado o primeiro passo na biogénese da eumelanina e da feomelanina [38].

O gene *HERC2* é constituído por 93 exões e expressa uma proteína de 528 kDa, pertencente à família das proteínas HERC que intervêm em inúmeros processos celulares, desde o ciclo celular, à sinalização e ao transporte membranar [39]. Recentemente foi ainda sugerido o envolvimento do gene *HERC2* na resposta celular aos danos no DNA, na regulação da replicação do DNA e da atividade do gene *TP53* [40]. Algumas evidências demonstram que grande parte da variação da pigmentação da íris deve-se à interação entre o gene *HERC2* e *OCA2*, dado o papel regulador do *HERC2* na expressão do *OCA2*, o qual resulta numa variação fenotípica da íris [11, 17, 41].

O gene *SLC24A4*, localizado no locus 14q32.12 é um gene que está envolvido na variação da pigmentação da pele, cabelo e olhos. Além disso, intervêm no transporte de glicose e outros açúcares, sais biliares e ácidos orgânicos, iões metálicos e compostos de amina [19].

O gene *TYR*, localizado no locus 11q14 codifica a enzima tirosinase, responsável pela conversão da tirosina em L-DOPA, no primeiro passo da via bioquímica para a produção de melanina [1, 11]. Como já foi referido anteriormente, o pH dos melanossomas é um fator crucial para a síntese de melanina, sendo que em melanossomas em fase inicial, o pH ácido contribui para estabilizar a L-DOPA impedindo a auto-oxidação e o aumento do pH durante a maturação do melanossoma otimiza a atividade da tirosinase e a produção da melanina [15].

O gene *SLC45A2*, localizado no locus 5p13.2, é composto por sete exões que codificam a proteína MATP. Esta apresenta 12 domínios transmembranares e regula a síntese de melanina por meio da circulação de tirosinase e transporte de protões até aos melanossomas [15, 42, 43].

Por fim, o gene *IRF4* encontra-se localizado no cromossoma 6, locus 6p25, sendo constituído por 9 exões e 8 intrões, e codifica uma proteína pertencente à família dos



Fatores de Transcrição de Interferões (IRF). Os IRF são mediadores da transcrição e indutores de vias de sinalização de vírus, bactérias e interferões, com importantes funções na resposta imunitária, regulação do crescimento celular e apoptose. O *IRF4* é expresso em todas as fases de desenvolvimento das células B, nas células T maduras, macrófagos, em células dendríticas e linhagens de melanócitos [34].

1.4. Variabilidade genética da pigmentação da íris

A variabilidade genética é considerada o principal fator responsável pela mudança evolutiva e desde que Darwin propôs a teoria da evolução por seleção natural, o padrão de variação genética na população tem sido objeto de investigação científica.

Os polimorfismos genéticos são um dos principais tipos de variação genética e caracterizam-se como sendo formas alternativas de um gene ou de uma sequência intergênica, apresentando uma frequência igual ou superior a 1% numa população normal [2, 44]. Existem vários tipos de polimorfismos, nomeadamente os *Restriction Fragment Length Polymorphisms* (RFLPs), *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTRs) e *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs). Especificamente, os SNPs são o tipo de polimorfismo mais comum, correspondendo a 90% das variações nucleotídicas conhecidas no genoma humano, no qual já foram identificados milhões de SNPs que parecem ser responsáveis pela maior parte da variabilidade genética interindividual. Consistem na substituição de uma única base e estima-se que ocorram uma vez em cada 300-2000 pares de bases (bp) e podem ocorrer em qualquer região do genoma. Deste modo, se os SNPs forem identificados em regiões exônicas (regiões não codificantes) podem modificar a expressão do aminoácido e, conseqüentemente, afetar a atividade da proteína sintetizada ou ser silenciosos, não exercendo qualquer efeito na expressão do gene em que se encontram. Por outro lado, os SNPs podem estar localizados em regiões intrônicas (regiões codificantes) e produzir vários efeitos funcionais, tais como, afetar a expressão gênica, alterar a sequência proteica e diminuir ou aumentar a expressão do gene, no caso de localizarem na região promotor desse gene [11].

Dado que os SNPs apresentam baixa taxa de mutação, podem ser utilizados como marcadores genéticos para avaliar padrões de herança das regiões cromossômicas de geração em geração e, por este motivo, são ótimos marcadores de ancestralidade. Além disso, têm desempenhado um papel importante em estudos filogeográficos e filogenéticos, e têm vindo a ser usados como ferramentas úteis no estudo de fatores genéticos associados a doenças humanas relacionadas com a pigmentação dos indivíduos [5, 15].



Com base em diversos estudos existentes, tem-se vindo a estabelecer um efeito combinado entre as variações genéticas e os fatores ambientais, o qual parece ser responsável pela manifestação de algumas características fenotípicas dos indivíduos, nomeadamente da pigmentação. Neste sentido, a identificação e caracterização de variantes genéticas em genes alvo associados com a biogénese da melanina e, consequentemente, com a expressão dos diferentes padrões de pigmentação da íris, podem contribuir para a previsão e caracterização deste traço fenotípico, com base na definição de perfis genéticos de suscetibilidade.

Atualmente encontra-se disponível um sistema de genotipagem multiplex altamente sensível que inclui a análise de 6 SNPs (*HERC2* rs12913832, *OCA2* rs1800407, *IRF4* rs12203592, *SLC24A4* rs12896399, *TYR* rs1393350 e *SLC45A2* rs16891982), associados com a pigmentação da íris [27, 45-47]. Inicialmente, este modelo preditivo foi testado numa população holandesa, tendo sido posteriormente validado numa população de 3800 indivíduos europeus oriundos de sete países diferentes. Os resultados obtidos foram semelhantes entre a primeira aplicação deste modelo na população holandesa e a sua validação numa população europeia mais heterogénea [27]. Desta forma, o IrisPlex pode ser considerado um sistema robusto, fiável, credível, de fácil aplicação e pronto para ser usado no quotidiano das necessidades das ciências forenses [14, 17].

1.4.1. Polimorfismos *OCA2* rs1800407 e *HERC2* rs12913832

O gene *OCA2*, também conhecido como gene P, tem como principal função a regulação do pH melanossomal. Em 2012, num ensaio experimental, o polimorfismo *HERC2* rs12913832 mostrou que funciona como regulador da transcrição do gene *OCA2*, modulando o enrolamento da cromatina [11, 17, 41].

O polimorfismo *OCA2* rs1800407 consiste na alteração de uma citosina (C) por uma timina (T) na posição 419 do exão 13 do gene *OCA2*, resultando na substituição a nível da transcrição da arginina (CCG) pela glutamina (CTG). Por sua vez, o polimorfismo *HERC2* rs12913832 localiza-se no intrão 86 do gene *HERC2*, 21kb acima do promotor do gene *OCA2* e consiste na modificação de uma adenina (A) por uma guanina (G). Esta alteração parece explicar praticamente toda a associação entre a cor azul-castanha do olho [11, 25, 34-37]. O alelo G do polimorfismo *HERC2* rs12913832 é comum apenas em europeus, particularmente os descendentes do leste europeu, estando associado ao fenótipo azul da íris [25, 27]. Por outro lado, o alelo A do polimorfismo *HERC2* rs12913832 recruta os fatores de transcrição *Helicase-like transcription factor* (HLTF), *Lymphoid Enhancer-Binding Factor 1* (LEF1) e *Microphthalmia-associated transcription factor* (MITF), que em combinação com



o promotor do gene *OCA2*, resultam numa maior produção de melanina e pigmentação escura [48].

1.4.2. Polimorfismo *SLC24A4* rs12896399

O polimorfismo *SLC24A4* rs12896399 resulta na substituição de uma timina (T) por uma guanina (G). O alelo T deste polimorfismo foi associado à determinação da cor dos olhos mais clara (azul e verde) [11].

1.4.3. Polimorfismo *TYR* rs1393350

O *TYR* rs1393350 é um polimorfismo que consiste na substituição de uma adenina (A) por uma guanina (G). Este polimorfismo é altamente polimórfico nos europeus, e o alelo A foi associado à ausência de sardas e à cor clara dos olhos e da pele [4, 49, 50].

1.4.4. Polimorfismo *SLC45A2* rs16891982

Um estudo realizado caracterizou diversos polimorfismos no gene *SLC45A2* que apresentam interações significativas com fenótipos de pigmentação [51]. O polimorfismo *SLC45A2* rs16891982 consiste na alteração de uma citosina (C) por uma guanina (G) na posição 374 do exão 5 do gene *SLC45A2*, resultando na substituição de uma leucina (TTG) por uma fenilalanina (TTC). O efeito funcional deste polimorfismo ainda não se encontra totalmente elucidado, pois as evidências relatadas quanto à sua funcionalidade são controversas. Neste sentido alelo C foi associado a fenótipos de pigmentação de tom clara (cabelos loiros, olhos azuis e pele clara) em estudos de associação considerando populações de diferentes ancestralidades [15]. Além disso, encontra-se também descrito que a frequência alelo G diminui ao longo do sul da Europa, estando associado à pigmentação mais clara da pele, cabelos e olhos em populações modernas [9, 52, 53].

1.4.5. Polimorfismo *IRF4* rs12203592

Alguns estudos têm vindo a associar este gene às células da pigmentação por ser expresso nos melanócitos da pele quando ativado por um fator de transcrição designado MITF, considerado o regulador mestre dos melanócitos. A cooperação entre as proteínas



IRF4 e MITF conduz à expressão do gene que codifica a tirosinase, através das suas ligações ao promotor do gene desta enzima, que é responsável pelo primeiro passo da melanogénese [54].

Este polimorfismo localizado no intrão 4 do gene *IRF4* consiste na substituição de uma citosina (C) por timina (T) e encontra-se associado a uma pele mais clara com menor capacidade de bronzamento e olhos de cor clara [55, 56].

Dado que os genes *OCA2*, *HERC2*, *SLC24A4*, *TYR*, *SLC45A2* e *IRF4* parecem influenciar o processo de melanogénese, por proporcionarem diferentes intensidades de pigmentação, torna-se crucial compreender de que forma variantes genéticas funcionais nestes genes condicionam a expressão de diferentes padrões de pigmentação da íris.

1.5. Aplicações nas Ciências Forenses

A fenotipagem do DNA é uma investigação a decorrer na área da genética forense [11, 29, 35, 57], destacando-se a procura de marcadores genéticos não codificantes com o intuito de conseguir obter um conjunto de características físicas externas de um indivíduo através de um vestígio biológico [5, 28, 35, 58].

Caso seja possível obter EVCs através de marcadores de DNA confiáveis com a utilização do material biológico encontrado num cenário de crime, espera-se que as suas aplicações forenses sejam úteis para concentrar investigações policiais em grupos específicos de pessoas, reduzindo assim o número de potenciais suspeitos a serem analisados por meio de perfis de DNA convencionais [11, 28, 47, 59, 60].

A fenotipagem de DNA pode ser usada como uma ferramenta de pesquisa, não apenas para casos criminais, mas também na procura de pessoas desaparecidas ou desastres de massa [35, 37, 61]. Sendo que a informação do perfil fenotípico de DNA recolhida por esta via pode contribuir para corroborar ou negar as declarações das testemunhas oculares [11].





Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

– Analisar a influência de variações genéticas nos genes *OCA2*, *HERC2*, *SLC24A4*, *TYR*, *SLC45A2* e *IRF4* no desenvolvimento de diferentes padrões de pigmentação da íris, numa população universitária no Norte de Portugal.

2.2. Objetivos específicos

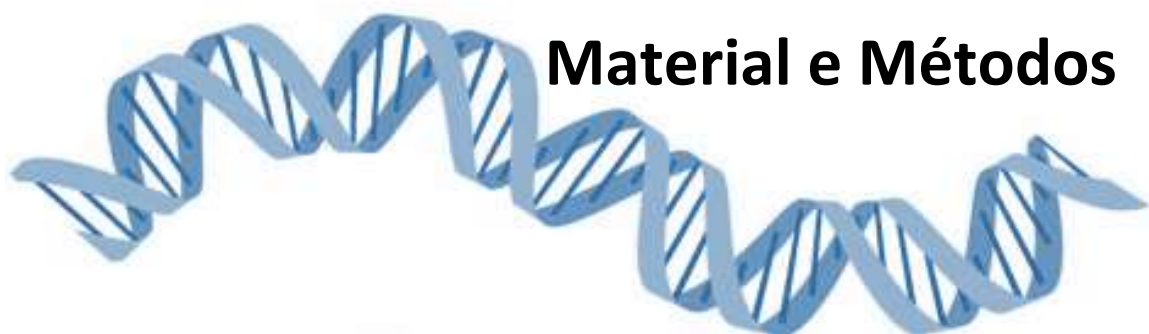
– Otimizar o procedimento experimental de genotipagem para os polimorfismos *OCA2* rs1800407, *HERC2* rs12913832, *IRF4* rs12203592, *SLC24A4* rs12896399, *TYR* rs1393350 e *SLC45A2* rs16891982.

– Avaliar as distribuições genotípicas e alélicas dos polimorfismos selecionados na população universitária estudada.

– Investigar o potencial papel dos polimorfismos estudados como fatores preditivos dos diferentes padrões de pigmentação da íris.

– Estabelecer potenciais perfis genéticos, baseados nos polimorfismos avaliados, com capacidade preditiva da cor dos olhos.





Material e Métodos

3. Material e métodos

3.1. População

Para a realização deste trabalho experimental foram recrutados ao acaso alunos do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto que estivessem a frequentar o Mestrado Integrado em Medicina ou o Mestrado de Medicina Legal, no ano letivo 2018/2019. Os indivíduos participantes responderam a um questionário (anexo A), de modo a ser possível obter informações sobre algumas características sociodemográficas (sexo, idade, cor dos olhos e ascendência geográfica) e cederam uma amostra biológica de células do epitélio bucal que foi utilizada com o seu conhecimento e consentimento, de acordo com a declaração de Helsínquia. Participaram no estudo 130 indivíduos, dos quais 40 eram homens e 90 eram mulheres, com uma idade média de 23,06 anos (desvio padrão $\pm 2,77$) e mediana de 23 anos (Tabela I).

Tabela I – Características da população em estudo.

Caraterísticas	Frequências	%
Idade		
Média $\pm$ desvio padrão	23,06 $\pm$ 2,77	
Mediana	23	
Sexo		
Feminino	90	69,23
Masculino	40	30,77
Total	130	100,00
Pigmentação da íris		
Castanha	104	80,00
Castanha esverdeada	6	4,61
Verde	15	11,54
Azul	5	3,85
Total	130	100,00



3.2. Procedimentos Laboratoriais

3.2.1. Extração de DNA genómico

O isolamento do DNA genómico, a partir das amostras biológicas obtidas por zaragatoa bucal (células epiteliais), foi realizado através do Kit de extração da *Grisp Research Solutions* (GRS Genomic DNA Kit – BroadRange - #GK06.0100). A extração do DNA foi efetuada mediante um sistema de colunas de centrifugação, de acordo com as recomendações fornecidas pelo fabricante. Este procedimento laboratorial é baseado na grande afinidade de ligação do DNA à membrana de sílica-gel que reveste as colunas de centrifugação. A presença adicional de resinas iónicas envolvidas em solução alcoólica na membrana permite a desnaturação de proteínas contaminantes.

Este procedimento consiste essencialmente em três etapas: adsorção, lavagem e eluição do DNA. Para que a adsorção ocorra, isto é, a ligação do DNA às partículas de sílica, deve ser utilizada uma solução tampão de elevada carga iónica e baixo valor de pH. Seguidamente, é necessário a realização de várias lavagens, através de soluções-tampão com etanol, de modo a remover proteínas, polissacarídeos e sais. Por fim, o DNA é eluído num tampão de eluição, de baixa concentração salina e elevado pH.

De acordo com as instruções do fabricante, para a extração de DNA a partir da zaragatoa bucal foi necessário colocar a zaragatoa num *eppendorf* de 1,5 mL, adicionar 500 µL de *buffer* BR1 e 20 µL de *Proteinase K* (10mg/mL) e incubar as amostras a 60°C durante 10 minutos. De seguida, procedeu-se à remoção da zaragatoa, adicionou-se 500 µL de *buffer* BR2, misturou-se no vortex vigorosamente e incubou-se as amostras a 60°C durante 10 minutos. Posteriormente, adicionou-se 500 µL de etanol a 100% e misturou-se no vortex durante 10 segundos. Seguidamente transferiu-se o conteúdo de cada amostra para uma coluna, centrifugou-se a 15 000 G durante 1 minuto e trocou-se de reservatório. Em seguida, adicionou-se 400 µL de *buffer* Wash 1, centrifugou-se a 15 000 G durante 1 minuto e trocou-se de reservatório. Adicionou-se 600 µL de *buffer* Wash 2, centrifugou-se a 15 000 G durante 4 minutos e trocou-se de reservatório. Transferiu-se a coluna para um *eppendorf* de 1,5 mL e adicionou-se 100 µL de *buffer* Elution, incubou-se as amostras à temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos e centrifugou-se durante 1 minuto. Por fim, o DNA genómico foi armazenado a -20°C para preservação da amostra a longo prazo.



3.2.2. Quantificação de DNA genômico

Após o isolamento do DNA genômico, a concentração e pureza das amostras foram determinadas por medição da absorvância a 260 nm e 280 nm, usando o espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 – Thermo Scientific).

3.2.3. Genotipagem dos polimorfismos

A caracterização dos polimorfismos genéticos *HERC2* rs12913832, *OCA2* rs1800407, *IRF4* rs12203592, *SLC24A4* rs12896399, *TYR* rs1393350 e *SLC45A2* rs16891982 na população estudada foi realizada por discriminação alélica, através de tecnologia *TaqMan* (Applied Biosystems), utilizando a técnica *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Tabela II). Este procedimento permite detectar e quantificar os produtos de PCR em tempo real, à medida que o DNA-alvo é amplificado, ao mesmo tempo que permite reduzir a probabilidade de contaminação, mistura de reagentes ou perda de amostra.

Esta técnica baseia-se na discriminação alélica por emissão de fluorescência e utiliza sondas oligonucleotídicas de ligação ao DNA. Para tal, é necessária a ligação de dois fluoróforos (VIC®; FAM™) à extremidade 5' de cada uma das sondas de discriminação alélica, assim como a ligação adicional de uma molécula *minor groove binder* (MGB) à extremidade 3', de modo a estabilizar as sondas na cadeia de DNA complementar.

O fluoróforo repórter emite energia sob a forma de fluorescência para uma molécula (*quencher*) não fluorescente aceitadora dessa energia, quando estão próximos. Desta forma, a energia emitida pelo fluoróforo repórter e específica do alelo em estudo, é absorvida pelo *quencher* sem ser detectada, até que a ligação da sonda ao DNA permita o afastamento dos fluoróforos e a sua identificação na fase exponencial da reação. No processo de amplificação, a sonda é degradada devido à atividade exonuclease 5'–3' da *Taq DNA Polimerase*, separando o *quencher* da molécula fluorescente durante a extensão. Esta separação resulta num aumento da intensidade da fluorescência. A discriminação alélica ocorre por emparelhamento seletivo de uma das sondas ou ambas perante heterozigotia, utilizando, para tal, a sequência complementar entre os *primers forward* e *reverse*.



Tabela II – Caraterísticas dos assays utilizados.

Polimorfismo	Assay utilizado	Fluoróforo VIC específico	Fluoróforo FAM específico	Sequência genética
OCA2 rs1800407	C___8866200_10	alelo C	alelo T	TGATCATGGCCCA CACCCGTCCC[C/T] GGGAGAGCCGGTA TGCCTGGCCACA
HERC2 rs12913832	C__30724404_10	alelo A	alelo G	GAGGCCAGTTTCA TTTGAGCATTA[A/G] TGTCAAGTTCTG CACGCTATCATCA
IRF4 rs12203592	C__31918199_10	alelo C	alelo T	ATCCACTTTGGTG GGTAAAAGAAGG[C/T] AAATTCCCCTG TGGTACTTTTGGTG
SLC24A4 rs12896399	C___3244615_10	alelo G	alelo T	GTTCTTTAGGTCAG TATATTTTGGG[G/T] TCTCTTTGTCACA GCAGATTAACT
TYR rs1393350	C___9491300_10	alelo A	alelo G	TCTTCCTCAGTCCC TTCTCTGCAAC[A/G] AAATCTGTGTGGT CTTTTACAAATG
SLC45A2 rs16891982	C___2842665_10	alelo C	alelo G	TGAGGAAAACACG GAGTTGATGCA[C/G] AAGCCCCAACAT CCAACCTCGACTC

A reação de amplificação foi efetuada para um volume de 6 µL/caso, contendo 2,5 µL de *Taqman Universal Master Mix*, 0,125 µL de *Single Nucleotide Polymorphism Genotyping assay*, 2,375 µL de água bidestilada estéril e 1 µL de DNA genómico. As condições de amplificação basearam-se na ativação da *Taq DNA Polimerase* a 95°C durante 10 minutos, seguindo-se 45 ciclos de 92°C durante 15 segundos para desnaturação e 60°C durante 1 minuto para emparelhamento dos *primers* e extensão.

Os produtos amplificados para os seis polimorfismos foram detetados e analisados recorrendo ao aparelho *StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems)* software, versão 2.3. Como exemplo, as figuras 3 e 4 ilustram o resultado da genotipagem obtido para o polimorfismo *HERC2* rs12913832.



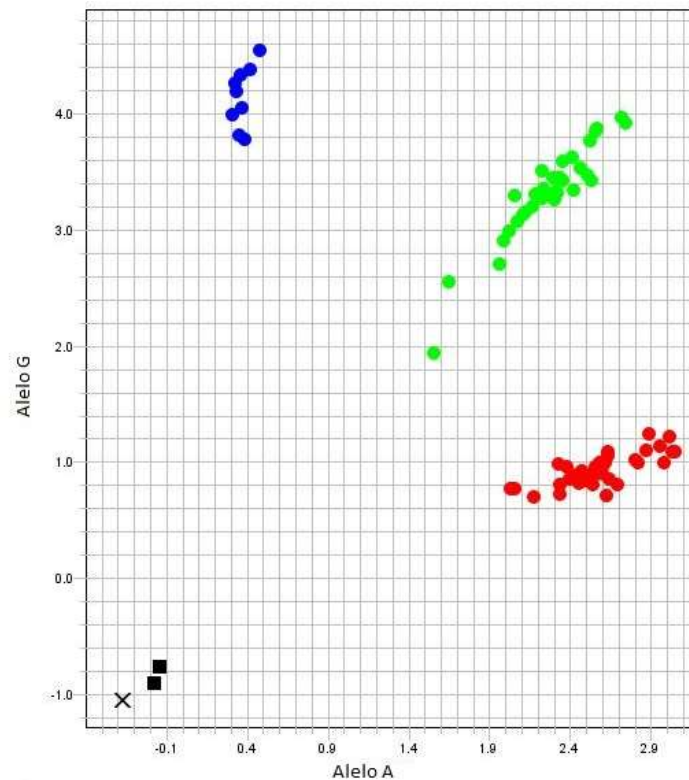


Figura 3 – Representação de um *Real-Time PCR* relativo ao polimorfismo *HERC2* rs12913832 (Azul: genótipo GG; Verde: genótipo AG; Vermelho: genótipo AA; Cinza: controlos negativos; X: indeterminado).

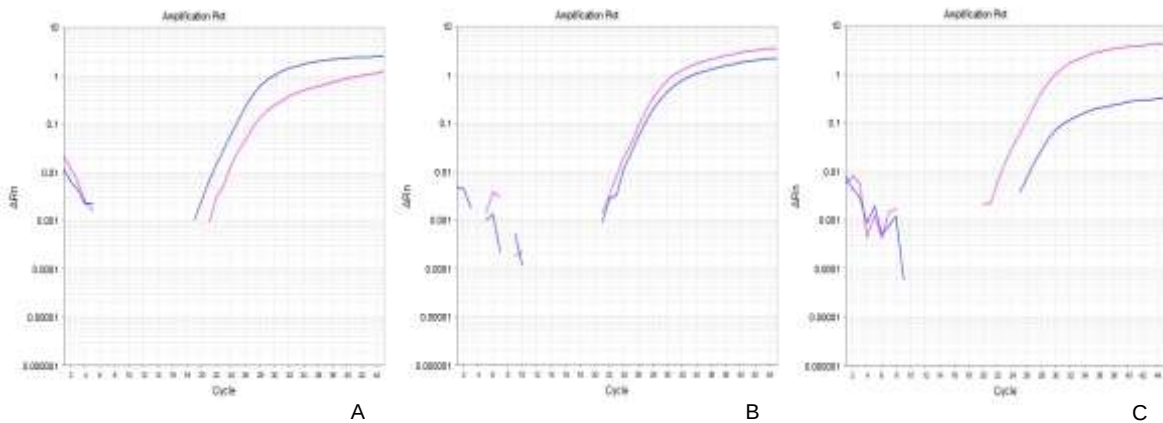


Figura 4 – Representação das curvas de fluorescência correspondentes a cada genótipo para o polimorfismo *HERC2* rs12913832 (A- genótipo AA; B – genótipo AG e C – genótipo GG).



De forma a assegurar o controlo de qualidade da genotipagem, foram usados dois controlos negativos em cada reação para confirmar a ausência de contaminação, a genotipagem foi realizada sem conhecimento prévio das características fenotípicas dos indivíduos e os resultados da discriminação alélica foram repetidos de forma aleatória em 10% das amostras e analisados por dois investigadores independentes.

3.3. Análise dos resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada com recurso ao programa estatístico SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*, versão 25.0).

O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foi calculado através do teste *Qui-Quadrado* (X^2), para comparação das frequências genotípicas observadas *versus* esperadas. A análise pelo teste X^2 foi também utilizada para a comparação das diferentes variáveis categóricas, com um nível de significância de 5%. O valor de *P*, obtido pelo teste de X^2 , foi considerado estatisticamente significativo quando inferior a 0,05.

O valor de *Odds Ratio* (OR), indicativo do risco relativo para determinado acontecimento foi calculado juntamente com o intervalo de confiança de 95% (IC 95%) como medida de associação entre os genótipos dos polimorfismos estudados e a suscetibilidade para apresentar diferentes padrões de pigmentação da íris.



Resultados



4. Resultados

4.1. Distribuição das frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos *OCA2* rs1800407, *HERC2* rs12913832, *IRF4* rs12203592, *SLC24A4* rs12896399, *TYR* rs1393350 e *SLC45A2* rs16891982.

A análise do Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* na população em estudo, de acordo com os genótipos, permitiu observar que as frequências genotípicas observadas eram similares às esperadas para os polimorfismos *OCA2* rs1800407 ($P=0,350$), *HERC2* rs12913832 ($P=0,259$), *IRF4* rs12203592 ($P=0,396$), *SLC24A4* rs12896399 ($P=0,896$), *TYR* rs1393350 ($P=0,197$) e *SLC45A2* rs16891982 ($P=0,292$) (Tabela III).

Quanto ao polimorfismo *OCA2* rs1800407 nos 130 indivíduos estudados, 83,1% são portadores do genótipo CC, 15,4% do genótipo CT e 1,5% do genótipo TT, sendo o genótipo CC o mais frequente, seguido do CT e o TT o menos frequente. Relativamente às frequências alélicas, para o alelo C foi de 90,8% e para o alelo T 9,2%.

Relativamente à distribuição dos genótipos do polimorfismo *HERC2* rs12913832, dos 130 indivíduos incluídos no estudo, 40,0% apresentam o genótipo AA, 50,0% o genótipo AG e 10,0% o genótipo GG, sendo o genótipo AG o mais frequente, seguido do AA e o GG o menos frequente. Em relação às frequências alélicas para o alelo A obteve-se 65,0% e para o alelo G 35,0%.

Em relação ao polimorfismo *IRF4* rs12203592, dos 130 indivíduos estudados, 86,2% têm o genótipo CC, 13,8% o genótipo CT e 0,0% o genótipo TT, sendo o genótipo CC o mais frequente, seguido do CT e o TT o menos frequente. Quanto à frequência alélica, para o alelo C é 93,1% enquanto para o alelo T é 6,9%.

Quanto ao polimorfismo *SLC24A4* rs12896399 nos 129 indivíduos estudados, 45,7% são portadores do genótipo GG, 43,4% do genótipo GT e 10,9% do genótipo TT, sendo o genótipo GG o mais frequente, seguido do GT e o TT o menos frequente. Relativamente às frequências alélicas, para o alelo G foi de 67,4% e para o alelo T 32,6%.

Relativamente à distribuição dos genótipos do polimorfismo *TYR* rs1393350, dos 130 indivíduos incluídos no estudo, 4,6% apresentam o genótipo AA, 25,4% o genótipo AG e 70,0% o genótipo GG, sendo o genótipo GG o mais frequente, seguido do AG e o AA o menos frequente. Em relação às frequências alélicas para o alelo A obteve-se 17,3% e para o alelo G 82,7%.

Em relação ao polimorfismo *SLC45A2* rs16891982, dos 129 indivíduos estudados, 8,5% têm o genótipo CC, 34,9% o genótipo CG e 56,6% o genótipo GG, sendo o genótipo



GG o mais frequente, seguido do CG e o CC o menos frequente. Quanto à frequência alélica, para o alelo C é 26,0% enquanto para o alelo G é 74,0%.

Tabela III – Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos *OCA2* rs1800407, *HERC2* rs12913832, *IRF4* rs12203592, *SLC24A4* rs12896399, *TYR* rs1393350 e *SLC45A2* rs16891982, bem como o valor de P do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, na população em estudo.

	Frequências Genotípicas			Equilíbrio de Hardy-Weinberg <i>P</i>	Frequências alélicas	
		N	%		Alelo	%
<i>OCA2</i> rs1800407 N=130	CC	108	83,1	0,350	Alelo C	90,8
	CT	20	15,4		Alelo T	9,2
	TT	2	1,5			
<i>HERC2</i> rs12913832 N=130	AA	52	40,0	0,259	Alelo A	65,0
	AG	65	50,0		Alelo G	35,0
	GG	13	10,0			
<i>IRF4</i> rs12203592 N=130	CC	112	86,2	0,396	Alelo C	93,1
	CT	18	13,8		Alelo T	6,9
	TT	0	0			
<i>SLC24A4</i> rs12896399 N=129	GG	59	45,7	0,896	Alelo G	67,4
	GT	56	43,4		Alelo T	32,6
	TT	14	10,9			
<i>TYR</i> rs1393350 N=130	AA	6	4,6	0,197	Alelo A	17,3
	AG	33	25,4		Alelo G	82,7
	GG	91	70,0			
<i>SLC45A2</i> rs16891982 N=129	CC	11	8,5	0,292	Alelo C	26,0
	CG	45	34,9		Alelo G	74,0
	GG	73	56,6			



4.2. Distribuição das frequências genótípicas dos polimorfismos *OCA2* rs1800407, *HERC2* rs12913832, *IRF4* rs12203592, *SLC24A4* rs12896399, *TYR* rs1393350 e *SLC45A2* rs16891982 de acordo com os diferentes padrões de pigmentação da íris.

A distribuição dos genótipos do polimorfismo *OCA2* rs1800407, em função dos diferentes tipos de pigmentação da íris na população estudada está representada na Tabela IV. As frequências dos genótipos CC, CT e TT, tendo em conta a pigmentação castanha foram de 84,62%, 14,42% e 0,96%, respetivamente. Para a pigmentação castanha esverdeada, o genótipo CC apresentou uma frequência de 83,33%, o genótipo CT de 16,67% e o genótipo TT de 0,00%. No caso da pigmentação verde, as frequências observadas foram de 66,67%, 26,67% e 6,66%, para os genótipos CC, CT e TT, respetivamente. Quanto à pigmentação azul, 100% dos casos foram portadores do genótipo CC. Relativamente à frequência dos genótipos *OCA2* rs1800407 na população em estudo de acordo como os diferentes tipos de pigmentação da íris, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P=0,397$).

Tabela IV – Frequências dos genótipos *OCA2* rs1800407 na população em estudo de acordo com os diferentes tipos de pigmentação da íris.

Pigmentação da íris	Genótipos <i>OCA2</i> rs1800407			Total	P
	CC N (%)	CT N (%)	TT N (%)		
Castanha	88 (84,62)	15 (14,42)	1 (0,96)	104	0,397
Castanha Esverdeada	5 (83,33)	1 (16,67)	0 (0,00)	6	
Verde	10 (66,67)	4 (26,67)	1 (6,66)	15	
Azul	5 (100)	0 (0,00)	0 (0,00)	5	
Total	108	20	2	130	

P - Valor de P obtido pelo teste χ^2 .



Na Tabela V encontra-se descrita a distribuição genotípica do polimorfismo *HERC2* rs12913832 de acordo com os diferentes tipos de pigmentação da íris na população analisada. As frequências dos genótipos AA, AG e GG, tendo em conta a pigmentação castanha foram de 49,04%, 50,00% e 0,96%, respetivamente. Para a pigmentação castanha esverdeada, o genótipo AA apresentou uma frequência de 16,67%, o AG de 66,66% e o GG de 16,67%. No caso da pigmentação verde, as frequências observadas foram de 60,00% e 40,00%, para os genótipos AG e GG, respetivamente. Por fim, para a pigmentação azul, os genótipo GG, apresentou uma frequência de 100,00%. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas na frequência dos genótipos *HERC2* rs12913832 da população estudada de acordo como os tipos de pigmentação da íris ($P < 0,001$). Tendo em conta o modelo genético dominante (AA/AG vs. GG) para todos os tipos de pigmentação, continuou-se a observar-se diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,001$) entre os indivíduos portadores do alelo A e com o genótipo GG.

Adicionalmente, de todos os indivíduos portadores do genótipo GG, 84,62% apresentaram olhos claros (verdes e azuis). Deste modo, os resultados obtidos parecem indicar que indivíduos com genótipo GG têm tendência para apresentar pigmentação clara da íris. Tal, é comprovado pelo aumento no número de indivíduos com este genótipo, nas pigmentações claras da íris (verde e azul), culminando no facto de todos os indivíduos de olhos azuis apresentarem o genótipo GG. É ainda possível realçar que a percentagem dos 52 indivíduos com genótipo AA não terem olhos castanhos é de apenas 1,92%, ou seja, 98,08% dos indivíduos com este genótipo possuem pigmentação castanha da íris. Desta forma, o genótipo AA poderá ter um papel preditivo na determinação da pigmentação castanha da íris.



Tabela V – Frequências dos genótipos *HERC2 rs12913832* na população em estudo de acordo com os diferentes tipos de pigmentação da íris.

Pigmentação da íris	Genótipos <i>HERC2 rs12913832</i>			Total	P
	AA N (%)	AG N (%)	GG N (%)		
Castanha	51 (49,04)	52 (50,00)	1 (0,96)	104	<0,001
Castanha Esverdeada	1 (16,67)	4 (66,66)	1 (16,67)	6	
Verde	0 (0,00)	9 (60,00)	6 (40,00)	15	
Azul	0 (0,00)	0 (0,00)	5 (100,00)	5	
Total	52	65	13	130	

P - Valor de P obtido pelo teste χ^2 .

Na Tabela VI encontra-se representada a distribuição dos genótipos *IRF4 rs12203592* em relação aos diferentes tipos de pigmentação da íris na população em estudo. As frequências dos genótipos CC e CT, tendo em conta a pigmentação castanha para a cor dos olhos foram de 84,62% e 15,38%, respetivamente. Para a pigmentação castanha esverdeada, o genótipo CC apresentou uma frequência de 100,00%. No caso da pigmentação verde, as frequências observadas foram de 86,67% e 13,33% para os genótipos CC e CT, respetivamente. Por fim, para a pigmentação azul, o genótipo CC apresentou uma frequência de 100,00%. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na frequência dos genótipos *IRF4 rs12203592* da população em estudo de acordo com os tipos de pigmentação da íris ($P=0,512$).



Tabela VI – Frequências dos genótipos *IRF4* rs12203592 na população em estudo de acordo com os diferentes tipos de pigmentação da íris.

Pigmentação da íris	Genótipos <i>IRF4</i> rs12203592			Total	P
	CC N (%)	CT N (%)	TT N (%)		
Castanha	88 (84,62)	16 (15,38)	0 (0,00)	104	0,512
Castanha Esverdeada	6 (100,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	6	
Verde	13 (86,67)	2 (13,33)	0 (0,00)	15	
Azul	5 (100,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	5	
Total	112	18	0	130	

P - Valor de P obtido pelo teste χ^2 .

Na Tabela VII encontra-se descrita a distribuição genotípica do polimorfismo *SLC24A4* rs12896399 de acordo com os tipos de pigmentação da íris na população analisada. As frequências dos genótipos GG, GT e TT, tendo em conta a pigmentação castanha foram de 43,69%, 43,69% e 12,62%, respetivamente. Para a pigmentação castanha esverdeada, os genótipos GG e GT apresentaram ambos uma frequência de 50,00%. No caso da pigmentação verde, as frequências observadas foram de 60,00%, 33,33% e 6,67%, para os genótipos GG, GT e TT, respetivamente. Por fim, para a pigmentação azul, os genótipos GG e GT, apresentaram as frequências de 40,00% e 60,00%, respetivamente. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na frequência dos genótipos *SLC24A4* rs12896399 na população estudada de acordo com os tipos de pigmentação da íris ($P=0,602$).



Tabela VII – Frequências dos genótipos *SLC24A4* rs12896399 na população em estudo de acordo com os diferentes tipos de pigmentação da íris.

Pigmentação da íris	Genótipos <i>SLC24A4</i> rs12896399			Total	P
	GG N (%)	GT N (%)	TT N (%)		
Castanha	45 (43,69)	45 (43,69)	13 (12,62)	103	0,602
Castanha Esverdeada	3 (50,00)	3 (50,00)	0 (0,00)	6	
Verde	9 (60,00)	5 (33,33)	1 (6,67)	15	
Azul	2 (40,00)	3 (60,00)	0 (0,00)	5	
Total	59	56	14	129	

P - Valor de P obtido pelo teste χ^2 .

Na Tabela VIII encontra-se descrita a distribuição genotípica do polimorfismo *TYR* rs1393350 de acordo com os tipos de pigmentação da íris na população analisada. As frequências dos genótipos AA, AG e GG, tendo em conta a pigmentação castanha foram de 3,85%, 25,00% e 71,15%, respetivamente. Para a pigmentação castanha esverdeada, os genótipos AG e GG apresentaram ambos uma frequência de 50,00%. No caso da pigmentação verde, as frequências observadas foram de 6,67%, 20,00% e 73,33%, para os genótipos AA, AG e GG, respetivamente. Por fim, para a pigmentação azul, os genótipos AA, AG e GG, apresentam as frequências de 20,00%, 20,00% e 60,00%, respetivamente. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na frequência dos genótipos *TYR* rs1393350 na população em estudo de acordo com os tipos de pigmentação da íris ($P=0,563$).



Tabela VIII – Frequências dos genótipos *TYR* rs1393350 na população em estudo de acordo com os diferentes tipos de pigmentação da íris.

Pigmentação da íris	Genótipos <i>TYR</i> rs1393350			Total	P
	AA	AG	GG		
	N (%)	N (%)	N (%)		
Castanha	4 (3,85)	26 (25,00)	74 (71,15)	104	0,563
Castanha Esverdeada	0 (0,00)	3 (50,00)	3 (50,00)	6	
Verde	1 (6,67)	3 (20,00)	11 (73,33)	15	
Azul	1 (20,00)	1 (20,00)	3 (60,00)	5	
Total	6	33	91	130	

P - Valor de P obtido pelo teste χ^2 .

A distribuição dos genótipos do polimorfismo *SLC45A2* rs16891982, em função dos diferentes tipos de pigmentação da íris na população estudada está representada na Tabela IX. As frequências dos genótipos CC, CG e GG, tendo em conta a pigmentação castanha foram de 10,68%, 37,86% e 51,46%, respetivamente. Para a pigmentação castanha esverdeada, o genótipo CG apresentou uma frequência de 16,67% e o GG de 83,33%. No caso da pigmentação verde, as frequências observadas foram de 0,00%, 26,67% e 73,33%, para os genótipos CC, CG e GG, respetivamente. Por fim, para a pigmentação azul, os genótipos CG e GG, apresentaram as frequências de 20,00% e 80,00%, respetivamente. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na frequência dos genótipos *SLC45A2* rs16891982 na população em estudo de acordo com os tipos de pigmentação da íris ($P=0,166$).



Tabela IX – Frequências dos genótipos *SLC45A2* rs16891982 na população em estudo de acordo com os diferentes tipos de pigmentação da íris.

Pigmentação da íris	Genótipos <i>SLC45A2</i> rs16891982			Total	P
	CC	CG	GG		
	N (%)	N (%)	N (%)		
Castanha	11 (10,68)	39 (37,86)	53 (51,46)	103	0,166
Castanha Esverdeada	0 (0,00)	1 (16,67)	5 (83,33)	6	
Verde	0 (0,00)	4 (26,67)	11 (73,33)	15	
Azul	0 (0,00)	1 (20,00)	4 (80,00)	5	
Total	11	45	73	129	

P - Valor de P obtido pelo teste χ^2 .

4.3. Influência do polimorfismo *HERC2* rs12913832 na suscetibilidade para pigmentação clara e azul da íris

A Tabela X apresenta os *Odds Ratio* (OR) relativos à suscetibilidade para os indivíduos com genótipo GG apresentarem pigmentação intermédia da íris (castanha esverdeada e verde) e apenas verde ou azul, comparativamente aos indivíduos portadores do alelo A (AA/AG). Relativamente aos indivíduos portadores do genótipo GG verificou-se que têm uma probabilidade aumentada para apresentarem uma pigmentação intermédia (OR=51,50; IC 95%=5,89 – 450,33; $P<0,001$). O mesmo se pode dizer em relação à pigmentação verde (OR=68,67; IC 95%=7,43 – 634,72; $P<0,001$), dado que estes indivíduos com genótipo GG apresentaram também uma maior suscetibilidade para este padrão de pigmentação. Além disso, os indivíduos com genótipo GG apresentaram também uma maior suscetibilidade para a pigmentação azul (OR=6,00; IC 95%=1,00 – 35,91; $P<0,001$).



Tabela X – OR relativos à suscetibilidade para os portadores do genótipo GG do polimorfismo *HERC2* rs1293832 apresentarem pigmentação intermédia, verde ou azul.

		Pigmentação Castanha	Outra Pigmentação	OR	IC 95%	P
		N (%)	N (%)			
Agrupamento do Genótipo	AA/AG	103	14	1	Referência	-----
	GG	1	12	88,29	10,65 – 731,86	<0,001
		Pigmentação Castanha	Pigmentação Intermédia	OR	IC 95%	P
		N (%)	N (%)			
Agrupamento do Genótipo	AA/AG	103	14	1	Referência	-----
	GG	1	7	51,50	5,89 – 450,33	<0,001
		Pigmentação Castanha	Pigmentação Verde	OR	IC 95%	P
		N (%)	N (%)			
Agrupamento do Genótipo	AA/AG	103	9	1	Referência	-----
	GG	1	6	68,67	7,43 – 634,72	<0,001
		Pigmentação Castanha	Pigmentação Azul	OR	IC 95%	P
		N (%)	N (%)			
Agrupamento do Genótipo	AA/AG	103	0	1	Referência	-----
	GG	1	5	6,00	1,00 – 35,91	<0,001

OR – Odds Ratio; IC 95% – Intervalo de confiança a 95%; P – valor de P obtido pelo teste de χ^2 .





Discussão

5. Discussão

Nos últimos anos várias evidências têm vindo a demonstrar que a variação da pigmentação humana encontra-se relacionada com a componente genética e o ambiente ao qual os indivíduos estão expostos, podendo influenciar o processo de melanogénese [41]. Por este motivo, a pigmentação é caracterizada como um traço fenotípico humano que apresenta uma enorme diversidade nas diferentes populações, sendo por isso considerada uma característica fenotípica complexa [31].

Pensa-se que a pigmentação seja controlada por cerca de 120 genes, que podem atuar em diferentes fases do complexo processo de formação, transporte e armazenamento da melanina [41]. Portanto, a influência das interações entre genes deve ser considerada como um importante fator responsável pela elevada variabilidade da pigmentação entre os seres humanos. Por ser uma característica física externa associada a uma expressão genética complexa, a cor dos olhos é considerada uma das características mais específica e distinta nos seres humanos. A distribuição da melanina no olho é o principal fator responsável pelos diferentes padrões de cor da íris, tendo as íris castanhas uma concentração até 70% mais alta do que as de outras cores [62].

No presente trabalho foram avaliados seis polimorfismos genéticos em genes envolvidos no processo de melanogénese, os quais parecem ser as principais variantes genéticas responsáveis pela heterogeneidade da pigmentação da íris.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que parece não existir uma associação estatisticamente significativa entre a distribuição das frequências genotípicas dos polimorfismos *OCA2* rs1800407, *IRF4* rs12203592, *SLC24A4* rs12896399, *TYR* rs1393350, *SLC45A2* rs16891982 e os diferentes padrões de pigmentação da íris.

Apesar da proteína *OCA2* ter um papel preponderante no transporte de tirosina, um substrato crucial na produção de melanina, toda a sua função é regulada pela atividade do gene *HERC2* [38]. Ainda assim, vários estudos têm tentado perceber se a expressão do *OCA2* pode ser influenciada pela presença de variações genéticas que parecem afetar a biossíntese de melanina [25, 41, 53, 62]. O polimorfismo *OCA2* rs1800407 tem vindo a ser apontado como uma das principais alterações genéticas que influenciam a atividade deste gene. Contudo, neste estudo não foi possível demonstrar qualquer associação entre esta variante genética e os diferentes padrões de pigmentação da íris. Este resultado reforça o pressuposto de que a expressão do gene *OCA2* é regulada pela atividade do gene *HERC2*.

Pela importância do gene *IRF4* na variação da pigmentação da íris, através da sua ativação pelo fator de transcrição MITF e pela proteína *Activating enhancer binding Protein 2 alpha* (TFAP2A), este gene tem sido alvo de estudo no processo da melanogénese. Além



disso, a interação entre as proteínas IRF4 e MITF com o promotor do gene *TYR* parece influenciar a expressão da enzima tirosinase [54]. Por sua vez, esta enzima está envolvida na conversão da tirosina em melanina. Na literatura, encontra-se descrito que a expressão dos genes *IRF4* e *TYR* pode ser modificada pela presença de alterações genéticas, nomeadamente polimorfismos, que contribuem para a produção de diferentes fenótipos de pigmentação [11, 27]. Entre estas alterações pode-se destacar o polimorfismo rs12203592 no gene *IRF4* o qual parece estar associado a uma diminuição da expressão da tirosinase e, conseqüentemente, uma pigmentação mais clara. Por outro lado, alterações no gene *TYR* parecem resultar em patologias relacionadas com a pigmentação. Contudo, o mecanismo pelo qual o polimorfismo *TYR* rs1393350 influencia a expressão da pigmentação ainda não se encontra descrito [63, 64].

Atualmente, sabe-se que o gene *SLC24A4* é um transportador de sódio e potássio, contudo ainda não existem evidências que estabeleçam uma relação entre esta função e a variação da expressão da pigmentação [65]. Neste sentido, vários estudos têm tentado perceber o efeito biológico do polimorfismo *SLC24A4* rs12896399 na expressão da pigmentação da íris. No entanto apenas um estudo demonstrou existir uma associação entre este polimorfismo e a pigmentação clara da íris [4].

Por último, dada a importância do gene *SLC45A2* na mediação da biossíntese da melanina, variações na sua expressão têm sido associadas à variabilidade fenotípica no que respeita a pigmentação da íris [15, 53]. Uma das principais variantes genéticas responsável pela expressão alterada da pigmentação é o polimorfismo *SLC45A2* rs16891982 [65]. No entanto, a exata consequência biológica deste polimorfismo permanece ainda por esclarecer, dado que as evidências existentes quanto à sua funcionalidade são controversas. Neste sentido, em estudos de associação considerando populações de diferentes ancestralidades, o alelo C encontra-se associado a fenótipos de pigmentação de tom clara (cabelos loiros, olhos azuis e pele clara) [15]. Por outro lado, outro estudo demonstrou que a outra variante alélica deste polimorfismo (alelo G) parece estar também associada à pigmentação mais clara da pele, cabelos e olhos em populações modernas, tendo uma diminuição da sua frequência ao longo do sul da Europa, [9, 52, 53].

Relativamente ao polimorfismo *HERC2* rs12913832 várias evidências têm demonstrado que esta variante genética é responsável por grande parte da informação preditiva para a pigmentação da íris [34-37]. Estes dados são concordantes com os resultados obtidos neste estudo, uma vez que o genótipo GG deste polimorfismo demonstrou estar fortemente associado à pigmentação clara da íris. Neste sentido, foi possível verificar que os indivíduos portadores deste genótipo GG apresentaram uma maior suscetibilidade de expressar pigmentação intermédia (OR=51,50; IC 95%=5,89 – 450,33),



verde (OR=68,67; IC 95%=7,43 – 634,72) e azul da íris (OR=6,00; IC 95%=1,00 – 35,91) comparativamente aos indivíduos com genótipos AA e AG.

Embora o *HERC2* não seja um gene diretamente relacionado com a expressão da pigmentação, tem sido associado às síndromes de Prader-Willi e Angelman, que são frequentemente associadas à hipopigmentação [66]. A interação entre os genes *HERC2* e *OCA2* foram mostradas há algum tempo através de resultados obtidos em modelos animais [67]. Sulem *et al.* levantaram a hipótese de que outros polimorfismos nos intrões de *HERC2* podem afetar a expressão de *OCA2* em humanos [4]. Recentemente, Visser *et al.* mostraram que o gene *HERC2* interage com a região promotora do gene *OCA2*, levando à formação de um loop de cromatina, que na presença do alelo A do polimorfismo *HERC2* rs12913832 leva ao aumento da expressão do gene *OCA2* e, conseqüentemente, ao aumento da produção de melanina associada à pigmentação escura da íris [68]. Por sua vez, o alelo G parece afetar o recrutamento do remodelador de cromatina HLTF, culminando numa maior condensação e menor formação do *loop* da cromatina, resultando numa pigmentação clara da íris [33].

A determinação da pigmentação tem contribuído para expandir os conhecimentos teóricos sobre a genética, assim como, para o desenvolvimento da medicina pela sua associação a diferentes doenças relacionadas com expressão diferenciada da pigmentação. Além disso, dado o seu carácter distintivo enquanto traço físico, a expressão pigmentação tem sido extensivamente estudada na área das ciências forenses.

Neste âmbito, o presente estudo contribuiu para reforçar o contributo de potenciais variantes genéticas em genes associados com a expressão dos diferentes tipos de pigmentação. Tendo-se destacado o papel preponderante do gene *HERC2* no processo de produção de melanina e, particularmente, do polimorfismo rs12913832 na determinação da pigmentação clara da íris. Contudo, são necessários estudos adicionais de forma a corroborar estes resultados e estabelecer potenciais perfis genéticos preditivos da pigmentação da íris.





Conclusão

6. Conclusão

A pigmentação humana é uma característica física externa complexa, na qual os níveis de melanina expressos parecem ser o resultado da combinação de várias variações genéticas em múltiplos genes associados à sua expressão que atuam em conjunto para produzir diferentes padrões de cor da pele, cabelo e olhos. Contudo, atualmente sabe-se que a variação biológica da pigmentação entre as populações não depende só da componente genética, mas também de fatores ambientais (luz solar) e dos movimentos migratórios.

Especificamente, a pigmentação da íris trata-se de um fenótipo altamente polimórfico influenciado pela ação conjunta de diversos genes estando, por isso, sob um forte controlo genético. Entre outros, os genes *HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2 (HERC2)*, *Oculocutaneous Albinism II (OCA2)*, *Solute Carrier Family 45 member 2 (SLC45A2)*, *Tyrosinase (TYR)*, *Solute Carrier Family 24 member 4 (SLC24A4)* e *Interferon Regulatory Factor 4 (IRF4)* parecem ser cruciais no processo da melanogénese e, consequentemente, responsáveis pela expressão diferenciada da pigmentação da íris.

Os resultados obtidos neste estudo mostram que os polimorfismos *OCA2* rs1800407, *IRF4* rs12203592, *SLC24A4* rs12896399, *TYR* rs1393350 e *SLC45A2* rs16891982 parecem não estar associados com a variação da pigmentação da íris. Contudo, apenas foi possível verificar que para o polimorfismo *HERC2* rs12913832, os indivíduos portadores do genótipo GG têm uma maior suscetibilidade de apresentarem pigmentação intermédia (castanha esverdeada) e apenas verde ou azul da íris.

A existência de casos criminais onde não é possível fazer uma associação direta entre os vestígios obtidos no local do crime e os perfis genéticos dos suspeitos ou a informação genética disponível na base de dados de DNA portuguesa representa uma limitação na investigação criminal. Assim, a contínua identificação de genes responsáveis por determinados traços físicos pessoais tem-se revelado um importante marco na genética forense. Neste sentido, espera-se que o estudo de polimorfismos genéticos associados às inúmeras variações fenotípicas, nomeadamente da pigmentação da íris, impulse a investigação na área da genética forense, de forma a auxiliar as investigações criminais. Deste modo, será possível relacionar um vestígio biológico contendo DNA encontrado no local de crime a uma determinada característica física específica de um possível suspeito.

Contudo, investigações futuras deveriam replicar o presente estudo numa maior amostragem, uma vez que os polimorfismos genéticos avaliados neste estudo apresentam uma baixa frequência do alelo *minor*. Seria também importante a identificação de outros



polimorfismos genéticos que possam influenciar a expressão heterogénea da pigmentação, de modo a estabelecer perfis genéticos mais específicos capazes de prever com maior precisão os diferentes padrões de pigmentação da íris.





Referências

7. Referências

1. Parra, E. J., *Human pigmentation variation: evolution, genetic basis, and implications for public health*. Am J Phys Anthropol, 2007. **Suppl 45**: p. 85-105.
2. Kayser, M., *Forensic DNA Phenotyping: Predicting human appearance from crime scene material for investigative purposes*. Forensic Sci Int Genet, 2015. **18**: p. 33-48.
3. Ossorio, P. N., *About face: forensic genetic testing for race and visible traits*. J Law Med Ethics, 2006. **34**(2): p. 277-292.
4. Sulem, P., Gudbjartsson, D. F., Stacey, S. N., Helgason, A., Rafnar, T., Magnusson, K. P., Manolescu, A., Karason, A., Palsson, A., Thorleifsson, G., Jakobsdottir, M., Steinberg, S., Palsson, S., Jonasson, F., Sigurgeirsson, B., Thorisdottir, K., Ragnarsson, R., Benediktsdottir, K. R., Aben, K. K., Kiemeny, L. A., Olafsson, J. H., Gulcher, J., Kong, A., Thorsteinsdottir, U., and Stefansson, K., *Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans*. Nat Genet, 2007. **39**(12): p. 1443-1452.
5. Richmond, S., Howe, L. J., Lewis, S., Stergiakouli, E. and Zhurov, A., *Facial Genetics: A Brief Overview*. Front Genet, 2018. **9**: p. 462.
6. Udayakumar, P., Balasubramanian, S., Ramalingam, K. S., Lakshmi, C., Srinivas, C. R. and Mathew, A. C., *Cutaneous manifestations in patients with chronic renal failure on hemodialysis*. Indian J Dermatol Venereol Leprol, 2006. **72**(2): p. 119-125.
7. Federico, J. R. and Krishnamurthy, K., *Albinism*. StatPearls, 2018.
8. Chen, T., Wang, H., Liu, Y., Zhao, B., Zhao, Y., Fan, R., Wang, P., and Dong, C., *Ocular Albinism Type 1 Regulates Melanogenesis in Mouse Melanocytes*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(10).
9. Wilde, S., Timpson, A., Kirsanow, K., Kaiser, E., Kayser, M., Unterländer, M., Hoffelder, N., Potekhina, I., Schier, W., Thomas, M., and Burger, J., *Direct evidence for positive selection of skin, hair, and eye pigmentation in Europeans during the last 5,000 y*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014. **111**.
10. Miot, L. D. B., Miot, H. A., Silva, M. G. d. and Marques, M. E. A., *Fisiopatologia do melasma*. Anais Brasileiros de Dermatologia, 2009. **84**: p. 623-635.
11. Allwood, J. S. and Harbison, S., *SNP model development for the prediction of eye colour in New Zealand*. Forensic Sci Int Genet, 2013. **7**(4): p. 444-452.
12. Chi, A., Valencia, J. C., Hu, Z. Z., Watabe, H., Yamaguchi, H., Mangini, N. J., Huang, H., Canfield, V. A., Cheng, K. C., Yang, F., Abe, R., Yamagishi, S., Shabanowitz, J., Hearing, V. J., Wu, C., Appella, E., and Hunt, D. F., *Proteomic and bioinformatic characterization of the biogenesis and function of melanosomes*. J Proteome Res, 2006. **5**(11): p. 3135-3144.
13. Wilczek, A. and Mishima, Y., *Inhibitory effects of melanin monomers, dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) and dihydroxyindole (DHI) on mammalian tyrosinase, with a special reference to the role of DHICA/DHI ratio in melanogenesis*. Pigment Cell Res, 1995. **8**(2): p. 105-112.
14. Fabian-Jessing, B. K., Vestergaard, E. M., Plomp, A. S., Bergen, A. A., Dreschler, W. A., Duno, M., Winiarska, B. S., Neumann, L., Gaihede, M., Vorum, H., and Petersen, M. B., *Ocular albinism with infertility and late-onset sensorineural hearing loss*. Am J Med Genet A, 2018. **176**(7): p. 1587-1593.
15. Fracasso, N. C. A., de Andrade, E. S., Wiezel, C. E. V., Andrade, C. C. F., Zanao, L. R., da Silva, M. S., Marano, L. A., Donadi, E. A., E, C. C., Simoes, A. L., and Mendes-Junior, C. T., *Haplotypes from the SLC45A2 gene are associated with the presence of freckles and eye, hair and skin pigmentation in Brazil*. Leg Med (Tokyo), 2017. **25**: p. 43-51.



16. Udono, T., Takahashi, K., Yasumoto, K., Yoshizawa, M., Takeda, K., Abe, T., Tamai, M., and Shibahara, S., *Expression of tyrosinase-related protein 2/DOPAchrome tautomerase in the retinoblastoma*. *Exp Eye Res*, 2001. **72**(3): p. 225-234.
17. Romaní, J., Jean L. Bolognia, Joseph L. Jorizzo, Julie V. Schaffer, *Dermatology*. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)*, 2012. **103**.
18. Wollstein, A., Walsh, S., Liu, F., Chakravarthy, U., Rahu, M., Seland, J. H., Soubrane, G., Tomazzoli, L., Topouzis, F., Vingerling, J. R., Vioque, J., Bohringer, S., Fletcher, A. E., and Kayser, M., *Novel quantitative pigmentation phenotyping enhances genetic association, epistasis, and prediction of human eye colour*. *Sci Rep*, 2017. **7**: p. 43359.
19. Liu, F., Wen, B. and Kayser, M., *Colorful DNA polymorphisms in humans*. *Semin Cell Dev Biol*, 2013. **24**(6-7): p. 562-575.
20. Schiaffino, M. V., *Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010. **42**(7): p. 1094-1104.
21. Pelkonen, L., Reinisalo, M., Morin-Picardat, E., Kidron, H. and Urtti, A., *Isolation of Intact and Functional Melanosomes from the Retinal Pigment Epithelium*. *PLoS One*, 2016. **11**(8): p. e0160352.
22. Plonka, P. M., Passeron, T., Brenner, M., Tobin, D. J., Shibahara, S., Thomas, A., Slominski, A., Kadekaro, A. L., HersHKovitz, D., Peters, E., Nordlund, J. J., Abdel-Malek, Z., Takeda, K., Paus, R., Ortonne, J. P., Hearing, V. J., and Schallreuter, K. U., *What are melanocytes really doing all day long...?* *Experimental dermatology*, 2009. **18**(9): p. 799-819.
23. Sturm, R. A., *Molecular genetics of human pigmentation diversity*. *Hum Mol Genet*, 2009. **18**(R1): p. R9-17.
24. Martinez-Cadenas, C., Pena-Chilet, M., Ibarrola-Villava, M. and Ribas, G., *Gender is a major factor explaining discrepancies in eye colour prediction based on HERC2/OCA2 genotype and the IrisPlex model*. *Forensic Sci Int Genet*, 2013. **7**(4): p. 453-460.
25. Mengel-From, J., Borsting, C., Sanchez, J. J., Eiberg, H. and Morling, N., *Human eye colour and HERC2, OCA2 and MATP*. *Forensic Sci Int Genet*, 2010. **4**(5): p. 323-328.
26. Ruiz, Y., Phillips, C., Gomez-Tato, A., Alvarez-Dios, J., Casares de Cal, M., Cruz, R., Maronas, O., Sochtig, J., Fondevila, M., Rodriguez-Cid, M. J., Carracedo, A., and Lareu, M. V., *Further development of forensic eye color predictive tests*. *Forensic Sci Int Genet*, 2013. **7**(1): p. 28-40.
27. Kastelic, V., Pospiech, E., Draus-Barini, J., Branicki, W. and Drobnić, K., *Prediction of eye color in the Slovenian population using the IrisPlex SNPs*. *Croat Med J*, 2013. **54**(4): p. 381-386.
28. Walsh, S., Liu, F., Ballantyne, K. N., van Oven, M., Lao, O. and Kayser, M., *IrisPlex: a sensitive DNA tool for accurate prediction of blue and brown eye colour in the absence of ancestry information*. *Forensic Sci Int Genet*, 2011. **5**(3): p. 170-180.
29. Walsh, S., Liu, F., Wollstein, A., Kovatsi, L., Ralf, A., Kosiniak-Kamysz, A., Branicki, W., and Kayser, M., *The HIrisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA*. *Forensic Sci Int Genet*, 2013. **7**(1): p. 98-115.
30. Andersen, J. D., Johansen, P., Harder, S., Christoffersen, S. R., Delgado, M. C., Henriksen, S. T., Nielsen, M. M., Sorensen, E., Ullum, H., Hansen, T., Dahl, A. L., Paulsen, R. R., Borsting, C., and Morling, N., *Genetic analyses of the human eye colours using a novel objective method for eye colour classification*. *Forensic Sci Int Genet*, 2013. **7**(5): p. 508-515.
31. Branicki, W., Brudnik, U., Kupiec, T., Wolanska-Nowak, P., Szczerbinska, A. and Wojas-Pelc, A., *Association of polymorphic sites in the OCA2 gene with eye colour using the tree scanning method*. *Ann Hum Genet*, 2008. **72**(Pt 2): p. 184-192.
32. Iida, R., Ueki, M., Takeshita, H., Fujihara, J., Nakajima, T., Kominato, Y., Nagao, M., and 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): p. 323-327.
33. Sturm, R. A., Duffy, D. L., Zhao, Z. Z., Leite, F. P., Stark, M. S., Hayward, N. K., Martin, N. G., and Montgomery, G. W., *A single SNP in an evolutionary conserved region within intron 86 of the HERC2 gene determines human blue-brown eye color*. *Am J Hum Genet*, 2008. **82**(2): p. 424-431.
 34. Walsh, S., Wollstein, A., Liu, F., Chakravarthy, U., Rahu, M., Seland, J. H., Soubrane, G., Tomazzoli, L., Topouzis, F., Vingerling, J. R., Vioque, J., Fletcher, A. E., Ballantyne, K. N., and Kayser, M., *DNA-based eye colour prediction across Europe with the IrisPlex system*. *Forensic Sci Int Genet*, 2012. **6**(3): p. 330-340.
 35. Dembinski, G. M. and Picard, C. J., *Evaluation of the IrisPlex DNA-based eye color prediction assay in a United States population*. *Forensic Sci Int Genet*, 2014. **9**: p. 111-117.
 36. Freire-Aradas, A., Ruiz, Y., Phillips, C., Maronas, O., Sochtig, J., Tato, A. G., Dios, J. A., de Cal, M. C., Silbiger, V. N., Luchessi, A. D., Luchessi, A. D., Chiurillo, M. A., Carracedo, A., and Lareu, M. V., *Exploring iris colour prediction and ancestry inference in admixed populations of South America*. *Forensic Sci Int Genet*, 2014. **13**: p. 3-9.
 37. Pneuman, A., Budimlija, Z. M., Caragine, T., Prinz, M. and Wurmbach, E., *Verification of eye and skin color predictors in various populations*. *Leg Med (Tokyo)*, 2012. **14**(2): p. 78-83.
 38. Lee, S. T., Nicholls, R. D., Jong, M. T., Fukai, K. and Spritz, R. A., *Organization and sequence of the human P gene and identification of a new family of transport proteins*. *Genomics*, 1995. **26**(2): p. 354-363.
 39. Ji, Y., Rebert, N. A., Joslin, J. M., Higgins, M. J., Schultz, R. A. and Nicholls, R. D., *Structure of the highly conserved HERC2 gene and of multiple partially duplicated paralogs in human*. *Genome Res*, 2000. **10**(3): p. 319-329.
 40. Cubillos-Rojas, M., Amair-Pinedo, F., Peiro-Jordan, R., Bartrons, R., Ventura, F. and Rosa, J. L., *The E3 ubiquitin protein ligase HERC2 modulates the activity of tumor protein p53 by regulating its oligomerization*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(21): p. 14782-14795.
 41. Branicki, W., Brudnik, U. and Wojas-Pelc, A., *Interactions between HERC2, OCA2 and MC1R may influence human pigmentation phenotype*. *Ann Hum Genet*, 2009. **73**(2): p. 160-170.
 42. Beleza, S., Johnson, N. A., Candille, S. I., Absher, D. M., Coram, M. A., Lopes, J., Campos, J., Araujo, II, Anderson, T. M., Vilhjalmsdottir, B. J., Nordborg, M., Correia, E. S. A., Shriver, M. D., Rocha, J., Barsh, G. S., and Tang, H., *Genetic architecture of skin and eye color in an African-European admixed population*. *PLoS Genet*, 2013. **9**(3): p. e1003372.
 43. Valenzuela, R. K., Henderson, M. S., Walsh, M. H., Garrison, N. A., Kelch, J. T., Cohen-Barak, O., Erickson, D. T., John Meaney, F., Bruce Walsh, J., Cheng, K. C., Ito, S., Wakamatsu, K., Frudakis, T., Thomas, M., and Brilliant, M. H., *Predicting phenotype from genotype: normal pigmentation*. *J Forensic Sci*, 2010. **55**(2): p. 315-322.
 44. Draus-Barini, J., Walsh, S., Pospiech, E., Kupiec, T., Glab, H., Branicki, W., and Kayser, M., *Bona fide colour: DNA prediction of human eye and hair colour from ancient and contemporary skeletal remains*. *Investig Genet*, 2013. **4**(1): p. 3.
 45. Chaitanya, L., Walsh, S., Andersen, J. D., Ansell, R., Ballantyne, K., Ballard, D., Banemann, R., Bauer, C. M., Bento, A. M., Brisighelli, F., Capal, T., Clarisse, L., Gross, T. E., Haas, C., Hoff-Olsen, P., Hollard, C., Keyser, C., Kiesler, K. M., Kohler, P., Kupiec, T., Linacre, A., Minawi, A., Morling, N., Nilsson, H., Noren, L., Ottens, R., Palo, J. U., Parson, W., Pascali, V. L., Phillips, C., Porto, M. J., Sajantila, A., Schneider, P. M., Sijen, T., Sochtig, J., Syndercombe-Court, D., Tillmar, A., Turanska, M., Vallone, P. M., Zatkalikova, L., Zidkova, A., Branicki, W., and Kayser,



- M., *Collaborative EDNAP exercise on the IrisPlex system for DNA-based prediction of human eye colour*. Forensic Sci Int Genet, 2014. **11**: p. 241-251.
46. Pietroni, C., Andersen, J. D., Johansen, P., Andersen, M. M., Harder, S., Paulsen, R., Borsting, C., and Morling, N., *The effect of gender on eye colour variation in European populations and an evaluation of the IrisPlex prediction model*. Forensic Sci Int Genet, 2014. **11**: p. 1-6.
 47. Prestes, P. R., Mitchell, R. J., Daniel, R., Ballantyne, K. N. and van Oorschot, R. A. H., *Evaluation of the IrisPlex system in admixed individuals*. Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 2011. **3**(1): p. e283-e284.
 48. Kayser, M., Liu, F., Janssens, A. C., Rivadeneira, F., Lao, O., van Duijn, K., Vermeulen, M., Arp, P., Jhamai, M. M., van Ijcken, W. F., den Dunnen, J. T., Heath, S., Zelenika, D., Despriet, D. D., Klaver, C. C., Vingerling, J. R., de Jong, P. T., Hofman, A., Aulchenko, Y. S., Uitterlinden, A. G., Oostra, B. A., and van Duijn, C. M., *Three genome-wide association studies and a linkage analysis identify HERC2 as a human iris color gene*. Am J Hum Genet, 2008. **82**(2): p. 411-423.
 49. Shriver, M. D., Parra, E. J., Dios, S., Bonilla, C., Norton, H., Jovel, C., Pfaff, C., Jones, C., Massac, A., Cameron, N., Baron, A., Jackson, T., Argyropoulos, G., Jin, L., Hoggart, C. J., McKeigue, P. M., and Kittles, R. A., *Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping*. Hum Genet, 2003. **112**(4): p. 387-399.
 50. Frudakis, T., Thomas, M., Gaskin, Z., Venkateswarlu, K., Chandra, K. S., Ginjupalli, S., Gunturi, S., Natrajan, S., Ponnuswamy, V. K., and Ponnuswamy, K. N., *Sequences associated with human iris pigmentation*. Genetics, 2003. **165**(4): p. 2071-2083.
 51. Pietroni, C., Andersen, J. D., Johansen, P., Harder, S., Paulsen, R., Børsting, C., and Morling, N., *The genetics of eye colours in an Italian population measured with an objective method for eye colour quantification*. Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 2013. **4**(1): p. e23-e24.
 52. Norton, H. L., Kittles, R. A., Parra, E., McKeigue, P., Mao, X., Cheng, K., Canfield, V. A., Bradley, D. G., McEvoy, B., and Shriver, M. D., *Genetic evidence for the convergent evolution of light skin in Europeans and East Asians*. Mol Biol Evol, 2007. **24**(3): p. 710-722.
 53. Cook, A. L., Chen, W., Thurber, A. E., Smit, D. J., Smith, A. G., Bladen, T. G., Brown, D. L., Duffy, D. L., Pastorino, L., Bianchi-Scarra, G., Leonard, J. H., Stow, J. L., and Sturm, R. A., *Analysis of cultured human melanocytes based on polymorphisms within the SLC45A2/MATP, SLC24A5/NCKX5, and OCA2/P loci*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(2): p. 392-405.
 54. Praetorius, C., Grill, C., Stacey, S. N., Metcalf, A. M., Gorkin, D. U., Robinson, K. C., Van Otterloo, E., Kim, R. S., Bergsteinsdottir, K., Ogmundsdottir, M. H., Magnusdottir, E., Mishra, P. J., Davis, S. R., Guo, T., Zaidi, M. R., Helgason, A. S., Sigurdsson, M. I., Meltzer, P. S., Merlino, G., Petit, V., Larue, L., Loftus, S. K., Adams, D. R., Sobhiahshar, U., Emre, N. C., Pavan, W. J., Cornell, R., Smith, A. G., McCallion, A. S., Fisher, D. E., Stefansson, K., Sturm, R. A., and Steingrimsdottir, E., *A polymorphism in IRF4 affects human pigmentation through a tyrosinase-dependent MITF/TFAP2A pathway*. Cell, 2013. **155**(5): p. 1022-1033.
 55. Visser, M., Palstra, R. J. and Kayser, M., *Allele-specific transcriptional regulation of IRF4 in melanocytes is mediated by chromatin looping of the intronic rs12203592 enhancer to the IRF4 promoter*. Hum Mol Genet, 2015. **24**(9): p. 2649-2661.
 56. Han, J., Kraft, P., Nan, H., Guo, Q., Chen, C., Qureshi, A., Hankinson, S. E., Hu, F. B., Duffy, D. L., Zhao, Z. Z., Martin, N. G., Montgomery, G. W., Hayward, N. K., Thomas, G., Hoover, R. N., Chanock, S., and Hunter, D. J., *A genome-wide association study identifies novel alleles associated with hair color and skin pigmentation*. PLoS Genet, 2008. **4**(5): p. e1000074.



57. Yun, L., Gu, Y., Rajeevan, H. and Kidd, K. K., *Application of six IrisPlex SNPs and comparison of two eye color prediction systems in diverse Eurasia populations*. Int J Legal Med, 2014. **128**(3): p. 447-453.
58. Walsh, S., Chaitanya, L., Clarisse, L., Wirken, L., Draus-Barini, J., Kovatsi, L., Maeda, H., Ishikawa, T., Sijen, T., de Knijff, P., Branicki, W., Liu, F., and Kayser, M., *Developmental validation of the HirisPlex system: DNA-based eye and hair colour prediction for forensic and anthropological usage*. Forensic Sci Int Genet, 2014. **9**: p. 150-161.
59. Kayser, M. and Schneider, P. M., *DNA-based prediction of human externally visible characteristics in forensics: motivations, scientific challenges, and ethical considerations*. Forensic Sci Int Genet, 2009. **3**(3): p. 154-161.
60. Koops, B.-J. and Schellekens, M., *Forensic DNA Phenotyping: Regulatory Issues*. Columbia Sci. Technol. Law Rev., 2006. **9**.
61. Walsh, S., Lindenbergh, A., Zuniga, S. B., Sijen, T., de Knijff, P., Kayser, M., and Ballantyne, K. N., *Developmental validation of the IrisPlex system: determination of blue and brown iris colour for forensic intelligence*. Forensic Sci Int Genet, 2011. **5**(5): p. 464-471.
62. Duffy, D. L., Montgomery, G. W., Chen, W., Zhao, Z. Z., Le, L., James, M. R., Hayward, N. K., Martin, N. G., and Sturm, R. A., *A three-single-nucleotide polymorphism haplotype in intron 1 of OCA2 explains most human eye-color variation*. Am J Hum Genet, 2007. **80**(2): p. 241-252.
63. Fesenko, D. O., Chudinov, A. V., Surzhikov, S. A. and Zasedatelev, A. S., *Biochip-Based Genotyping Assay for Detection of Polymorphisms in Pigmentation Genes Associated with Cutaneous Melanoma*. Genet Test Mol Biomarkers, 2016. **20**(4): p. 208-212.
64. Pospiech, E., Karlowska-Pik, J., Ziemkiewicz, B., Kukla, M., Skowron, M., Wojas-Pelc, A., and Branicki, W., *Further evidence for population specific differences in the effect of DNA markers and gender on eye colour prediction in forensics*. Int J Legal Med, 2016. **130**(4): p. 923-934.
65. Branicki, W., Brudnik, U., Draus-Barini, J., Kupiec, T. and Wojas-Pelc, A., *Association of the SLC45A2 gene with physiological human hair colour variation*. J Hum Genet, 2008. **53**(11-12): p. 966-971.
66. Nicholls, R. D. and Knepper, J. L., *Genome organization, function, and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2001. **2**: p. 153-175.
67. Walkowicz, M., Ji, Y., Ren, X., Horsthemke, B., Russell, L. B., Johnson, D., Rinchik, E. M., Nicholls, R. D., and Stubbs, L., *Molecular characterization of radiation- and chemically induced mutations associated with neuromuscular tremors, runting, juvenile lethality, and sperm defects in jdf2 mice*. Mamm Genome, 1999. **10**(9): p. 870-878.
68. Visser, M., Kayser, M. and Palstra, R. J., *HERC2 rs12913832 modulates human pigmentation by attenuating chromatin-loop formation between a long-range enhancer and the OCA2 promoter*. Genome Res, 2012. **22**(3): p. 446-455.





Anexos

8. Anexos

Anexo A – Questionário

 IPOPORTO INSTITUTO PORTUGUÊS DE ONCOLOGIA DO PORTO, I.P.	GRUPO ONCOLOGIA MOLECULAR E PATOLOGIA VIRAL
	Colheita de amostras biológicas

Projeto: Marcadores genéticos e determinação da cor dos olhos

Código amostra: _____

Sexo: Masculino ☐ Feminino ☐

Ascendência geográfica: Europa ☐ África ☐ Ásia ☐ América ☐ Oceânia ☐

Idade: _____ **Altura:** _____ **Peso:** _____

Cor dos olhos: _____ **Cor do cabelo:** _____

Hábitos tabágicos: Não ☐ Sim ☐ Ex-fumador ☐

- Se sim ou Ex-fumador:
Anos/fumador: _____
Cigarros/dia: _____

Principais problemas de saúde:

Medicação crónica:

Sim ☐ Não ☐

- Se sim, qual?

História familiar de doenças associadas à idade:

Sim ☐ Não ☐

- Se sim, quais?

