



**Trabajo final de la Licenciatura en Biotecnología y Biología Molecular
Laboratorio de Procesos Biotecnológicos
Facultad de Ciencias Exactas, UNLP**

Variación genética del color del iris en la población bonaerense

Hohl, Diana María

Directora: Catanesi, Cecilia Inés

Tutor: Cálcena, Eugenio Nicolás

Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE)



Índice

- Dedicatoria
- Agradecimientos
- Introducción.....Página 1
 - Color del iris: aspectos biológicos y poblacionales.....Página 1
 - Genética de poblaciones.....Página 12
 - Alelos y frecuencia alélica.....Página 13
 - Ley de Hardy-Weinberg.....Página 13
 - Población americana.....Página 14
 - Población argentina.....Página 14
 - Población bonaerense.....Página 16
- Objetivos.....Página 17
- Hipótesis.....Página 18
- Materiales y métodos.....Página 19
 - Toma de muestras.....Página 19
 - Extracción de ADN.....Página 19
 - Cuantificación de ADN.....Página 20
 - Diseño de *primers* y elección de enzimas de restricción...Página 20
 - PCR.....Página 23
 - rs12913832.....Página 23
 - rs12203592.....Página 24
 - rs12896399.....Página 24
 - rs16891982.....Página 24
 - rs1393350.....Página 25
 - Electroforesis en gel de agarosa 1,8%.....Página 25
 - Digestión enzimática.....Página 25
 - Electroforesis en gel de poli(acrilamida) neutra 8%.....Página 26
 - Cálculos estadísticos.....Página 26
 - Frecuencias alélicas y genotípicas.....Página 26
 - Equilibrio de Hardy-Weinberg.....Página 27
 - Diversidad nucleotídica.....Página 27
 - Heterocigosis observada.....Página 27
 - Heterocigosis esperada.....Página 28
 - AMOVA (Análisis de Varianza Molecular).....Página 28
 - F_{st} o índice de Wright.....Página 28
 - Fis.....Página 28
 - Estructura poblacional y estimación de ancestría.....Página 28
- Resultados.....Página 30
 - rs12913832.....Página 30
 - rs12203592.....Página 32
 - rs12896399.....Página 35

- rs16891982.....Página 38
- rs1393350.....Página 41
- Resultados para todos los marcadores.....Página 43
 - Fis.....Página 43
- Relación entre el color del iris y el sexo.....Página 43
- Comparación entre poblaciones.....Página 44
 - Heterocigosis esperada.....Página 44
 - AMOVA.....Página 44
 - Fst.....Página 46
 - Prueba de asociación alélica.....Página 46
 - Estructura poblacional y estimación de ancestría.....Página 48
- Discusión.....Página 53
- Conclusiones.....Página 57
 - Perspectivas.....Página 57
- Bibliografía.....Página 58
- Anexo.....Página 62

*A mi motivación diaria:
mis padres, mi hermana y mi sobrina.*

Introducción

Color del iris: aspectos biológicos y poblacionales

El color de los ojos es un carácter fenotípico conspicuo en los humanos y su variación es una de las manifestaciones más relevantes del aspecto físico entre los individuos. A pesar de que la variación genética subyacente a este fenotipo es distinta según la población estudiada, la mayoría de los estudios genómicos están basados en individuos de ancestría únicamente europea, faltando información sobre dicha variación en otras poblaciones del mundo (Beleza *et al.*, 2013).

Dentro del continente europeo el color del iris se correlaciona con la latitud, lo que podría explicarse por una selección natural y una selección sexual (Liu *et al.*, 2010). Se cree que la pigmentación oscura siempre estuvo presente en los humanos y que ha sido favorecida por una selección adaptativa en regiones con alta incidencia de radiación ultravioleta procedente de la luz solar, ya que cumple un rol de protección contra la fotólisis de folato, el daño al ADN que aumentaría el riesgo de cáncer de piel, y un posible daño a las inmunoglobulinas. De esta manera, una correlación entre la pigmentación de la piel y los niveles de radiación ultravioleta a nivel mundial indica una adaptación ecológica positiva, aunque la selección sexual también ha sido importante, especialmente en relación con el color del pelo y de los ojos (Wilde *et al.*, 2014). Notablemente, no existe una función fisiológica conocida para estas últimas características (Sulem *et al.*, 2007). Se considera que el color de los ojos se asocia a la selección del color de la piel ya que se trata de caracteres poligénicos que pueden sufrir efectos pleiotrópicos (Wilde *et al.*, 2014). Sin embargo hay evidencia de que la pigmentación del iris está asociada a ciertas enfermedades como degeneración macular relacionada con la edad, catarata senil y melanoma uveal (Prota *et al.*, 1998). La melanina absorbe la energía de los fotones en un amplio rango de longitudes de onda, teniendo como consecuencia una temperatura mayor en el iris y en los tejidos asociados en presencia de mayor cantidad de pigmento, produciendo así una degradación molecular más rápida en el cristalino al aumentar la disrupción de enlaces covalentes y puentes de hidrógeno; esto derivaría en cataratas. A su vez, una mayor pigmentación ocular disminuiría la cantidad de luz que alcanza la zona posterior del ojo, protegiendo la retina del daño oxidativo y previniendo la degeneración macular y el melanoma uveal; la cantidad de melanina en el epitelio pigmentario de la retina se correlaciona con aquella presente en el iris, siendo ambas estructuras protectoras contra la radiación ultravioleta (Sun *et al.*, 2014).

La mayor ocurrencia de colores de iris claros se encuentra casi exclusivamente en la población de Europa y en individuos con ancestros provenientes de dicho continente (Sturm y Frudakis, 2004). La causa de los ojos de color azul en humanos es una mutación fundadora en un importante elemento regulador de uno de los genes relacionado a la pigmentación, la cual se supone que se originó al Este o Noroeste del Mar Negro hace unos 6.000 a 10.000 años. (Eiberg *et al.*, 2008).

La importancia del estudio del color de los ojos en las poblaciones humanas, relacionado con variaciones a nivel genotípico, radica en su potencial aplicación en Genética Forense, ya que

constituye una herramienta para la predicción de esta característica visible externamente o EVC (*externally visible characteristic*). Las EVCs incluyen, entre otras, color de pelo, piel y ojos, altura y morfología facial, los cuales tienen alta heredabilidad. A través de estudios de asociación del genoma completo (*genome-wide association study* –GWAS–) se han identificado las variantes genéticas que tienen influencia sobre dichas EVCs (Lim y Oh, 2013). La descripción del color del iris desde un análisis genético, tal como la incluida en la *Forensic DNA Phenotyping* (FDP) (Keating *et al.*, 2013) ayudaría, por un lado, a la identificación de sospechosos de crímenes a partir de muestras biológicas recolectadas en la escena, cuando el perfil de ADN no se encuentra en ninguna base de datos, convirtiendo al ácido desoxirribonucleico en un “testigo biológico” (Walsh, Liu, *et al.*, 2011) y reduciendo así la dependencia de los testigos oculares en la investigación (Keating *et al.*, 2013). A su vez, permitiría identificar a personas desaparecidas o víctimas de desastres, ya que los antropólogos forenses pueden determinar algunas características visibles a partir de los restos de un individuo, tales como altura, sexo y etnia, pero las características relacionadas con la pigmentación no pueden ser inferidas si ocurre una descomposición de los restos (Hart *et al.*, 2013; Spichenok *et al.*, 2011). En estos casos, el ADN puede ser una herramienta forense muy útil para hacer más completa la descripción fenotípica de los individuos y lograr su identificación cuando no se poseen muestras de ADN de familiares de los mismos con las cuales comparar, pero se cuenta con datos del color de ojos de dicha persona.

El iris (gr. iris, arco iris, por las variaciones de color que presenta) es una estructura que está incluida en la parte anterior de las túnica vascular (que alberga al estroma) e interna (donde se encuentra el epitelio del iris) del ojo (figura 1). Tiene la forma de un delgado disco ubicado en el plano frontal, justo por delante del cristalino, donde separa las cámaras posterior y anterior (figura 2). El iris actúa como diafragma del ojo, dado que el diámetro de la pupila (el orificio del diafragma) es variable.

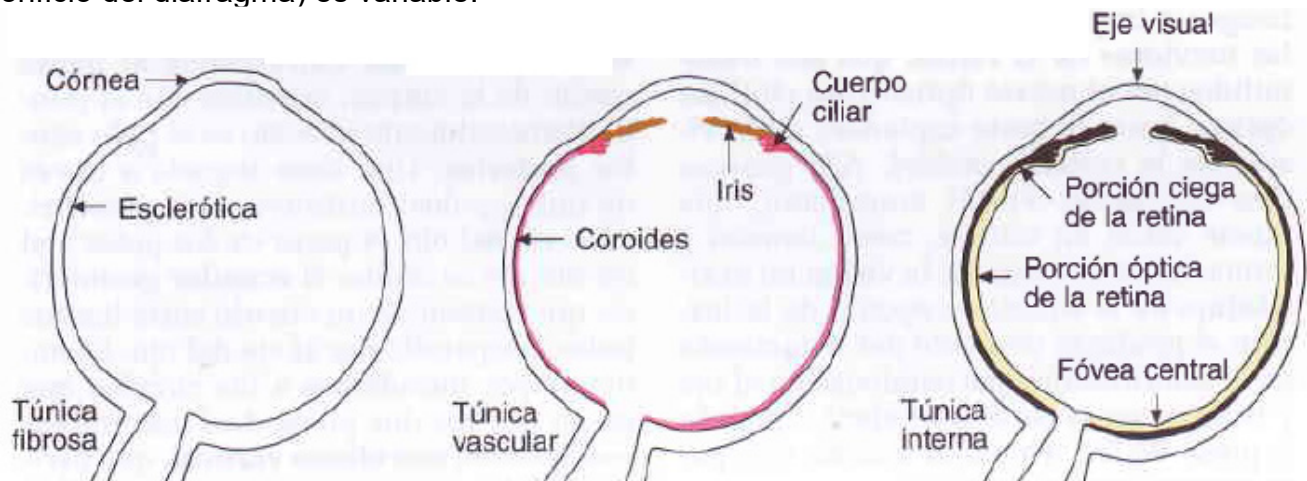


Figura 1. Esquema que muestra las capas de la pared ocular. (Geneser, 2000).

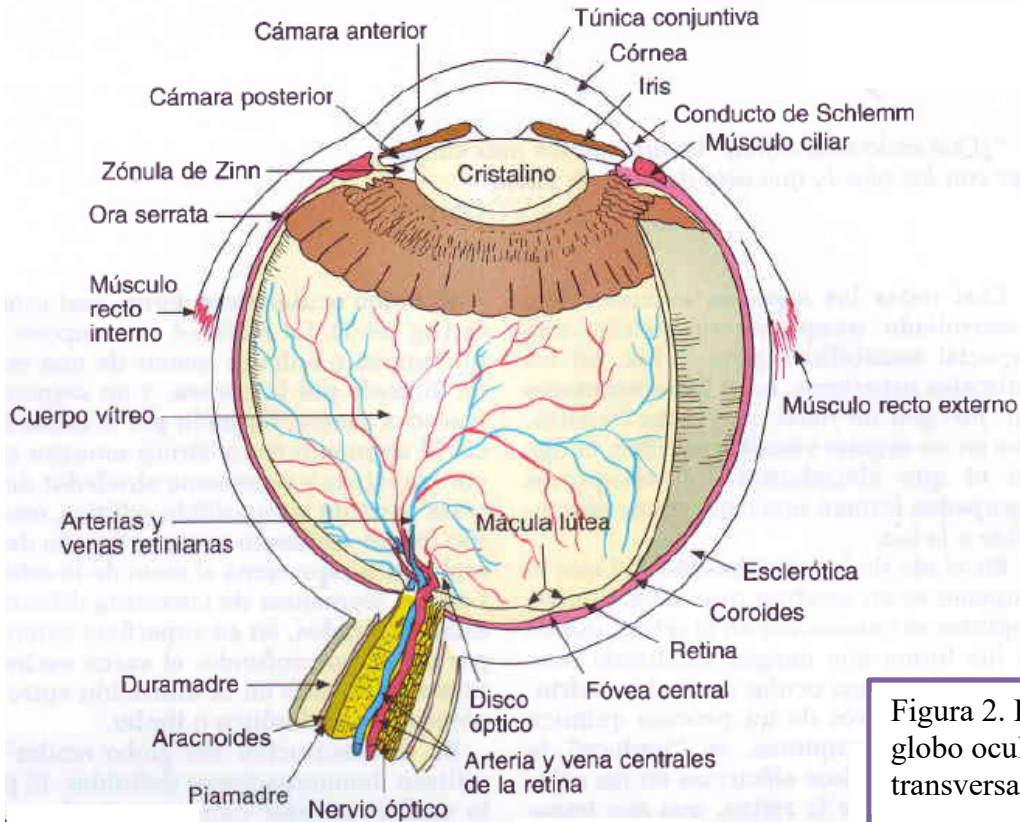


Figura 2. Dibujo esquemático del globo ocular derecho. Sección transversal. (Geneser, 2000).

El borde periférico o margen ciliar (raíz del iris) se fija a la superficie anteromedial del cuerpo ciliar y el borde interno o margen pupilar es libre y descansa sobre la superficie anterior del cristalino (figura 3). Sobre la superficie anterior del iris pueden observarse crestas, criptas y pliegues; por el contrario, la superficie posterior es bastante lisa, además de ser de color negro debido a la pigmentación del epitelio posterior.

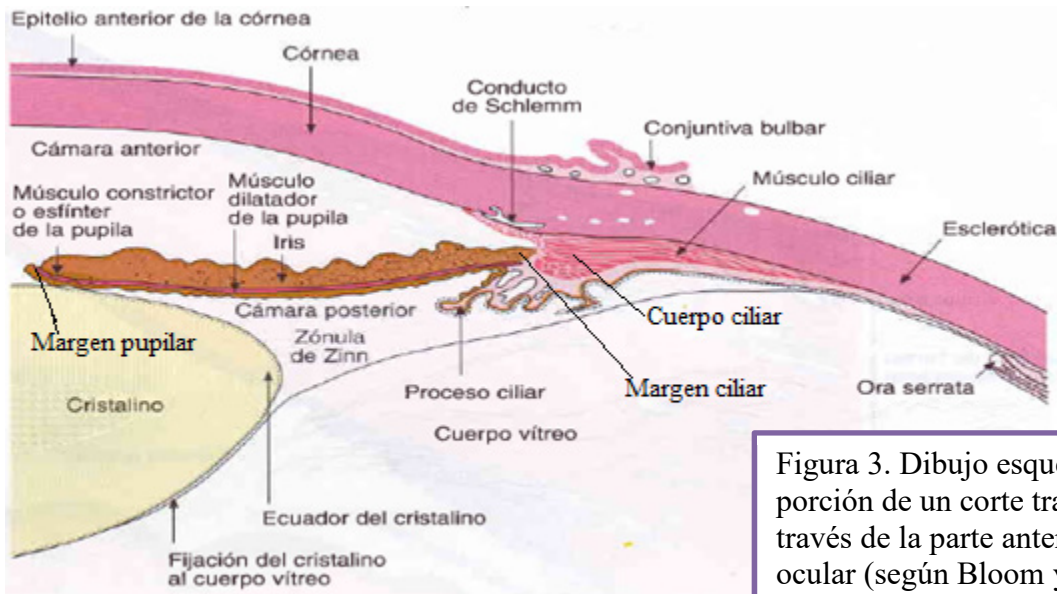


Figura 3. Dibujo esquemático de una porción de un corte transversal a través de la parte anterior del globo ocular (según Bloom y Fawcett, basado en Schaffer). (Geneser, 2000).

Desde el punto de vista histológico, el iris se compone de las siguientes capas (figuras 4 y 5):

-Capa limitante anterior o lámina marginal anterior: se compone, en su mayor parte, de fibroblastos y melanocitos. Los fibroblastos forman una capa bastante continua de células aplanadas, con prolongaciones ramificadas. Esta capa cubre la superficie anterior del iris, desde el margen pupilar hasta su raíz. Las prolongaciones de los fibroblastos se entrecruzan entre sí, pero dejan espacios a través de los cuales hay comunicación directa desde la cámara anterior hacia el estroma del iris. Justo por detrás de la capa de fibroblastos los melanocitos constituyen una capa aplanada paralela a la superficie del iris, donde sus prolongaciones ramificadas forman un reticulado similar al de los fibroblastos.

-Estroma del iris: se compone de tejido conectivo laxo que contiene fibras de colágeno muy delgadas, separadas por sustancia fundamental y células. Las células son, principalmente, fibroblastos y melanocitos. Estos últimos, según Sturm y Frudakis (2004), se concentran principalmente en la parte anterior, paralelos a la superficie del ojo. También se encuentran macrófagos con pigmentos en su interior y mastocitos.

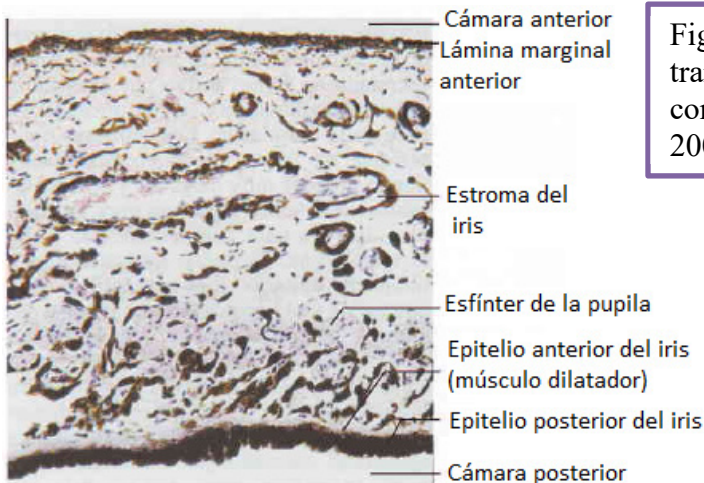


Figura 4. Micrografía de un corte transversal a través del iris. Coloración con hematoxilina-eosina. X210 (Geneser, 2000)

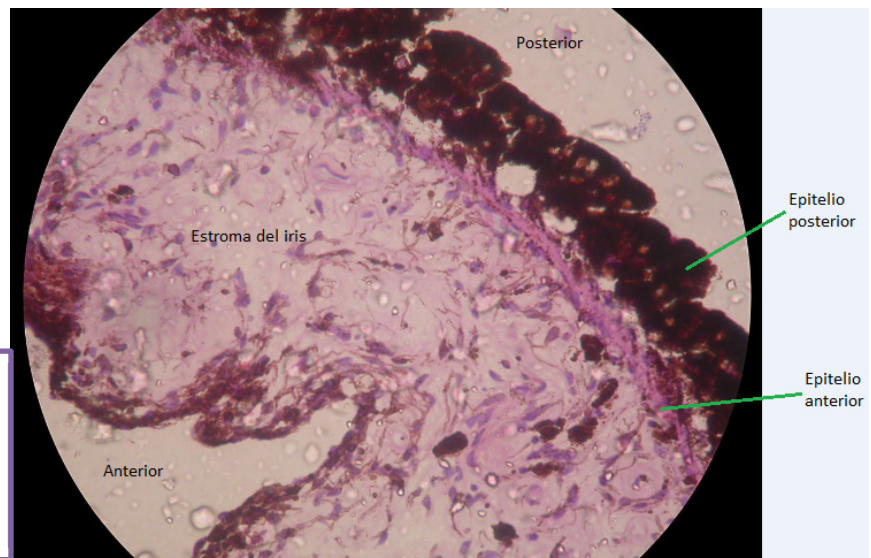


Figura 5. Micrografía de un corte transversal del iris. Imagen de la Cátedra de Anatomía e Histología, FCE, UNLP. Coloración hematoxilina-eosina.

-**Epitelio anterior:** está formado por una única capa de células (epitelio simple) cúbicas a cilíndricas, muy polarizadas, cada una compuesta por una parte muscular basal y una parte apical. El conjunto de filamentos basales de actina y miosina dispuestos en forma radial forma el músculo dilatador de la pupila. El músculo corre desde la raíz del iris hasta cerca de la mitad del músculo del esfínter de la pupila, es decir, no llega hasta el margen pupilar. La parte apical de las células contiene el núcleo y posee abundantes gránulos de pigmento en el citoplasma. En la periferia del iris desaparecen las prolongaciones musculares basales justo antes de la raíz del iris, y la capa celular adquiere entonces características de epitelio cúbico de una sola capa, que se continúa en el epitelio ciliar pigmentado. La parte epitelial apical de las células limita con la superficie apical del epitelio posterior pigmentado del iris (figura 6).

-**Epitelio posterior:** se compone de una única capa de células cilíndricas, cuyo citoplasma está ocupado casi en su totalidad por gránulos de melanina (figura 6). En la parte periférica del iris se observa una disminución gradual del contenido de gránulos de pigmento, hasta desaparecer por completo, dado que el epitelio se continúa en el epitelio ciliar no pigmentado. Hacia el interior de la pupila, las dos capas epiteliales pigmentadas conforman el margen pupilar. En consecuencia la pupila aparece limitada por una línea negro-parduzca muy pigmentada, o "borde pupilar" (Geneser, 2000).

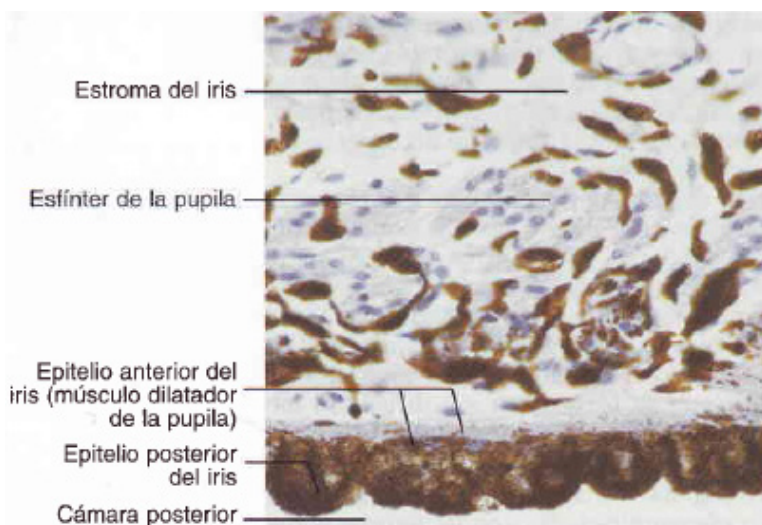


Figura 6. Micrografía del epitelio anterior y posterior del iris. Además se observa la parte más posterior del estroma con el esfínter de la pupila. Corte coloreado con hematoxilina-eosina. X450. (Geneser, 2000)

La melanina es la molécula responsable de la pigmentación. Es un biopolímero inerte producido por los melanocitos; en el iris queda retenido dentro de los melanosomas de dichas células, a diferencia de lo que ocurre en la piel, donde estas estructuras subcelulares son transportadas hacia los queratinocitos circundantes de la epidermis a través de delgadas proyecciones celulares, y en el pelo, donde son trasladados hacia los queratinocitos de la región cortical de la vaina radicular en crecimiento. Las variaciones en los genes involucrados en esta vía pueden tener efectos pleiotrópicos, haciendo que el color de la piel, del pelo y de los ojos se encuentren relacionados. Sin embargo, como los melanocitos de estos tres compartimientos representan poblaciones celulares independientes con vías regulatorias o de señalización autónomas, pueden ocurrir también variantes específicas para cada uno, produciendo combinaciones fenotípicas variadas (Sturm y Duffy, 2012). Los melanocitos del iris se comportan de manera diferente a los de la piel, ya que no responden a la hormona estimuladora de alfa-melanocitos, que es mitogénica y melanogénica (Anderson *et al.*, 2008).

En el iris, el epitelio anterior y el estroma que se encuentra por delante del mismo son las partes que juegan el rol más importante en la apariencia del color. El epitelio posterior parece no variar a pesar de la coloración del iris: en todos los casos está muy pigmentado (Sturm y Frudakis, 2004).

Hay tres tipos de células en el iris que poseen melanina: melanocitos estromales, células epiteliales y células presentadoras de antígenos en el estroma; estas últimas están pigmentadas debido a la fagocitosis, a diferencia de las dos primeras que sintetizan melanina (Anderson *et al.*, 2008). Los principales factores que influyen en el color del iris son: la cantidad de pigmento melánico, el tipo de empaquetamiento de dicho pigmento (Sturm y Frudakis, 2004), el tipo de melanina presente en las células del epitelio pigmentado y en los melanocitos del estroma del iris, así como también las propiedades de absorción y dispersión de la luz dada por componentes extracelulares en el estroma (Prota *et al.*, 1998) y el número de melanosomas o compartimentos subcelulares de los melanocitos donde se sintetiza y acumula la melanina (Hart *et al.*, 2013; Sulem *et al.*, 2007). El número de melanocitos parece no variar entre los distintos colores.

El color marrón indica abundancia de melanosomas. El iris azul indica bajo contenido melánico (figura 7) y cuando la luz incide sobre las estructuras anteriores del mismo, las proteínas presentes principalmente en el estroma dispersan los fotones de longitud de onda corta hacia la superficie (Sturm y Frudakis, 2004).

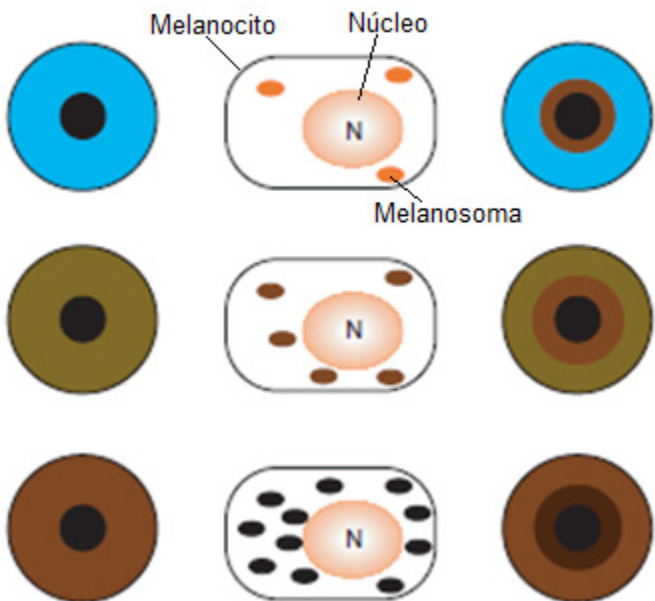


Figura 7. Representación de la distribución intracelular y contenido de los melanosomas dentro de los melanocitos. Sturm y Frudakis 2004.

La melanina presenta dos variantes (figura 8): la eumelanina es un pigmento marrón a negro que está empaquetado en eumelanosomas ovoides (estriados), mientras que la feomelanina es un pigmento amarillo a rojo producido en feomelanosomas granulares inmaduros (Sturm y Frudakis, 2004).

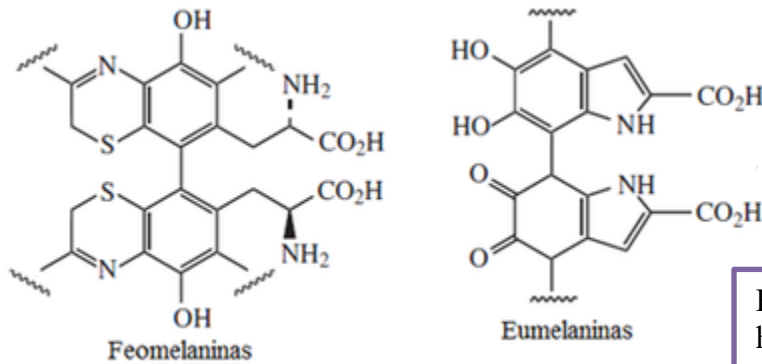


Figura 8. Estructuras de los tipos de melanina. <https://es.wikipedia.org/wiki/Melanina>.

La melanina del epitelio posterior es esencialmente eumelanina, mientras que en el epitelio anterior y en el estroma del iris se encuentran ambos tipos y en menos cantidad. Una pigmentación feomelánica se asocia al color verde, la presencia de ambos pigmentos en alta concentración da lugar al color marrón y una baja cantidad de ambos produce el color azul (Prota *et al.*, 1998).

El color del iris es un carácter poligénico que sufre cambios con el paso de los años (Sturm y Frudakis, 2004; Liu *et al.* 2010) debido a cambios en la morfología de los melanosomas (Sun *et al.*, 2014). Según algunos autores, también varía de acuerdo con el género (Martínez-Cadenas *et al.*, 2013, 2014) aunque respecto a esto último, otros trabajos manifiestan lo contrario (Liu *et al.*, 2014). Se trata de un carácter cuantitativo, con un rango de colores que va desde el azul hasta el marrón oscuro; por lo tanto, su forma de herencia es compleja, a pesar de que en algunos casos aparente comportarse como un carácter con herencia mendeliana simple (Martínez-Cadenas *et al.*, 2013).

En los últimos años varios grupos de trabajo han logrado identificar los principales genes que juegan un rol en la determinación de este fenotipo. Entre ellos se incluyen:

-HERC2 (HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2): Pertenece a una familia de genes que codifica un grupo de proteínas grandes, con múltiples dominios estructurales. Las variaciones en este gen están asociadas con la variabilidad en la pigmentación de la piel, el iris y el pelo (Visser *et al.*, 2012). La interacción entre los genes *HERC2* y *OCA2* es la principal determinante del color de ojos entre azul y marrón (Martínez-Cadenas *et al.*, 2013; Visser *et al.*, 2012). *OCA2* (*oculocutaneous albinism 2*) es un gen que codifica una proteína P transportadora, la cual posee 12 dominios transmembrana y se encuentra en la membrana de los melanosomas, regulando el pH de los mismos (Mengel-From *et al.*, 2009; Nan *et al.*, 2009; Visser *et al.*, 2012) y modificando su desarrollo y maduración (Meyer *et al.*, 2013; Eiberg *et al.*, 2008); a su vez es responsable de suministrar sustratos para la síntesis de melanina (Eiberg *et al.*, 2008). La delección de una región de este gen se asocia con hipopigmentación, mientras que la aparición de copias extra de dicha región resulta en hiperpigmentación. Además, la variación normal en el color del iris muestra

asociación con marcadores presentes en el gen *OCA2* (Sturm *et al.*, 2008). Ubicación: 15q13 (figura 9).

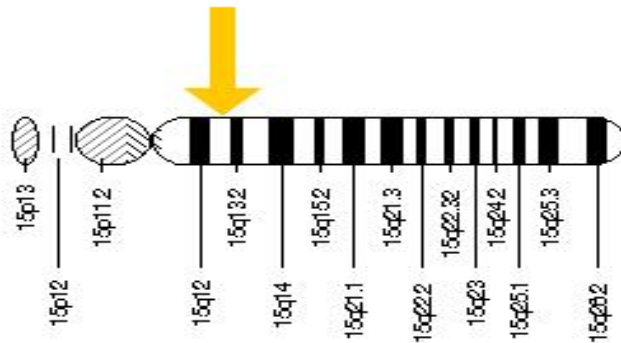


Figura 9. Ubicación del gen *HERC2* en el cromosoma 15. *Genetics Home Reference*.

-*IRF4* (interferon regulatory factor 4): La proteína codificada por este gen coopera con el factor de transcripción MITF para activar la expresión de la tirosinasa, esencial en la síntesis de la melanina (Praetorius *et al.*, 2013, Sturm y Duffy, 2012; Ochiai *et al.*, 2013). Ubicación: 6p25-p23 (figura 10).

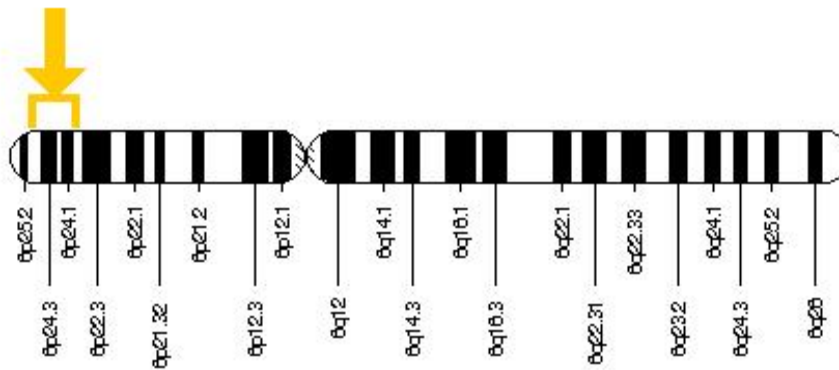


Figura 10. Ubicación del gen *IRF4* en el cromosoma 6. *Genetics Home Reference*.

-*SLC24A4* (solute carrier family 24 -sodium/potassium/calcium exchanger-, member 4): Este gen codifica una proteína de la familia de los intercambiadores de sodio/calcio dependientes de potasio (Parry *et al.*, 2013). Aunque su rol en la pigmentación no se ha dilucidado aún, se ha demostrado su asociación con las variantes en el color de los ojos, el pelo y la piel (Hart *et al.*, 2013). Ubicación: 14q32.12 (figura 11).

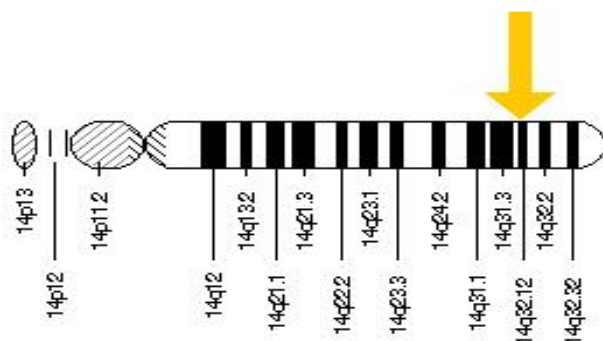


Figura 11. Ubicación del gen *SLC24A4* en el cromosoma 14. *Genetics Home Reference*.

-SLC45A2 (solute carrier family 45, member 2): Codifica una proteína transportadora llamada MATP (*membrane-associated transporter protein*) que es un intercambiador de sodio-hidrógeno. Mediante cambios del pH y del entorno iónico dentro de los melanosomas (figura 12), regula la actividad de la tirosinasa en los melanosomas humanos (Nan *et al.*, 2009; Sturm y Duffy, 2012). Ubicación: 5p13.2 (figura 13).

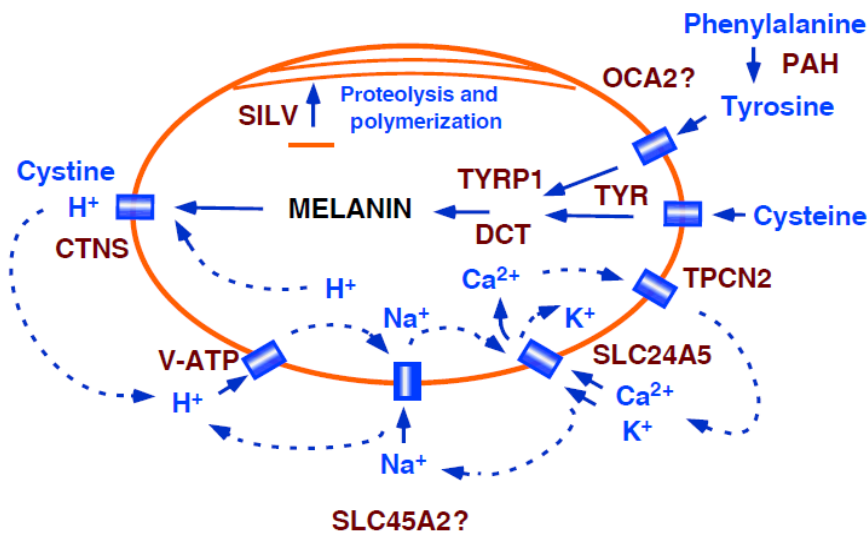


Figura 12. Formación de melanina en el melanosoma. Los transportadores son importantes para el control del entorno iónico y el pH. Sturm y Duffy, 2012.

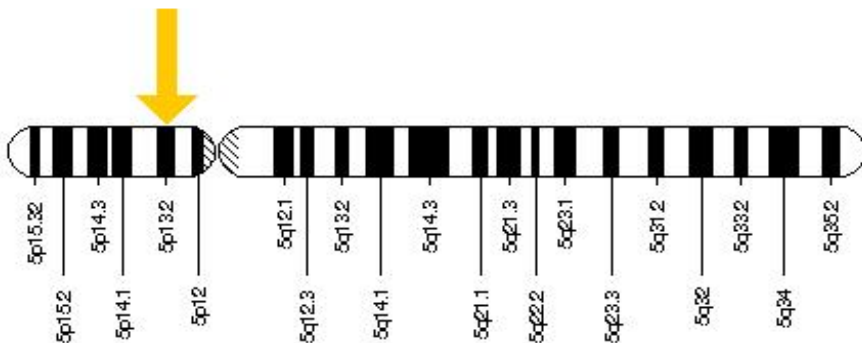


Figura 13. Ubicación del gen SLC45A2 en el cromosoma 5. Genetics Home Reference.

-TYR (tirosinasa): Es una de las enzimas requeridas para la síntesis de ambos tipos de melanina (Sturm y Frudakis, 2004). En el citoplasma del melanocito ocurre la conversión de fenilalanina en tirosina; esta última entra al melanosoma para ser oxidada por la tirosinasa y comenzar así la melanogénesis. La actividad de esta enzima es dependiente del pH del melanosoma (figura 12) (Sturm y Duffy, 2012). En determinadas condiciones, su alta actividad conduce a la formación de mayor cantidad de eumelanina (Nan *et al.*, 2009). En la biosíntesis de melanina (figura 14), la tirosina es oxidada por esta enzima para dar dopaquinona. En ausencia de cisteína, la dopaquinona produce ciclodopa a partir de la cual se forma 3,4-

dihidroxifenilalanina (DOPA), un sustrato que estimula a la tirosinasa para aumentar la síntesis de dopaquinona, y dopacromo (Sturm y Frudakis, 2004). Ubicación: 11q14.3 (figura 15).

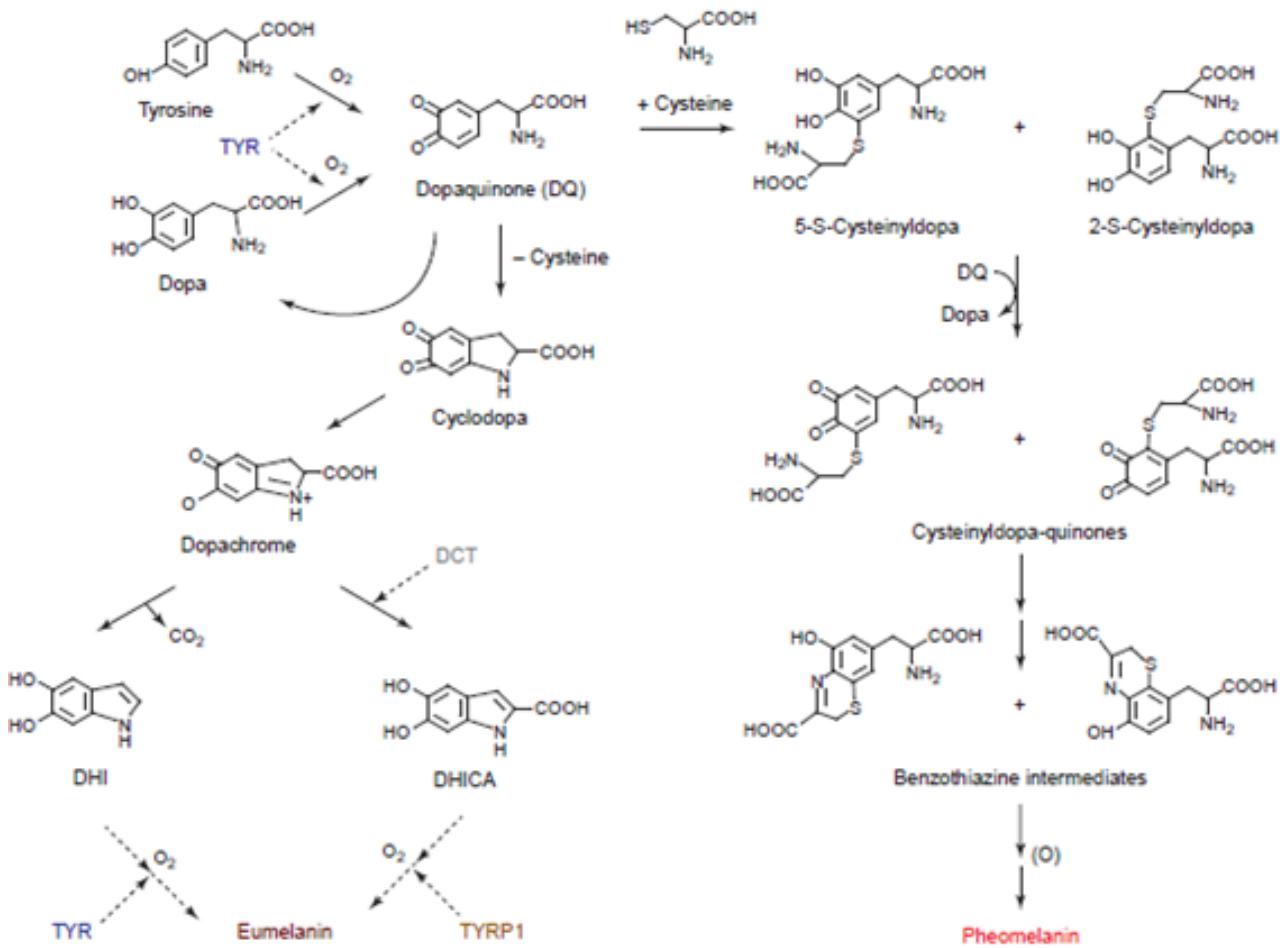


Figura 14. Melanogénesis. Sturm y Frudakis, 2004.

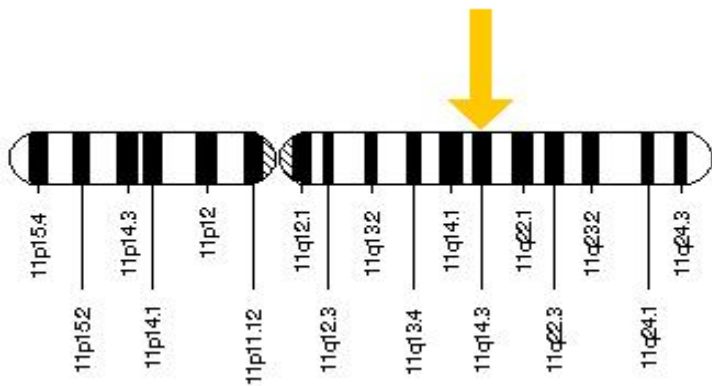


Figura 15. Ubicación del gen TYR en el cromosoma 11. Genetics Home Reference.

A partir del estudio de los genes mencionados se han identificado determinados polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, *Single Nucleotide Polymorphisms*) que permiten marcar con escaso error la variación en la pigmentación del iris en la población europea. Un SNP es una variación en la secuencia de ADN causada por un cambio en un solo nucleótido. Se consideran polimorfismos cuando están presentes a una frecuencia mayor al 1% en la población (Krebs *et al.*, 2012).

Los SNPs estudiados en este trabajo fueron:

-rs12913832, ubicado en el intrón 86 del gen *HERC2*, 21kpb *upstream* (aguas arriba) del promotor del gen *OCA2* (figura 16). Esta región actúa como un *enhancer*. En los melanocitos con el alelo A se detecta la unión de los factores de transcripción HLTF (*helicase-like transcription factor*), LEF1 (*lymphoid enhancer-binding factor 1*) y MITF (*microphthalmia-associated transcription factor*) al *enhancer*, y se forma un bucle de cromatina de largo alcance entre éste y el promotor de *OCA2*, aumentando su expresión; estos melanocitos están muy pigmentados. Por el contrario, en los que poseen el alelo G, la formación del bucle de cromatina, el reclutamiento de factores de transcripción y la expresión de *OCA2* se ven reducidos, dando lugar a melanocitos menos pigmentados (Visser *et al.*, 2012). Así, el alelo A se asocia con ojos no azules y el alelo G con ojos no marrones (Beleza *et al.*, 2013; Sturm *et al.*, 2008; Sturm y Duffy, 2012; Liu *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2013; Hart *et al.*, 2013; Wilde *et al.*, 2014; Draus-Barini *et al.*, 2013; Valenzuela *et al.*, 2010; Lim y Oh, 2013; Kastelic *et al.*, 2013; Kastelic y Drobnič, 2012; Walsh, Lindenbergh *et al.*, 2011; Walsh, Liu *et al.*, 2011, 2012; Eiberg *et al.*, 2008; Nan *et al.*, 2009; Mengel-From *et al.*, 2009; Spichenok *et al.*, 2011). Presenta los alelos A y G.

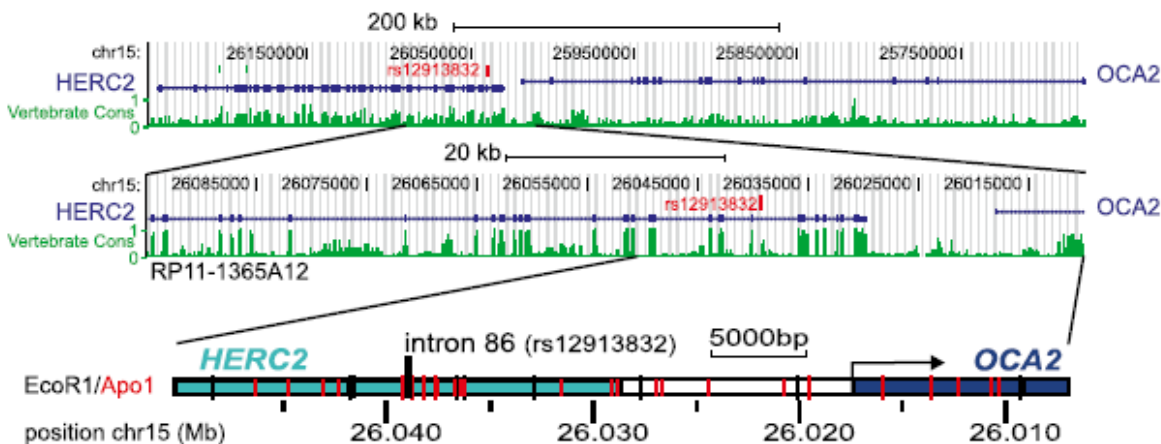


Figura 16. Panel superior: Locus *HERC2-OCA2*.
Panel inferior: Ubicación del polimorfismo estudiado dentro del intrón 86 de *HERC2* y posición del promotor de *OCA2*. Visser *et al.* 2012.

-rs12203592, de *IRF4*, relacionado con el color de ojos azul (Hart *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2010; Sturm y Duffy, 2012; Lim y Oh, 2013; Kastelic *et al.*, 2013; Walsh, Lindenbergh *et al.*, 2011; Martinez-Cadenas *et al.*, 2013; Praetorius *et al.*, 2013; Walsh *et al.* 2012). Este polimorfismo

se encuentra en el intrón 4 que forma parte de un enhancer del gen. El alelo T, asociado a color de ojos azul, perjudica la unión del factor de transcripción TFAP2A, el cual, junto con MITF, promueven la expresión del gen. A su vez, IRF4 coopera con MITF para activar la expresión de *TYR* (Praetorius *et al.*, 2013). Presenta los alelos C y T.

-rs12896399, del gen *SLC24A4*, ubicado 15262pb aguas arriba de su promotor que modifica la unión de factores de transcripción como AML1 (Liu *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2013; Kastelic *et al.*, 2013; Walsh, Liu *et al.*, 2011; Walsh *et al.* 2012; Lim y Oh, 2013; Walsh, Lindenbergh *et al.*, 2011; Martínez-Cadenas *et al.*, 2013; Sulem *et al.*, 2007; Hart *et al.*, 2013). El alelo T se vio relacionado a ojos azules, mientras que el alelo G se asoció a ojos marrones (Hart *et al.*, 2013; Sulem *et al.*, 2007, Martínez-Cadenas *et al.*, 2013). Presenta los alelos G y T.

-rs16891982, del gen *SLC45A2* (Hart *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2010; Sturm y Duffy, 2012; Ruiz *et al.*, 2013; Wilde *et al.*, 2014; Valenzuela *et al.*, 2010; Fernandes Durso *et al.*, 2014; Kastelic *et al.*, 2013; Lim y Oh, 2013; Walsh, Liu *et al.* 2011; Walsh *et al.* 2012; Spichenok *et al.*, 2011; Walsh, Lindenbergh *et al.*, 2011; Martínez-Cadenas *et al.*, 2013), siendo el alelo G el relacionado a la pigmentación clara (Wilde *et al.*, 2014; Walsh *et al.*, 2012). Se estima que este alelo comenzó a verse favorecido por selección entre 11.000 y 19.000 años atrás. Una transversión C/G es responsable del cambio de aminoácido Phe374Leu en la proteína (Wilde *et al.*, 2014). Presenta los alelos C y G.

-rs1393350, del gen *TYR*, también relacionado con la presencia de ojos claros (Liu *et al.*, 2010; Kastelic *et al.*, 2013; Walsh, Lindenbergh *et al.*, 2011; Ruiz *et al.*, 2013; Lim y Oh, 2013; Martínez-Cadenas *et al.*, 2013; Sulem *et al.*, 2007; Kastelic y Drobnič 2012; Walsh *et al.* 2012). Se encuentra en un intrón del gen. Según Walsh *et al.* (2012), el genotipo GG se asocia al color marrón y el AA al color azul. Presenta los alelos G y A.

Estos cinco polimorfismos forman parte del sistema IrisPlex utilizado para la determinación de color de ojos en varias poblaciones, siendo la europea la población de la cual se poseen más datos (Walsh, Lindenbergh *et al.* 2011; Walsh *et al.* 2012, 2013). Hasta el momento, no existen datos tomados sobre la población de nuestro país para la variación genética asociada con el carácter fenotípico del color de ojos.

Genética de poblaciones

La Genética de poblaciones es la disciplina que estudia las frecuencias alélicas y genotípicas y la eficacia biológica de los genotipos en las poblaciones naturales. La evolución es el cambio en dichas frecuencias a través del tiempo, en algunos casos debido a la diferencia de su eficacia en determinados ambientes. Uno de los objetivos de esta disciplina es describir la estructura genética de las poblaciones y comparar la variación intra e interpoblacional (Gillespie, 1998).

Alelos y frecuencia alélica

Un alelo es una de las varias formas alternativas de un gen que ocupa un locus determinado en un cromosoma (Krebs *et al.*, 2012). La frecuencia alélica es la proporción relativa de un alelo determinado respecto al total de alelos que pueden ocupar el locus en cierta población:

$$p = \text{frecuencia del alelo } \mathbf{A} = \frac{(2 \times \text{cantidad de homocigotas } \mathbf{A} + 0,5 \times \text{cantidad de heterocigotas})}{2 \times \text{total de individuos}}$$

$$q = \text{frecuencia del alelo } \mathbf{a} = \frac{(2 \times \text{cantidad de homocigotas } \mathbf{a} + 0,5 \times \text{cantidad de heterocigotas})}{2 \times \text{total de individuos}}$$

A su vez, $p + q = 1$

Ley de Hardy-Weinberg

Fue enunciada por el matemático inglés Godfrey Harold Hardy y el médico alemán Wilhelm Weinberg independientemente en 1908. Esta ley describe el estado de equilibrio de un locus en una población diploide con cruzamiento al azar (panmíctica) que no es afectada por mutación, migración, deriva génica, selección natural y endogamia. En tal caso, para formar un cigoto, se requieren dos gametas al azar; así, la probabilidad de encontrar un individuo homocigota en la descendencia es el producto de las probabilidades de que cada una de las gametas porten el alelo en cuestión. Por otro lado, la probabilidad de que un individuo sea heterocigota es igual a dos veces el producto de las probabilidades de que una gameta posea un alelo y la otra gameta porte la otra variante, ya que son eventos mutuamente excluyentes (figura 17). Si consideramos p = frecuencia del alelo **A** en la población y q = frecuencia del alelo **a**, las tres posibles frecuencias genotípicas finales de la descendencia son:

Genotipo	AA	Aa	aa
Frecuencia	p^2	$2pq$	q^2

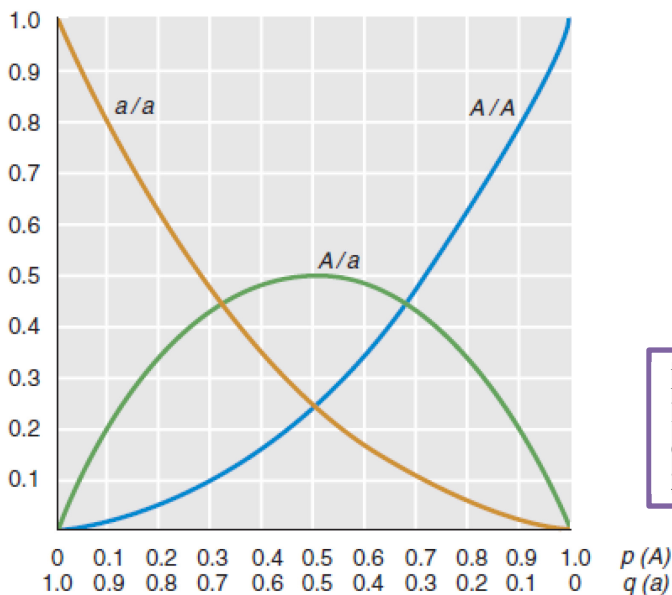


Figura 17. Frecuencias genotípicas en función de las frecuencias alélicas p y q para una población en equilibrio de Hardy-Weinberg. Griffiths *et al.*, 2008.

En una población que se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinberg las frecuencias genotípicas y alélicas se mantienen constantes de generación en generación. Si una población no está en equilibrio, basta con una sola generación de apareamiento al azar para que se restablezca el equilibrio. Para especies dioicas con frecuencias genotípicas desiguales en ambos sexos, se necesitan dos generaciones para alcanzar el equilibrio de Hardy-Weinberg (Gillespie, 1998).

Una población en equilibrio puede alejarse del mismo variando sus frecuencias alélicas y genotípicas al sufrir alguno de los siguientes eventos:

-Mutación: cambio en la secuencia de ADN. Aumenta la diversidad intra e interpoblacional.

-Migración: movimiento de individuos de una región a otra. Aumenta la variabilidad intrapoblacional pero disminuye la interpoblacional.

-Deriva génica: cambio aleatorio de las frecuencias alélicas. Disminuye la diversidad genética en la población a la par que aumenta ésta entre poblaciones.

-Población no panmíctica: los cruzamientos no son al azar (por ejemplo, por endogamia).

-Selección natural: aquellos miembros de la población con características menos adaptadas (según lo determine su medio ambiente) morirán con mayor probabilidad, y aquellos con características mejor adaptadas sobrevivirán más probablemente (Hedrick, 2000). Esto disminuye la diversidad genética.

Una descripción completa de la estructura genética de la población debe incluir un componente geográfico cuando el fin es entender las fuerzas evolutivas responsables de la variación genética.

Población americana

América fue poblada entre unos 23000 y 8000 años atrás. Los primeros habitantes de este continente llegaron principalmente desde Asia, específicamente desde Siberia por el estrecho de Bering, en una única oleada migratoria. Estos ancestros se diversificaron en dos ramas genéticas basales hace 13000 años (Raghavan *et al.*, 2015).

Población argentina

La actual composición étnica de la población Argentina es el resultado de la gran ola de inmigración europea sucedida entre 1850 y 1955, que se sumó a la población local cuantitativamente menor que estaba instalada previamente a la independencia de Argentina, integrada por una base indígena originaria, africana inmigrada forzosamente entre los siglos XVII y XVIII y con una relativamente pequeña población de colonizadores españoles que arribaron durante los siglos XVI a XVIII, fuertemente mestizadas entre sí. Básicamente se pueden distinguir dos grandes corrientes de la oleada migratoria europea:

-la inmigración que se asentó en colonias rurales, principalmente en la región pampeana, integrada por italianos, alemanes, franceses, suizos, galeses, irlandeses, belgas, holandeses, escandinavos, judíos, eslavos (como polacos, checoslovacos, rusos, ucranianos, yugoslavos y búlgaros), etc.;

-la inmigración que se asentó en las ciudades, principalmente en Buenos Aires, en su mayoría italianos y españoles.

Desde mediados de siglo XX, la composición étnica estuvo básicamente influenciada por las grandes migraciones internas del campo a la ciudad, y la inmigración proveniente de países sudamericanos, principalmente Paraguay y Bolivia (Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas del año 2010, Instituto Nacional de Estadística y Censos -INDEC-) que se mantiene hasta la actualidad, con lo cual la población se encuentra actualmente en un proceso de cambio en cuanto a su composición genética (cuadro 1).

AÑO	% EXTRANJEROS	% DE LIMÍTROFES
1869	12.1	2.4
1895	25.4	2.9
1914	29.9	2.6
1947	15.3	2.0
1960	13.0	2.3
1970	9.5	2.3
1980	6.8	2.7
1991	5.0	2.5
2001	4.2	2.5

Cuadro 1. Argentina 1869-2001. Evolución de los porcentajes de extranjeros y extranjeros de países limítrofes en la población total. (INDEC).

Adicionalmente la Argentina cuenta con considerables minorías étnicas, como las que integran las comunidades alemana, árabe, polaca, judía, armenia, peruana, uruguaya, japonesa, china y coreana, entre otras. El mestizaje ha desempeñado un papel fundamental en la composición étnica de la población argentina. Es necesario destacar que las corrientes inmigratorias durante la época de la colonia y luego en la época de la gran inmigración ultramarina (1850-1930), estuvieron integradas mayoritariamente por varones que se mestizaron en Argentina con mujeres indígenas o de origen africano o sus descendientes. Varios investigadores sostienen que en este proceso de mestizaje, de una población de inmigrantes varones varias veces superior a la población local, se diluyeron los rasgos genotípicos indígenas y africanos (Marino *et al.*, 2007) y predominaron los rasgos europeos (rasgos faciales, color de piel, ojos y cabello), que dan cierto aspecto físico diferencial a la población argentina, sobre todo en las ciudades y regiones que recibieron mayor inmigración, en relación con otros países de la región. Esto fue corroborado mediante un estudio que reveló una considerable diferencia en la composición étnica desde la perspectiva de género, al descubrir que el aporte genético por vía paterna es 94,1% europeo, 4,9% indígena y 0,9% africano, mientras que el aporte genético por la vía materna es sólo 44,3% europeo, 53,7% indígena y 2,0% africano (Corach *et al.*, 2010). El bajo aporte genético africano por vía paterna se debe en parte a la alta mortalidad masculina en las guerras (Andrews, 1989). Otros estudios indican que la ancestría promedio en nuestro país es un 65% europeo, 31% nativo y 4% africano, con distinta distribución en las regiones geográficas de Argentina. (Avena *et al.*, 2012).

En nuestro país, la población urbana posee más componente nativo americano de lo que se cree. Esta particularidad es debida a la historia migratoria y de contactos interétnicos sucedidos en la Argentina (Martínez Marignac *et al.*, 1999).

Población bonaerense

Regionalmente, la composición de la población, atendiendo a los orígenes nacionales y étnicos, varía. En la región central del país, donde se concentra la mayoría de la población, la ascendencia se compone principalmente de inmigrantes italianos y españoles llegados durante la gran migración. En menor medida existen colonias y comunidades considerables de paraguayos, franceses, alemanes, polacos, bolivianos, uruguayos, judíos y árabes. La región se caracteriza por un predominio de ascendientes europeos; sin embargo, desde mediados del siglo XX se aprecia que el aporte europeo disminuye marcadamente y es reemplazado por la migración interna, de los países limítrofes y de Perú, de elevada composición indígena (Avena *et al.*, 2006). Estas comunidades son predominantes en los partidos del oeste y sur del conurbano industrial de Buenos Aires, que constituyen la mayor concentración urbana del país. La población asiática compuesta por coreanos, chinos, vietnamitas y japoneses se concentra en el Gran Buenos Aires. Existen indicios de una creciente participación de mujeres indígenas y afroargentinas en las relaciones familiares de la población bonaerense, luego de finalizada la oleada inmigratoria europea a mediados de los años cuarenta, a consecuencia de las migraciones internas y desde países limítrofes y Perú. Estas migraciones habrían modificado sustancialmente la composición genética de la población bonaerense, aumentando la proporción del componente genético amerindio y africano (Avena *et al.*, 2001, 2006). Se concluye que la mezcla génica promedio de la población de la Ciudad de Buenos Aires contiene un 79,9 % \pm 0,4% de contribución europea, 15,8 % \pm 0,4% indígena y un 4,3 % \pm 0,2% africana (Avena *et al.*, 2006). La provincia de Buenos Aires muestra un 76% de contribución europea, y contribuciones nativas y africanas que no se diferencian significativamente del promedio ya reportado para el país (Avena *et al.*, 2012).

Las poblaciones de distinta procedencia étnica y geográfica pueden portar diferentes variantes alélicas en genes que influyen en características fenotípicas que facilitan la identificación de individuos. El conocimiento de la variación genética que origina el color del iris en nuestra población facilitará su aplicación futura en la identificación de personas, requerida por los diferentes motivos ya mencionados. La población bonaerense resulta de particular interés, ya que está conformada por individuos procedentes de diversos lugares del país, pudiendo considerarse representativa del mismo. Cabe remarcar que en la población Argentina no se ha hecho anteriormente ningún estudio poblacional referido a los genes implicados en el color del iris; menos aún, estudios que evalúen la relación entre el genotipo y el color de los ojos.

Objetivos

El objetivo general del presente proyecto es describir la variación genética relacionada con el color del iris en la población argentina, para su posterior aplicación dentro del área de Genética Forense, en pruebas de identificación de personas.

Los objetivos particulares del proyecto son:

- Caracterizar la variación genética de los polimorfismos rs12913832, rs12203592, rs12896399, rs16891982 y rs1393350 y relevar la variación de color del iris en una muestra de la población bonaerense.
- Analizar la asociación de dichos polimorfismos genéticos con la determinación de color del iris.
- Comparar los resultados obtenidos con datos de la bibliografía, los cuales pertenecen a estudios realizados en otras poblaciones del mundo.
- Analizar una posible relación entre la variación del color del iris y el sexo de los individuos.

Hipótesis

Dada la composición de la población argentina en la actualidad, la variación genética relacionada con el color del iris reflejaría en parte la variación previamente descrita para la población europea, si bien podrían hallarse distintas distribuciones alélicas como reflejo de la miscegenación con pueblos nativos americanos y de otras procedencias del mundo. Por ende, la implementación de un conjunto de polimorfismos de utilidad en poblaciones europeas para la determinación del color del iris puede no ser aplicable en nuestra población.

Materiales y métodos

Toma de muestras

En este proyecto se analizaron muestras de ADN de 115 individuos donantes voluntarios, de edad comprendida entre los 18 y 50 años, identificados como provenientes de la provincia de Buenos Aires. El proyecto fue aprobado previamente por el Comité de Ética en Investigaciones Biomédicas del IMBICE; los donantes fueron consultados para participar voluntariamente del proyecto y se les solicitó la firma de un consentimiento informado (Anexo). Posteriormente se tomaron dos muestras de enjuague bucal, solicitándole al donante que realice dos enjuagues enérgicos con 1 ml de agua cada uno, para volcarlos en sendos tubos de centrifuga plásticos. Luego se agregaron 2 volúmenes de etanol por tubo, se mezcló cada uno por inversión y se guardaron en heladera hasta la etapa de extracción del ADN. El color del iris se registró con fotografías tomadas por una cámara digital (Nikon Coolpix s3400, 20 megapixels) con flash de relleno, normalizando la intensidad de la luz que llegaba sobre el iris de cada ojo al utilizar un sistema que evitaba la incidencia de la luz ambiente y una linterna de una intensidad determinada constante. Las muestras se categorizaron luego en grupos según el color del iris, de acuerdo con una clasificación dada por Walsh, Liu *et al.* (2011).

Extracción de ADN

A partir de las muestras de enjuague bucal se extrajo el ADN de las células de descamación bucal mediante una técnica estándar (Gemmel y Akiyama, 1996). Para llevar a cabo dicha técnica, se centrifugaron los tubos con las muestras durante 10 minutos a 4.000 rpm en refrigeración, se descartó el sobrenadante, y se realizó un lavado del *pellet* con 150µL de buffer TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH: 7,5) centrifugando en iguales condiciones que el paso anterior. Luego de descartar el sobrenadante, se agregaron 300µL de buffer de digestión (NaCl 100mM, Tris-HCl 50mM, SDS 1%, EDTA 50mM, pH: 8) y 10µL de Proteinasa K (10 mg/mL, Promega, USA) para disgregar el *pellet*. Se incubó a 37°C durante 16 horas aproximadamente (*overnight*). Al finalizar la digestión, se agregaron 300µL de LiCl 5M y se agitaron los tubos durante un minuto. Luego se añadieron 600µL de SEVAG (cloroformo:alcohol isoamílico 24:1), se agitaron durante media hora y se centrifugaron 20 minutos a 4000 rpm. Se quitó la fase superior de cada tubo con ayuda de pipetas Pasteur y se colocaron en tubos de centrifuga plásticos. Se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío para precipitar el ADN y se centrifugó todo el volumen durante 10 minutos a 13.000 rpm en tubos tipo eppendorf. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet obtenido con 50µL de etanol 70%, centrifugando en iguales condiciones que el paso anterior. Luego de descartar el sobrenadante y dejar evaporar el etanol, se agregaron entre 80 y 150µL de buffer TE, se agitaron enérgicamente los tubos y se guardaron en heladera.

Cuantificación de ADN

Luego de 24hs en la heladera para una adecuada resuspensión del ADN, se procedió a cuantificar las muestras utilizando un espectrofotómetro (NanoDrop 2000c UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Scientific, USA). Se esperaba obtener concentraciones entre 10 y 500 ng/ul. Si las cuantificaciones no fueron satisfactorias (<10ng/ul) se repitió la extracción a partir de la fase orgánica, la cual se reservó en el freezer para subsanar una posible inversión de fases. El blanco de cuantificación se realizó con agua destilada Milli-Q® (Millipore, Bedford, USA). De acuerdo a estos resultados, se prepararon diluciones de las muestras a 10 ng/μL, con agua destilada Milli-Q® estéril.

Las diluciones y los stock de las muestras se almacenaron a -20°C.

Diseño de *primers* y elección de enzimas de restricción

Para el análisis de los SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*, polimorfismos de nucleótido simple) se utilizó la técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa), la cual consiste en la amplificación específica de un segmento de ADN de interés (Mullis *et al.*, 1986). Para ello fue necesario el diseño de los *primers* u oligonucleótidos flanqueantes al segmento en cuestión. Utilizando la base de datos dbSNP de NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) se obtuvo la secuencia de la región que contiene el SNP en formato FASTA, se quitaron los espacios en blanco de la misma con *Nucleic Acid Sequence Massager* (<http://www.attotron.com/cybertory/analysis/seqMassager.htm>) y se diseñaron los oligonucleótidos *forward* y *reverse* con Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Se calculó la temperatura de fusión o de *melting* (T_m) de los oligonucleótidos como

$$T_m (\text{°C}) = 2x(A+T) + 4x(G+C)$$

para determinar la temperatura de hibridación o *annealing*

$$T_a (\text{°C}) = T_m - 4$$

Se realizaron cambios en la secuencias de los oligonucleótidos cuando fue necesario, para que la temperatura de hibridación de los mismos fuese similar y/o para evitar problemas de autocomplementariedad. Se comprobó la ausencia de homologías con otras regiones del genoma humano utilizando BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) de NCBI.

Como se utilizaron dos variantes de la técnica, el diseño se realizó de dos formas distintas según el caso:

-PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*): Con NEBcutter (New England Biolabs, <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) se buscaron enzimas de restricción cuyo sitio de reconocimiento incluyera al SNP. Como no se encontraron enzimas homólogas con los sitios

de ubicación de los SNPs, se reemplazaron bases aguas arriba y aguas abajo por una base N; de este modo se obtuvieron enzimas compatibles para dos de los marcadores. Luego de elegir la enzima (figuras 18 y 19), uno de los oligonucleótidos se diseñó con dicho *mismatch* (en minúscula en la secuencia) y el otro se diseñó de acuerdo con lo sugerido por *Primer3* (tabla 1).

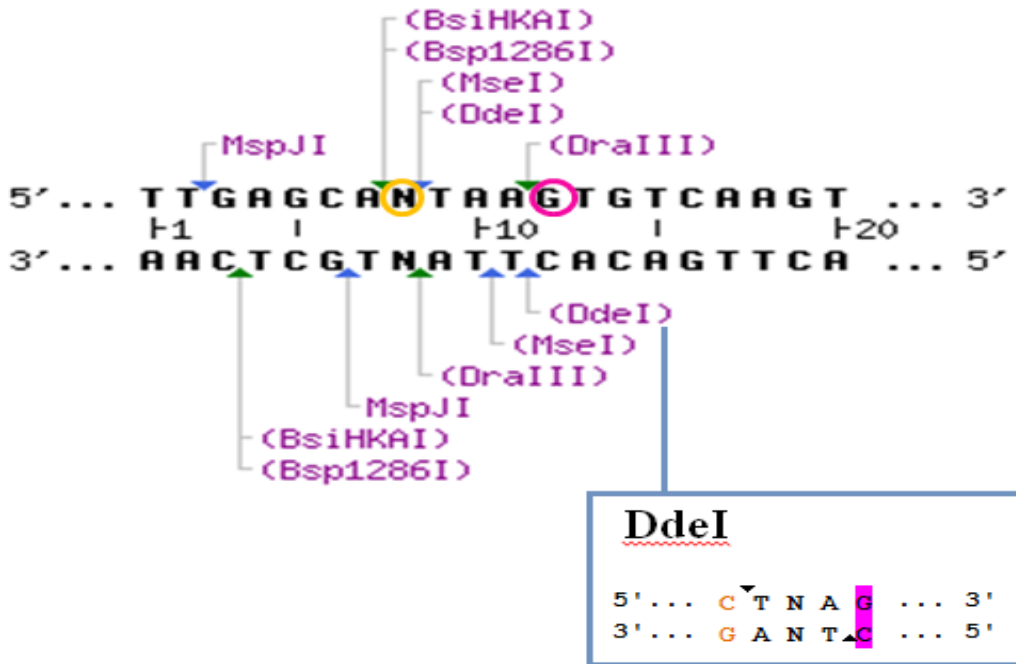


Figura 18. Secuencia de la región que contiene el polimorfismo rs12913832 y enzima elegida con el sitio de restricción. Realizado con NebCutter.

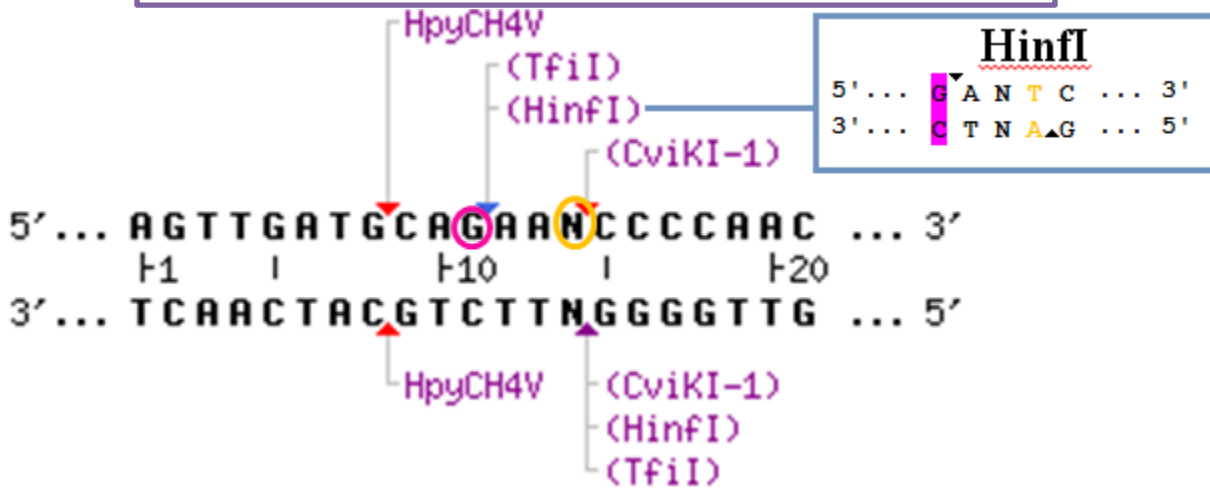


Figura 19. Secuencia de la región que contiene el polimorfismo rs16891982 y enzima elegida con el sitio de restricción. Realizado con NebCutter.

Gen	Polimorfismo	Oligonucleótidos utilizados	Ta calculada	Enzima de restricción
<i>HERC2</i>	rs12913832	<i>Forward</i> 5'-CCAGTCTCATTGAGCAcTAA-3' <i>Reverse</i> 5'-CCCCACCACTGGTAGTTTTTC-3'	56°C 58°C	<i>Ddel</i>
<i>SLC45A2</i>	rs16891982	<i>Forward</i> 5'-TTTTCTGACGTCCATAGATTT-3' <i>Reverse</i> 5'-GAGGTTGGATGTTGGGGaTT-3'	56°C 56°C	<i>HinfI</i>

Tabla 1. Detalle de los oligonucleótidos utilizados para la técnica PCR-RFLP.

-PCR alelo-específica: Se diseñaron un oligonucleótido *forward* y dos *reverse*, siendo estos últimos específicos de un alelo ya que el extremo 3' de cada uno es complementario a un alelo u otro del SNP en cuestión (rs12203592); de esta forma la PCR amplifica según el/los alelo/s presente/s. Según la base presente en este extremo, se realizó un cambio (*mismatch*, se muestra en minúscula en la secuencia) tres posiciones aguas arriba, según lo indicado por Gaudet *et al.*, 2009. En el caso de los polimorfismos rs1393350 y rs12896399 se diseñaron dos *forward* específicos de alelo y un *reverse* (tabla 2).

Gen	Polimorfismo	Oligonucleótidos utilizados	Ta calculada
<i>IRF4</i>	rs12203592	<i>Forward</i> (Modificado de Walsh <i>et al.</i> , 2013) 5'-ACAGGGCAGCTGATCTCTTCAGG-3' <i>Reverse C</i> 5'-CCAAAAGTACCACAGGGGAAaTTG-3' <i>Reverse T</i> 5'-CCAAAAGTACCACAGGGGAAgTTA-3'	Ta=68°C Ta= 66°C Ta= 66°C
<i>SLC24A4</i>	rs12896399	<i>Forward G</i> 5'- TCTTTAGGTCAGTATATTTTaGGG-3' <i>Forward T</i> 5'- TTCTTTAGGTCAGTATATTTTcGGT-3' <i>Reverse</i> 5'- GACCCTGTGTGAGACCCAGT-3'	Ta=60°C Ta=62°C Ta=60°C
<i>TYR</i>	rs1393350	<i>Forward A</i> 5'-CAGTCCCTTCTCTGCgACA-3' <i>Forward G</i> 5'-CAGTCCCTTCTCTGcTACG-3' <i>Reverse</i> 5'-GAAGGTGAACTGAGGCCAAA-3'	Ta= 56°C Ta= 56°C Ta= 56°C

Tabla 2. Detalle de los oligonucleótidos utilizados para la técnica PCR alelo-específica.

PCR

Para una reacción de PCR de 10µl finales se utilizaron:

- Buffer de reacción TAS 1X (INBIO HIGHWAY®, Argentina)
- 2mM de MgCl₂
- 0,2mM de dNTPs (INBIO HIGHWAY®, Argentina)
- 2,5pmoles de oligonucleótidos
- 0,25U de Taq ADN polimerasa (INBIO HIGHWAY®, Argentina)
- 20ng de ADN molde
- Agua Milli-Q® estéril para completar 10µL por reacción.

Estas concentraciones estándar se utilizaron para las reacciones de prueba de los oligonucleótidos. En el caso de que no amplificaran, aún luego de modificar la Ta del ciclado correspondiente, se ajustaron las reacciones con cambios en las concentraciones de los reactivos.

En todas las reacciones se incluyó un control negativo, un control de digestión para la PCR-RFLP, y un control positivo para ambos alelos en el caso de la PCR alelo-específica. Se utilizaron termocicladores MPI-02-Evo (Argentina) y Biometra (Alemania).

rs12913832 (HERC2)

- Se utilizaron las concentraciones estándar de los reactivos.
- Condiciones de ciclado:
 - Desnaturalización inicial: 94°C, 2' 30"
 - Desnaturalización: 93°C, 45"
 - Hibridación: 56°C, 1'
 - Touchdown* (T.D.): descenso de 1°C cada un ciclo hasta 52°C
 - Extensión: 72°C, 1'
 - Extensión final: 72°C, 5'
 - Número de ciclos: 34

*El T.D. tiene por objeto establecer condiciones más estrictas de amplificación durante los primeros ciclos de PCR, a fin de obtener un producto amplificado de alta especificidad y luego, en los ciclos posteriores, las condiciones de hibridación se relajan gradualmente para obtener abundante producto, utilizando como molde al amplificado específico de los primeros ciclos.

rs12203592 (IRF4)

- Concentraciones de los reactivos:
 - 1,75mM de MgCl₂
 - 4,0pmoles de oligonucleótidos
 - 3U de ADN polimerasa.

- Condiciones de ciclado:
 - Desnaturalización inicial: 94°C, 2' 30"
 - Desnaturalización: 93°C, 45"
 - Hibridación: 56°C, 50"
 - Extensión: 72°C, 55"
 - Extensión final: 72°C, 5'
 - Número de ciclos: 34

rs12896399 (SLC24A4)

- Concentraciones estándar de los reactivos, a excepción del siguiente:
 - 1,75mM de MgCl₂
- Condiciones de ciclado:
 - Desnaturalización inicial: 94°C, 2' 30"
 - Desnaturalización: 93°C, 45"
 - Hibridación: 63°C, 50"
 - T.D.: descenso de 1°C cada un ciclo hasta 60°C.
 - Extensión: 72°C, 55"
 - Extensión final: 72°C, 5'
 - Número de ciclos: 34

rs16891982 (SLC45A2)

- Concentraciones estándar de los reactivos.
- Condiciones de ciclado:
 - Desnaturalización inicial: 94°C, 2' 30"
 - Desnaturalización: 93°C, 45"
 - Hibridación: 56°C, 1'
 - Extensión: 72°C, 1'
 - Extensión final: 72°C, 5'
 - Número de ciclos: 34

rs1393350 (TYR)

- Concentraciones estándar de los reactivos.
- Condiciones de ciclado:
 - Desnaturalización inicial: 94°C, 2' 30"
 - Desnaturalización: 93°C, 45"
 - Hibridación: 56°C, 50"
 - Extensión: 72°C, 55"
 - Extensión final: 72°C, 5'
 - Número de ciclos: 34

Electroforesis en gel de agarosa 1,8%

Se utilizó esta técnica para visualizar los resultados de la PCR. La agarosa (Promega, USA) se disolvió en *buffer* TAE 1X (Tris, acetato, EDTA, pH: 8) y se volcó en moldes adecuados para luego permitir que gelifique. Se usaron cubas de acrílico (MPI, La Plata) con *buffer* TAE 1X. Para la siembra se utilizó 1µL de *buffer* de carga (0,25% de xileno-cianol -XC-, 0,25% de

azul de bromofenol –ABF- y 30% de glicerol en agua, Sambrook *et al.*, 1989). En el buffer de carga se incorporó también el colorante GelRed™ (Biotium, USA), que fluoresce a la luz UV cuando se intercala con el ADN. Para estimar el tamaño de los fragmentos obtenidos, se sembraron simultáneamente en el gel 2µL de la escalera 100-MARKER® (Biodynamics) u otros fragmentos de ADN de longitud conocida.

La corrida electroforética se llevó a cabo a 100V durante 2 minutos y luego a 85V hasta que se separaran los frentes de XC y ABF aproximadamente 4cm. Se sembraron 3µL, 4µL o 5µL de muestra en el caso de los productos de PCR alelo-específica (para rs1393350, rs12896399 y rs12203592 respectivamente, ya que estos últimos resultaban en bandas más tenues) y 2µL de muestra en el caso de los productos de PCR que luego iban a ser digeridos con enzima. Se utilizó el sistema Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad Laboratories) para visualizar las bandas y registrar imágenes de los geles.

Digestión enzimática

Para el polimorfismo rs12913832 se utilizó la enzima *Ddel* (New England Biolabs, USA). Cada reacción de 16µL finales consistió de:

- Buffer* CutSmart® 1X (acetato de potasio 50mM, Tris-acetato 20mM, acetato de magnesio 10mM, albúmina sérica bovina –BSA- 100µg/ml, pH: 7.9; New England Biolabs, USA)
- 3,2 U de enzima de restricción
- aproximadamente 100ng de muestra
- cantidad suficiente de agua Milli-Q® para completar 16µL.

Para el polimorfismo rs16891982 se utilizó la enzima *HinfI* (Promega, USA). Cada reacción de 16µL finales consistía de:

- 1,6µL de *buffer* B® 10X (Tris-HCl 60mM, NaCl 500mM, DIT 10mM, AgCl₂ 60mM, pH: 7,5. Promega)
- 0,16µL de BSA
- 3,5U de enzima de restricción
- aproximadamente 100ng de muestra
- Agua Milli-Q®, c.s.p. 16µL

En ambos casos, las reacciones se incubaron *overnight* en un baño térmico a 37°C.

Electroforesis en gel de poliacrilamida neutra 8%

Este tipo de electroforesis se utilizó para resolver los fragmentos resultantes de la digestión enzimática. Para ello, se preparó el gel con:

- Acrilamida 38%-bisacrilamida 2%
- Buffer* TBE (Tris, ácido bórico 45mM, EDTA 1mM) 10X
- Agua destilada
- Persulfato como iniciador de la polimerización
- Tetrametiletilendiamina (TEMED) como catalizador de la polimerización.

Se agregaron 2µL del *buffer* de carga anteriormente mencionado sin GelRed™ a los tubos con el producto de digestión y se sembraron 5 ó 6µL, luego de una precorrida del gel de 15 minutos a 230V. También se sembraron 2µL de *escalera* en el mismo gel (o controles de tamaño conocido). La corrida electroforética se realizó a 250V con *buffer* TBE 0,5X en una cuba vertical de acrílico de 13,5cm de alto, hasta que el frente de XC se encontrara a 3cm del fondo (duración aproximada: 1 hora y media). Para las siembras dobles, se esperó 1 hora (para el caso de rs12913832) o 40 minutos (para rs16891982) entre una siembra y otra. La tinción se realizó durante 10 minutos con solución de GelRed™ (80mL de *buffer* TBE 0,5X con 5µL de GelRed™) y las bandas se visualizaron y registraron con el sistema Gel Doc™ XR+.

Cálculos estadísticos

Frecuencias alélicas y genotípicas

Las frecuencias alélicas de cada marcador se calcularon por separado para cada grupo: personas de ojos azules y personas de ojos marrones, y luego para la población total. El cálculo de frecuencias alélicas (P_i) se efectuó con la fórmula:

$$P_i = n_i / T$$

donde n_i es el número de alelos i observados en la población y T es la cantidad total de alelos observados para un locus determinado.

Las frecuencias genotípicas (P_{ij}) corresponden a las proporciones de los distintos genotipos de un locus en una población. Para calcularlas, se contabilizaron los diferentes genotipos hallados en la población y se usó la fórmula:

$$P_{ij} = n_{ij} / N$$

donde n_{ij} es la cantidad de veces que se observa el genotipo con alelos i y j en la población y N es el número de individuos de la población.

El desvío estándar (σ) de las frecuencias alélicas es una medida de la desviación típica de la distribución de muestreo. Se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\sigma = \sqrt{[P_i (1 - P_i)] / (2N)}$$

Para las frecuencias genotípicas se utilizó la fórmula:

$$\sigma = \sqrt{[P_{ij} (1 - P_{ij})] / (N)}$$

Se realizaron gráficos de barras con el programa Graph Pad Prism 6 de GraphPad Software, Inc..

Equilibrio de Hardy-Weinberg

Para evaluar si la población se encontraba en equilibrio, se compararon las heterocigosis observada y esperada mediante el test exacto (cadenas de Markov) utilizando el programa Arlequín 3.5 (Schneider *et al.*, 2000).

A grandes rasgos, a partir de los datos de la población en estudio, se calcularon los valores esperados para cada genotipo:

$$\text{Esp}(AA) = p^2n$$

$$\text{Esp}(Aa) = 2pqn$$

$$\text{Esp}(aa) = q^2n$$

siendo n el número total de individuos de la población. Estos valores se compararon con los números observados en la población por medio de la prueba χ^2 de Pearson:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

siendo O el valor observado y E el valor esperado de cada genotipo. Para grados de libertad = número de genotipos - número de alelos = 3 - 2 = 1, el nivel de significancia de tabla es 3,84; si el valor de χ^2 es menor a 3,84 puede decirse con un porcentaje de confianza del 95% que la población se encuentra en equilibrio.

Diversidad nucleotídica

Es el número promedio de diferencias por sitio entre secuencias tomadas a pares. Se utilizó el programa Arlequín 3.5 (Schneider *et al.*, 2000) para calcularla.

Heterocigosis observada (H_o)

Es la frecuencia del genotipo heterocigota en la población en estudio. Se utilizó el programa Arlequín 3.5 (Schneider *et al.*, 2000) para calcularla. La media se calculó como la suma de las heterocigosis observadas de cada marcador dividido el total de marcadores. La desviación estándar se calculó como la sumatoria de cada heterocigosis observada menos la heterocigosis media, dividido el número de marcadores.

Heterocigosis esperada (H_e)

Se calculó según la ley de Hardy-Weinberg, como

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

siendo k el número de alelos para un locus y p las frecuencias de cada alelo.

AMOVA (Análisis de Varianza Molecular)

Es un análisis estadístico que permite determinar la variación genética dentro y entre las poblaciones o grupos de poblaciones elegidos (Excoffier *et al.*, 1992). Se utilizó el programa Arlequín 3.5 (Schneider *et al.*, 2000) para calcularlo.

Fst o índice de Wright

Este valor mide el grado de diferenciación o distancia genética entre poblaciones. Puede variar de 0 a 1; a mayor valor, más diferentes son genéticamente dos poblaciones en base a los datos. Se calculó el valor de F_{st} para cada par de poblaciones con el programa Arlequín 3.5 (Schneider *et al.*, 2000).

F_{is}

Es un valor que mide el grado de endogamia en una población. Mientras menor sea la heterocigosis observada respecto de la esperada, más cercano a 1 será este valor y habrá más indicios de endogamia en la muestra analizada (Hedrick, 2000). Se calculó como:

$$F_{is} = 1 - (H_o/H_e)$$

Estructura poblacional y estimación de ancestría

Se usó el programa Structure, el cual utiliza un método basado en *clusters* o grupos para inferir estructura poblacional usando datos genotípicos de marcadores no ligados. A su vez, identifica poblaciones genéticamente distintas, asigna individuos a las poblaciones, identifica migrantes e individuos “mezclados”. Asumiendo que los loci están en equilibrio de Hardy-Weinberg y en equilibrio de ligamiento, se utilizó un modelo en el cual hay K poblaciones ancestrales, cada una caracterizada por un *set* de frecuencias alélicas para cada locus. Los individuos de la muestra se asignaron probabilísticamente a una, dos o más poblaciones según sus genotipos.

Con este programa se obtuvieron ciertos gráficos, en los cuales se representa $^A Q$, que son los coeficientes para cada individuo respecto a la estimación de la pertenencia a un grupo determinado.

Como resultado presenta dos tipos de gráficos: en los gráficos de barra, cada individuo es representado por una única línea vertical, la cual está dividida en K segmentos de distinto color, que representan la estimación de ancestría de ese individuo. Esta es directamente proporcional a la longitud del segmento. En el gráfico se observa también la división según las poblaciones predefinidas.

En otra representación, todos los individuos se grafican como puntos de color (según la población predefinida) en un triángulo y se agrupan según la ancestría estimada. Cuando $K=3$, para un punto determinado, los tres componentes están dados por la distancia del punto a cada una de las aristas del triángulo. Los puntos que se encuentran en los ángulos son asignados completamente a una población. (Pritchard *et al.*, 2000).

Resultados

rs12913832

Al realizar la PCR con los primers que flanquean el sitio de este polimorfismo, se obtuvo un fragmento de 225pb (figuras 20 y 21). La digestión con la enzima *Ddel* permitió discernir entre los siguientes genotipos (figura 22):

- sólo una banda de 225pb (fragmento no digerido): homocigota A,
- sólo una banda de 203pb (fragmento digerido): homocigota G,
- una banda de 225pb y una banda de 203pb: heterocigota AG.

En los casos donde hubo digestión enzimática, el fragmento más pequeño, de 22pb, no pudo ser visualizado en el gel de poliacrilamida porque su rápida migración a través del mismo no lo permitió.

CCAGTTTCATTTGAGCAcTAARTGTCAAGTTCTGCACGCTATCATCATCAGGGGCCGAGGC
TTCTCTTTGTTTTAATTAATTGTTTTAACTGTGAGTTTATATACACTTGAAGCAGTATACA
TTTAGAAATGGTCTACTTGTCTGTTTCTTTGATTACTACCCATGAGACAGTATTAGTAATTCT
GGCCTATGAAATTGGCAAAGAAA**ACTACCAGTGGTGGGG**

Figura 20. Secuencia del fragmento amplificado. En negrita y subrayado se marcan las regiones de hibridación de los oligonucleótidos. R: A ó G. Se resalta en gris el sitio de restricción de la enzima.

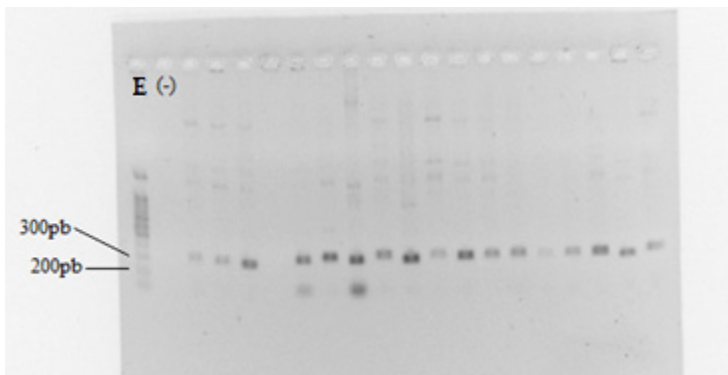


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa de rs12913832. E: Escalera 100pb. (-): Control negativo.

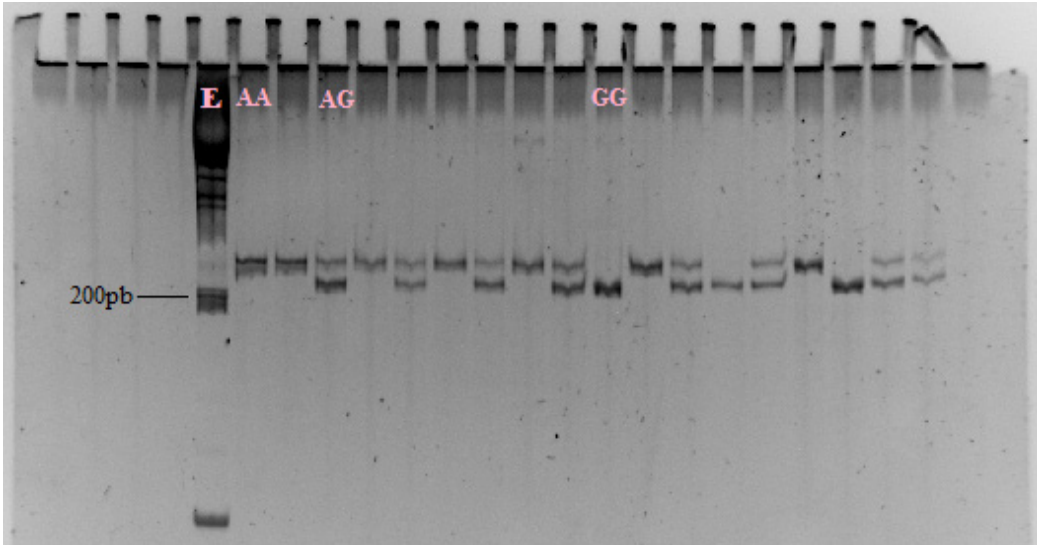


Figura 22. Electroforesis en gel de poliacrilamida de rs12913832. E: Escalera 100pb.

Frecuencias alélicas y genotípicas

En la población analizada se obtuvieron las siguientes frecuencias alélicas y genotípicas para este marcador (tablas 3 y 4, figuras 23 y 24).

Alelo	Ojos azules (n=23)	Ojos marrones (n=92)	Frecuencia poblacional (n=115)
A	0,08696±0,04154	0,72283±0,03299	0,59565±0,03236
G	0,91304±0,04154	0,27717±0,03299	0,40435±0,03236

Tabla 3. Frecuencias alélicas con sus desvíos estándar para rs12913832. n: tamaño muestral.

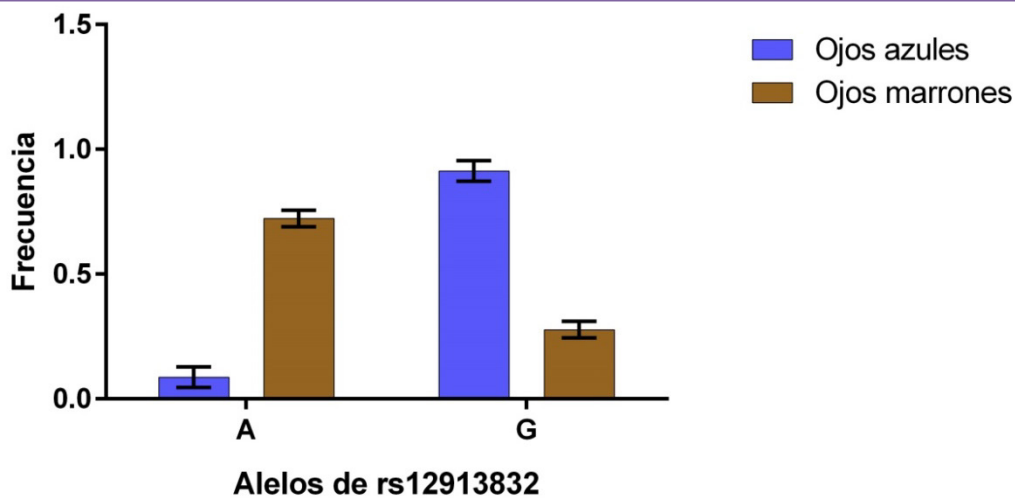


Figura 23. Gráfico de barras de las frecuencias alélicas para rs12913832.

Genotipo	Ojos azules (n=23)	Ojos marrones (n=92)	Frecuencia poblacional (n=115)
AA	0,0000±0,0000	0,47826±0,05207	0,38261±0,04532
AG	0,17391±0,07903	0,48913±0,05212	0,42609±0,04611
GG	0,82608±0,07903	0,03261±0,01851	0,19130±0,03668

Tabla 4. Frecuencias genotípicas con sus desvíos estándar para el marcador rs12913832. n: tamaño muestral.

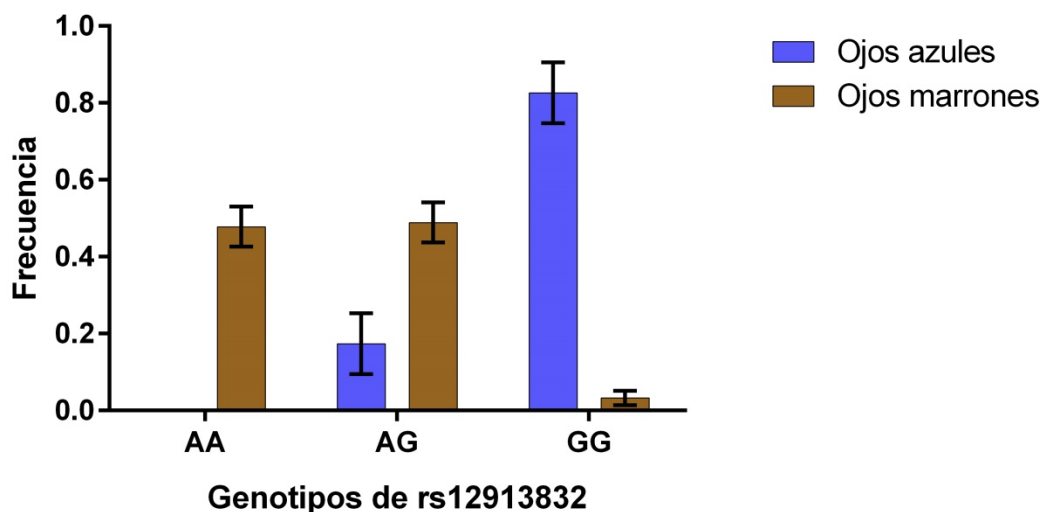


Figura 24. Gráfico de barras de las frecuencias genotípicas para rs12913832.

Se puede observar una relación de este marcador con los colores de ojos azul y marrón. El alelo G es mucho más frecuente en los individuos de ojos azules y el alelo A se observa con mayor frecuencia en las muestras de individuos de ojos marrones. A su vez, el genotipo AA sólo se presentó en los individuos de ojos marrones, el genotipo GG con mayor frecuencia en los de ojos azules y el genotipo AG presenta mayor prevalencia en los individuos de ojos marrones.

Para este marcador, la heterocigosis esperada en la población bonaerense fue de 0,48380 y la heterocigosis observada fue de 0,42609 (tabla 13).

Este marcador se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=0,24266\pm 0,00040$) (tabla 13).

rs12203592

Los resultados de cada individuo para este marcador se determinaron como presencia o ausencia de la banda de 102pb para cada alelo (figura 25), es decir, el ADN de los

homocigotas se amplificó sólo en la reacción de PCR específica para un alelo, mientras que el de los heterocigotas se amplificó en ambas reacciones (figura 26).

ACAGGGCAGCTGATCTCTTCAGGCTTTCTTGATGTGAATGACAGCTTTGTTTCATCCACTT
TGGTGGGTAAAAGAAGGYAAATTCCCCTGTGGTACTTTGG

Figura 25. Secuencia del fragmento amplificado. En negrita y subrayado se marcan las regiones de hibridación de los oligonucleótidos sin incluir la base cambiada en los *reverse*. Y: C ó T.

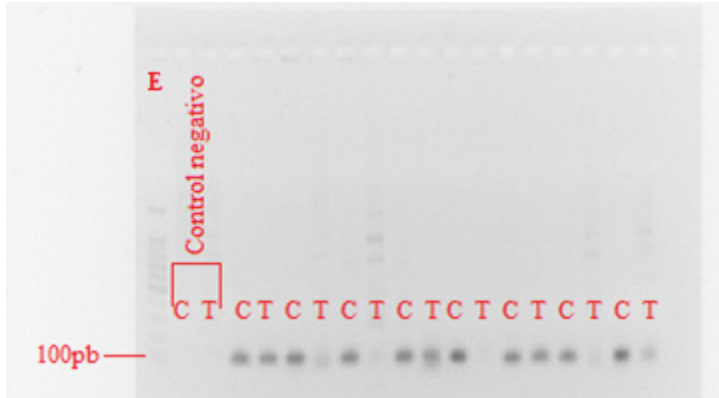


Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa de rs12203592. E: Escalera 100pb.

Frecuencias alélicas y genotípicas

En la población analizada se obtuvieron las siguientes frecuencias alélicas y genotípicas para este marcador (tablas 5 y 6, figuras 27 y 28).

Alelos	Ojos azules (n=23)	Ojos marrones (n=92)	Frecuencia poblacional (n=115)
C	0,86957±0,04966	0,91304±0,02077	0,90435±0,01939
T	0,13043±0,04966	0,08696±0,02077	0,09565±0,01939

Tabla 5. Frecuencias alélicas con sus desvíos estándar para rs12203592. n: tamaño muestral.

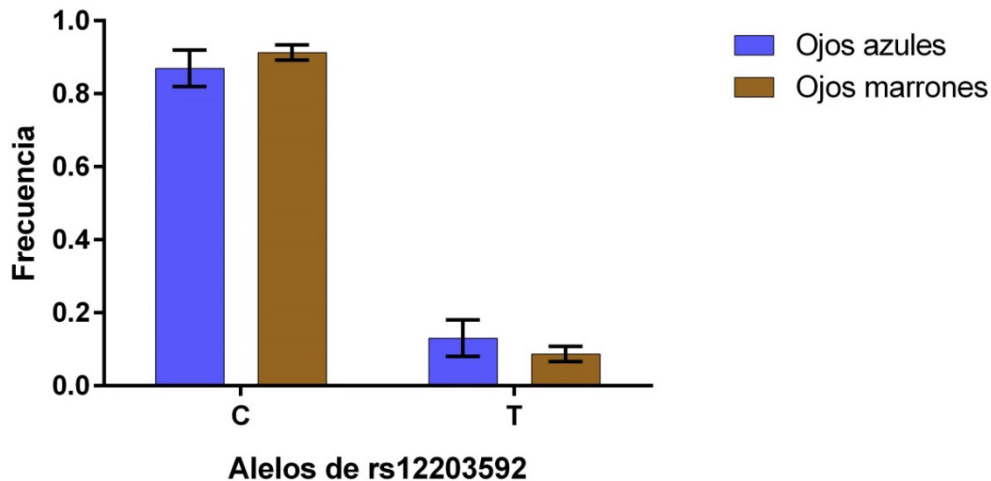


Figura 27. Gráfico de barras de las frecuencias alélicas para rs12203592.

Genotipo	Ojos azules (n=23)	Ojos marrones (n=92)	Frecuencia poblacional (n=115)
CC	0,78261±0,08601	0,84783±0,03745	0,83478±0,03463
CT	0,17391±0,07903	0,13043±0,03511	0,13913±0,03227
TT	0,04348±0,04252	0,02174±0,01520	0,02609±0,01486

Tabla 6. Frecuencias genotípicas con sus desvíos estándar para rs12203592. n: tamaño muestral.

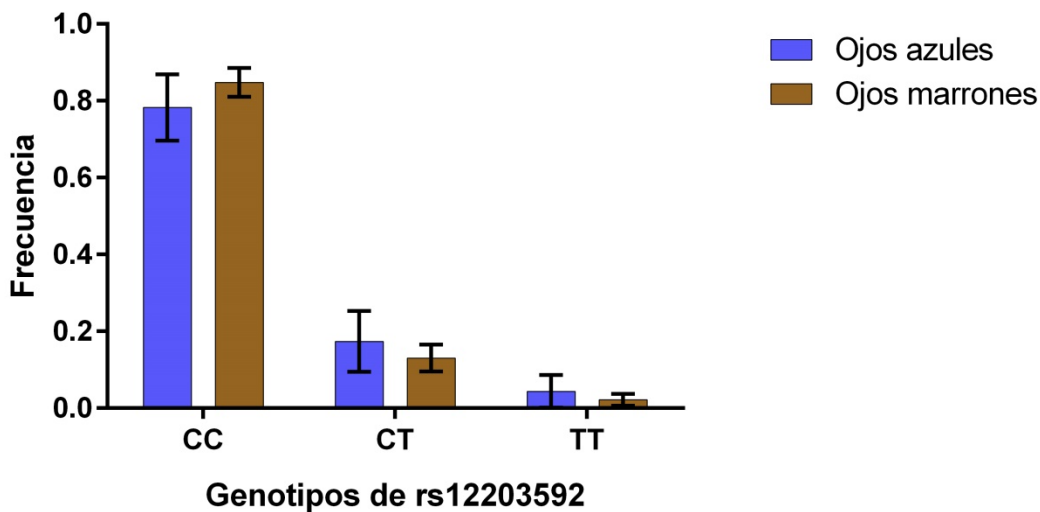


Figura 28. Gráfico de barras de las frecuencias genotípicas para rs12203592.

Las frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas para este marcador no permiten definir una relación con el color de los ojos. Se ve una leve tendencia del genotipo homocigota C a presentarse con mayor frecuencia en los individuos con ojos marrones y del heterocigota a presentarse en los de ojos azules más frecuentemente. Puede observarse una mayor frecuencia del alelo C, la cual se ve reflejada a su vez en una alta frecuencia de homocigotas C en esta población.

Para este marcador, la heterocigosis esperada en la población bonaerense fue de 0,17376 y la heterocigosis observada fue de 0,13913 (tabla 13).

Este marcador se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=0,06264 \pm 0,00025$) (tabla 13).

rs12896399

Los resultados de cada individuo para este marcador se determinaron como presencia o ausencia de la banda de 105pb para cada alelo (figuras 29 y 30).

TCTTTAGGTCAGTATATTTTGGG**K****TCTCTTTGT****CACAGCAGATTAACCTTCCTCATCAATA**
CAACATCAAGACCCAGGGCTAAGT**ACTGGGTCTCACACAGGGTC**

Figura 29. Secuencia del fragmento amplificado. En negrita y subrayado se marcan las regiones de hibridación de los oligonucleótidos sin incluir la base cambiada en los *forward*. K: G ó T.

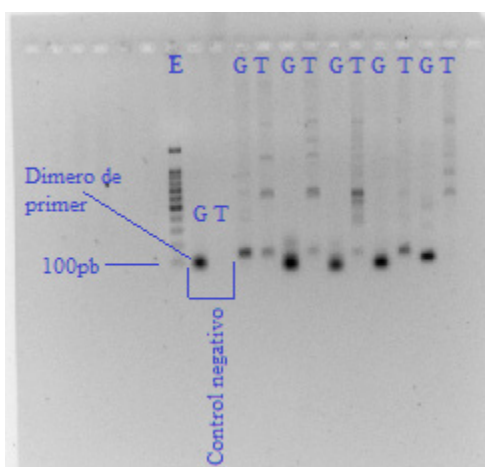


Figura 30. Electroforesis en gel de agarosa de rs12896399. E: Escalera 100pb.

Frecuencias alélicas y genotípicas

En la población analizada se obtuvieron las siguientes frecuencias alélicas y genotípicas para este marcador (tablas 7 y 8, figuras 31 y 32).

Alelos	Ojos azules (n=21)	Ojos marrones (n=81)	Frecuencia total (n=102)
--------	-----------------------	-------------------------	-----------------------------

G	0,61905±0,07493	0,67901±0,03668	0,66667±0,03300
T	0,38095±0,07493	0,32099±0,03668	0,33333±0,03300

Tabla 7. Frecuencias alélicas con sus desvíos estándar para rs12896399. n: tamaño muestral.

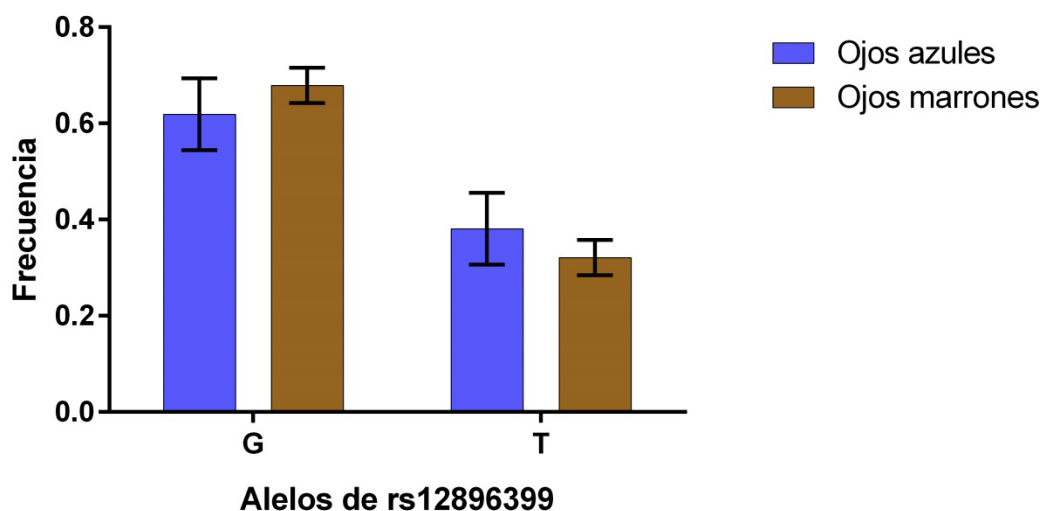


Figura 31. Gráfico de barras de las frecuencias alélicas para rs12896399.

Genotipo	Ojos azules (n=21)	Ojos marrones (n=81)	Frecuencia poblacional (n=102)
GG	0,47619±0,10899	0,46914±0,05545	0,47059±0,04942
GT	0,28571±0,09859	0,41075±0,05484	0,29216±0,04824214

Tabla 8. Frecuencias genotípicas con sus desvíos estándar para rs12896399. n: tamaño muestral.

TT	0,23810±0,09294	0,11111±0,03492	0,13725±0,03407259
----	-----------------	-----------------	--------------------

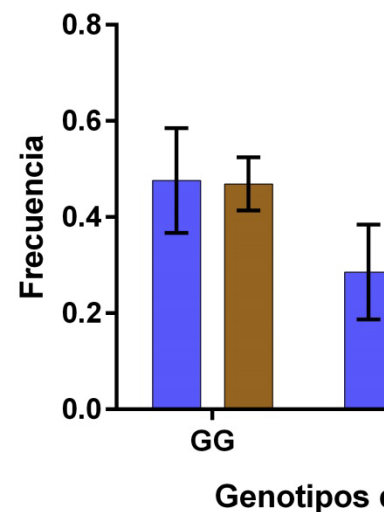


Figura 32. Gráfico de barras de las frecuencias genotípicas para rs12896399.

Se denota una tendencia leve del alelo G a estar más presente en los individuos de ojos marrones y del alelo T en los de ojos azules. Los datos genotípicos indican una tendencia del genotipo homocigota T a encontrarse más presente entre los individuos de ojos azules y del heterocigota entre los de color marrón. En el genotipo restante no se observa este tipo de tendencia. Puede observarse una mayor frecuencia del alelo G, la cual se ve reflejada a su vez en una alta frecuencia de homocigotas G en esta población.

Para este marcador, la heterocigosis esperada en la población bonaerense fue de 0,44663 y la heterocigosis observada fue de 0,39216, (tabla 13).

Este marcador se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=0,26476\pm 0,00044$) (tabla 13).

rs16891982

La PCR llevada a cabo para este marcador dio como resultado un fragmento de 188pb (figuras 33 y 34). Luego de digerir con la enzima *HinfI*, se pudo diferenciar entre los siguientes genotipos (figuras 35 y 36):

- banda de 160pb (fragmento digerido en un sitio del amplicón): homocigota C
- banda de 140pb (fragmento digerido en un sitio del amplicón y en la zona del polimorfismo): homocigota G
- una banda de 160pb y una de 140pb: heterocigota CG.

Los fragmentos de 28pb y 20pb no pudieron visualizarse en el gel de poliacrilamida ya que eran muy pequeños.

TTTCCTGACGTCCATAGATTTATTAAGAATCTGGTATTTTAAACAGTAGGAAATACACA
TAGAAATATCAAATCCAAGTTGTGCTAGACCAGAACTTTTAGAAGACATCCTTAGGAGAG
AGAAAGACTTACAAGAATAAAGTGAGGAAAACACGGAGTTGATGCA**S****AAATCCCCAACATC**
CAACCTC

Figura 33. Secuencia del fragmento amplificado. En negrita y subrayado se marcan las regiones de hibridación de los oligonucleótidos. S: C ó G. Se resaltan en gris los sitios de restricción de la enzima.

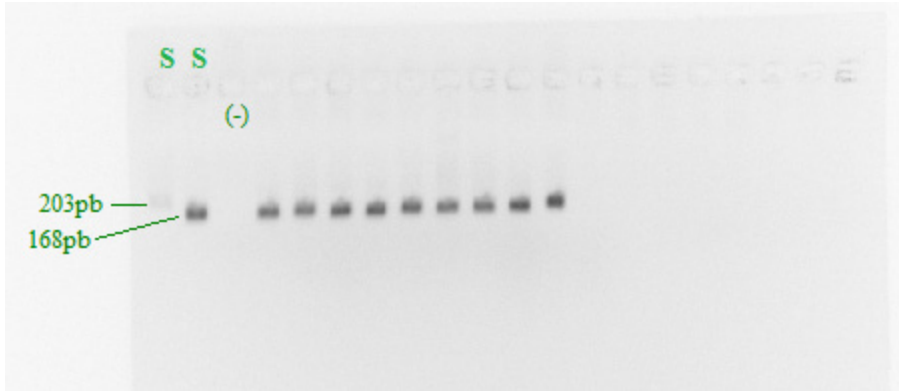


Figura 34. Electroforesis en gel de agarosa de rs16891982. (-): Control negativo. S: Control de tamaño.

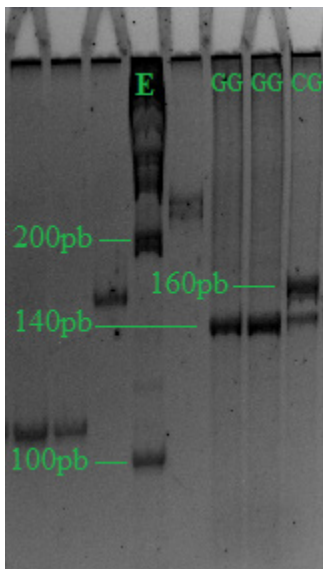


Figura 35. Electroforesis en gel de poliacrilamida de rs16891982. E: Escalera 100pb.

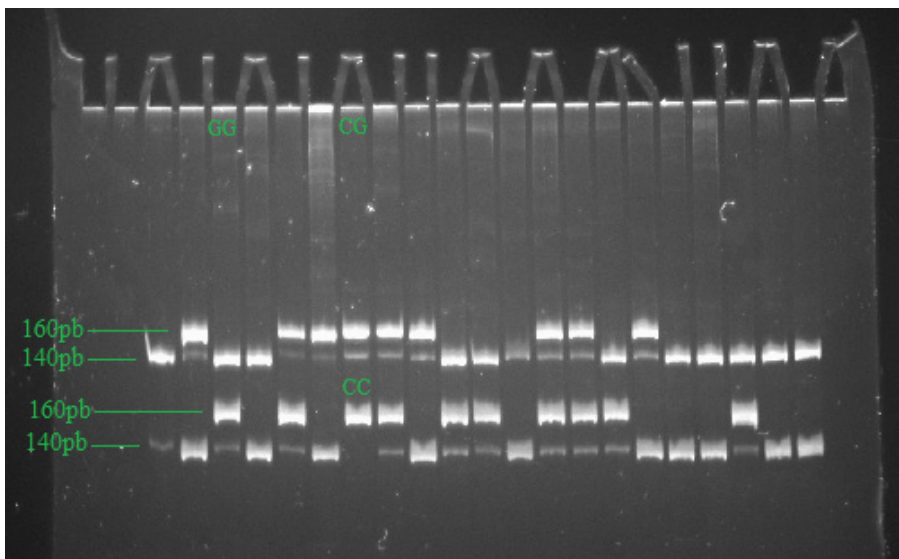


Figura 36. Electroforesis en gel de poliacrilamida de rs16891982. Doble siembra.

Frecuencias alélicas y genotípicas

En la población analizada se obtuvieron las siguientes frecuencias alélicas y genotípicas para este marcador (tablas 9 y 10, figuras 37 y 38).

Alelo	Ojos azules (n=23)	Ojos marrones (n=91)	Frecuencia poblacional (n=114)
C	0,15217±0,05296	0,20879± 0,03013	0,19737± 0,02636
G	0,84783±0,05296	0,79121± 0,03013	0,80263± 0,02636

Tabla 9. Frecuencias alélicas con sus desvíos estándar para rs16891982. n: tamaño muestral.

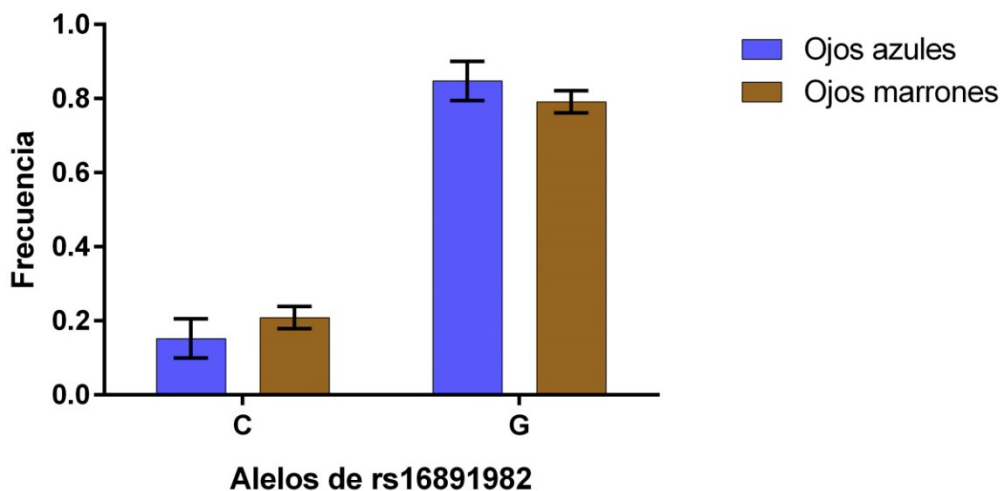


Figura 37. Gráfico de barras de las frecuencias alélicas para rs16891982.

Genotipo	Ojos azules (n=23)	Ojos marrones (n=91)	Frecuencia poblacional (n=114)
CC	0,00000±0,00000	0,04396±0,02149	0,03509±0,01723
CG	0,30435±0,09594	0,32967±0,04928	0,32456±0,04385
GG	0,69565±0,09594	0,62637±0,05071	0,64035±0,04495

Tabla 10. Frecuencias genotípicas con sus desvíos estándar para rs16891982. n: tamaño muestral.

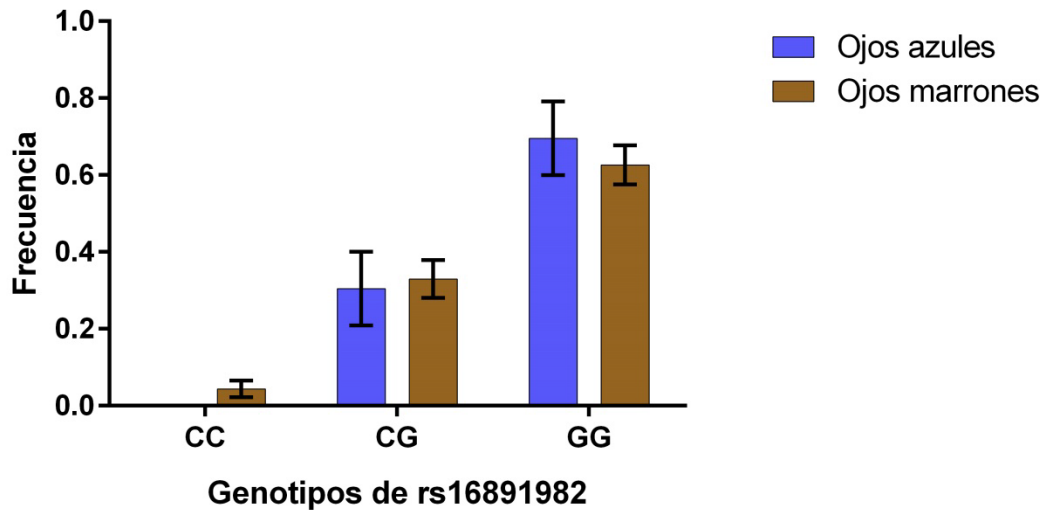


Figura 38. Gráfico de barras de las frecuencias genotípicas para rs16891982.

Estos datos no muestran una relación de los alelos ni de los genotipos de este marcador con los colores de ojos. Puede verse una leve tendencia del genotipo homocigota G a estar más presente en los individuos con color de ojos azul. Se observa una frecuencia muy baja del alelo C, lo cual se ve reflejado en la frecuencia genotípica de homocigotas C y heterocigotas. Para este marcador, la heterocigosis esperada en la población bonaerense fue de 0,31822 y la heterocigosis observada fue de 0,32456 (tabla 13). Este marcador se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=1,00000\pm 0,00000$) (tabla 13).

rs1393350

Los resultados de cada individuo para este marcador se determinaron como presencia o ausencia de la banda de 168pb para cada alelo (figuras 39 y 40).

CAGTCCCTTCTCTGCAACRAATTCTGTGTGGTCTTTTACAAATGATAATCTGTTCGTGTTA
 TCATTCACCTTCCCAGATACAAACAGTGACTTTCTGTTAGGAAAAAACACAAATCTCCCT
 AACATGGCCTCTGCTACCCTTCATGATTTGGCCTCAGTTCACCTTC

Figura 39. Secuencia del fragmento amplificado. En negrita y subrayado se marcan las regiones de hibridación de los oligonucleótidos sin incluir la base cambiada en los *forward*. R: A ó G

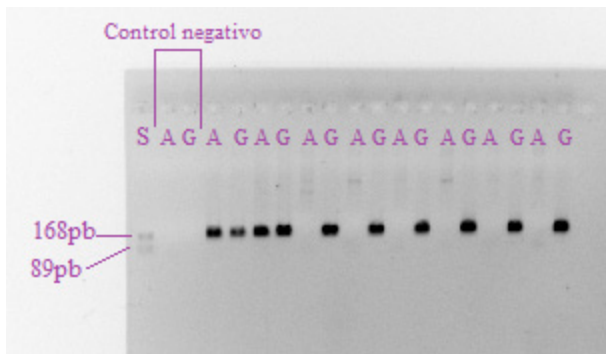


Figura 40. Electroforesis en gel de agarosa de rs1393350. S: Control de tamaño.

Frecuencias alélicas y genotípicas

En la población analizada se obtuvieron las siguientes frecuencias alélicas y genotípicas para este marcador (tablas 11 y 12, figuras 41 y 42).

Alelos	Ojos azules (n=23)	Ojos marrones (n=91)	Frecuencia poblacional (n=114)
A	0,32609±0,06912	0,20879±0,03013	0,23246±0,02797
G	0,67391±0,06912	0,79121±0,03013	0,76754±0,02797

Tabla 11. Frecuencias alélicas con sus desvíos estándar para rs1393350. n: tamaño muestral.

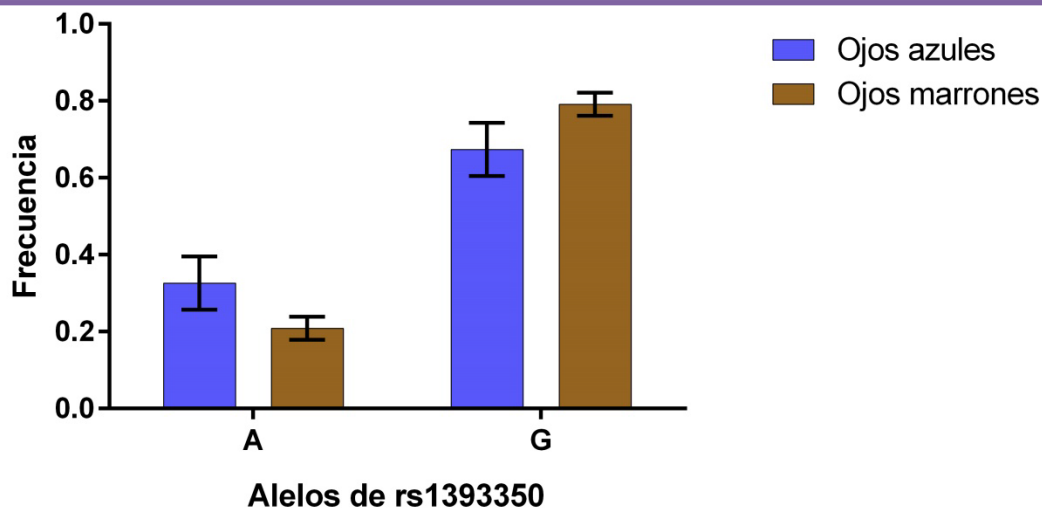


Figura 41. Gráfico de barras de las frecuencias alélicas para rs1393350.

Genotipo	Ojos azules (n=23)	Ojos marrones (n=91)	Frecuencia poblacional
----------	--------------------	----------------------	------------------------

			(n=114)
AA	0,08696±0,05875	0,07692±0,02793	0,07895±0,02526
AG	0,47826±0,10416	0,26374±0,04619	0,30702±0,04320
GG	0,43478±0,10337	0,65934±0,04968	0,61403±0,04560

Tabla 12. Frecuencias genotípicas con sus desvíos estándar para rs1393350. n: tamaño muestral.

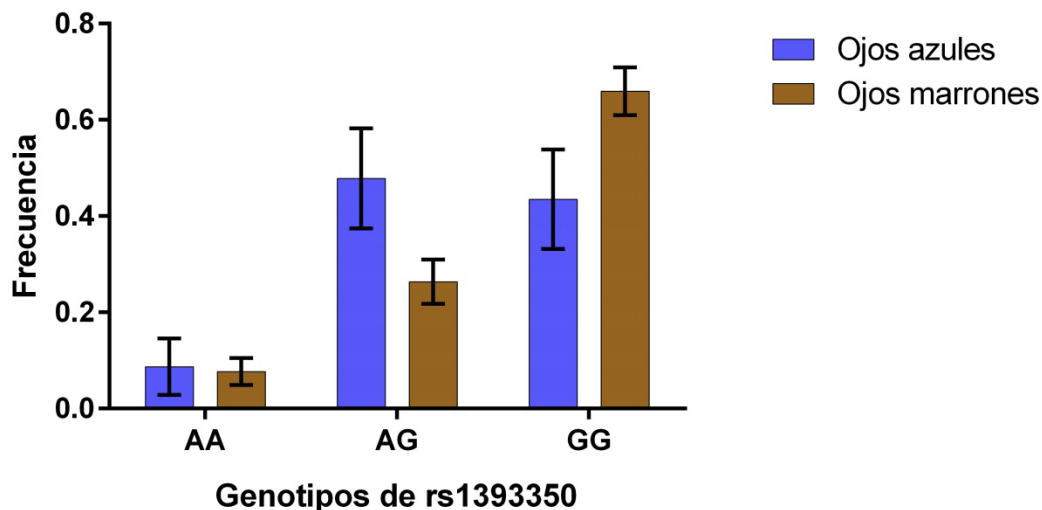


Figura 42. Gráfico de barras de las frecuencias genotípicas para rs1393350.

Las frecuencias alélicas de este marcador permiten definir una relación con el color de los ojos, ya que el alelo A es más frecuente en los individuos de ojos azules y el alelo G lo es en los de ojos marrones. Puede observarse también una relación entre los genotipos y este fenotipo, debido a que es más frecuente el homocigota G en el caso de los ojos marrones y el heterocigota en los individuos de ojos azules. La frecuencia de homocigotas A es baja para ambos fenotipos.

Para este marcador, la heterocigosis esperada en la población bonaerense fue de 0,35841 y la heterocigosis observada fue de 0,30702 (tabla13).

Este marcador se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=0,18646\pm0,00041$) (tabla13).

Resultados para todos los marcadores

La diversidad nucleotídica fue de $0,330615\pm0,228683$.

Se observó una asociación alélica significativa entre los polimorfismos rs16891982 y rs1393350.

La heterocigosis media esperada fue de $33,35\%\pm35,74\%$, teniendo en cuenta los cinco marcadores en conjunto.

La heterocigosis media observada fue de 31,78%±0,008% teniendo en cuenta todos los marcadores.

Fis

Se calcularon los valores de Fis (tabla 13) con la fórmula descripta. Con Arlequín se obtuvo un valor de Fis general de la población igual a 0,08069 con un valor P de 0,052786.

Marcador (<i>GEN</i>)	Ho	He	Valor P	Fis
rs12913832 (<i>HERC2</i>)	0,42609	0,4838	0,24266±0,00040	0,11928483
rs12203592 (<i>IRF4</i>)	0,13913	0,17376	0,06264±0,00025	0,19929788
rs12896399(<i>SLC24A4</i>)	0,39216	0,44663	0,26476±0,00044	0,12195777
rs16891982(<i>SLC45A2</i>)	0,32456	0,31822	1,00000±0,00000	-0,01992332
rs1393350 (<i>TYR</i>)	0,30702	0,35841	0,18646±0,00041	0,14338328

Tabla 13. Valores de heterocigosis observada (Ho) y esperada (He), ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg (P) y valores de Fis de la población bonaerense para cada marcador.

Relación entre el color del iris y el sexo

Del total de individuos:

- 52 son mujeres con ojos marrones
- 16 son mujeres con ojos azules
- 40 son hombres con ojos marrones
- 7 son hombres con ojos azules.

Aplicando un Chi-cuadrado con corrección de Yates para estos datos, el resultado es de 0,811 con un p=0,367, no significativo, es decir que no puede afirmarse que hay una asociación entre el sexo de los individuos y el color del iris.

Comparación entre poblaciones

Heterocigosis esperada

Locus	Buenos Aires	África	América	Asia del Este	Europa	Media	Heterocigosis total
HERC2	0,48380	0,00000	0,20138	0,01728	0,50111	0,24401± 0,21755	0,30867
IRF4	0,17376	0,00000	0,00000	0,00435	0,15236	0,05771± 0,08209	0,05771
SLC24A4	0,44663	0,04805	0,37409	0,41196	0,44666	0,35648 ± 0,15349	0,39153
SLC45A2	0,31822	0,00000	0,10708	0,07134	0,23058	0,18320 ± 0,14696	0,37317

TYR	0,35841	0,01951	0,00000	0,01728	0,40582	0,15643± 0,18217	0,18067
-----	---------	---------	---------	---------	---------	---------------------	---------

Tabla 14. Heterocigosis esperada y heterocigosis media con su respectiva desviación estándar. Exceptuando los resultados de Buenos Aires, los datos pertenecen a Walsh, Liu *et al.* (2011).

AMOVA

Al comparar la población de Buenos Aires con otras poblaciones del mundo (Walsh, Liu, *et al.*, 2011), se obtuvieron los siguientes resultados según el agrupamiento dado.

Grupo 1: Buenos Aires, América y Europa (tabla 15).

Grupo 2: Buenos Aires y Europa (tabla 16).

Grupo 3: Buenos Aires y América (tabla 17).

Fuente de la variación	d.f.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	1	79,232	0,07258	7,92
Entre poblaciones dentro de los grupos	2	114,002	0,26225	28,63
Dentro de las poblaciones	874	507,956	0,58118	63,45
Total	877	701,189	0,91601	100

Tabla 15. Resultados del AMOVA para el grupo 1 comparado con África. $p=0,3596$

variación	d.f.	cuadrados	varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	1	54,250	0,06817	6,55
Entre poblaciones dentro de los grupos	1	59,751	0,22596	21,71
Dentro de las poblaciones	671	501,098	0,74679	71,74
Total	673	615,099	1,04093	100

Tabla 16. Resultados del AMOVA para el grupo 2 comparado con América. $p=0,5150$

Fuente de la variación	d.f.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	1	98,381	0,22816	21,53

Entre poblaciones dentro de los grupos	1	15,621	0,08471	7,99
Dentro de las poblaciones	671	501,098	0,74679	70,47
Total	673	615,099	1,05966	100

Tabla 17. Resultados del AMOVA para el grupo 3 comparado con Europa.
p= 0,2414

Los resultados de la tabla 15 se obtuvieron al comparar el grupo 1 con la población africana, siendo esta última filogenéticamente distante (y, por ende, muy distinta) de las poblaciones americana, europea y bonaerense por ser una más antigua.

Los resultados de la tabla 16 se obtuvieron al comparar el grupo 2 con la población americana. Se ve una disminución del porcentaje de variación entre grupos respecto a los datos de la tabla 15.

Los resultados de la tabla 17 se obtuvieron al comparar el grupo 3 con la población europea. Se ve un aumento en el porcentaje de la variación entre grupos respecto a los datos de la tabla 16.

Como se indica en las leyendas de las tablas, los valores de AMOVA no fueron significativos ($p > 0,05$).

Fst

Los valores de Fst se muestran en la tabla 18. De acuerdo con los resultados obtenidos, la población bonaerense se diferencia claramente de otras poblaciones del mundo en la variación de los polimorfismos analizados.

	Buenos Aires	África	América	Europa	Asia del Este
Buenos Aires	0,00000 p=0,00000				
África	0,28325 p=0,00000	0,00000 p=0,00000			
América	0,11629 p=0,00000	0,16536 p=0,00000	0,00000 p=0,00000		
Europa	0,20880 p=0,00000	0,52826 p=0,00000	0,39329 p=0,00000	0,00000 p=0,00000	
Asia del Este	0,21005 p=0,00000	0,15482 p=0,00000	0,01842 p=0,01802	0,50612 p=0,00000	0,00000 p=0,00000

Tabla 18. Valores de Fst entre distintas poblaciones del mundo, con sus respectivos valores p. Cuando $p < 0,05$, el valor de Fst es significativo. Exceptuando los resultados de Buenos Aires (este trabajo), los datos pertenecen a Walsh, Liu *et al.* (2011).

Prueba de asociación alélica

Se han inferido una serie de asociaciones entre alelos para la muestra estudiada (tabla 19). Además, se muestran los resultados para la población africana (tabla 20) y americana (tabla 21), obtenidos a partir de los datos de Walsh, Liu *et al.* (2011).

Nombre	Frecuencia	Desviación estándar	Alelos asociados
1	0,063617	0,000000	ACGCG
2	0,058522	0,000000	ACGGA
3	0,221237	0,000000	ACGGG
4	0,009030	0,000000	ACTCA
5	0,036569	0,000000	ACTCG
6	0,022967	0,000000	ACTGA
7	0,065549	0,000000	ACTGG
8	0,009768	0,000000	ATGCG
9	0,030399	0,000000	ATGGG
10	0,009976	0,000000	ATTGA
11	0,002799	0,000000	ATTGG
12	0,053125	0,000000	GCGCG
13	0,033969	0,000000	GCGGA
14	0,110168	0,000000	GCGGG
15	0,031739	0,000000	GCTGA
16	0,080463	0,000000	GCTGG
17	0,006151	0,000000	GTGCA
18	0,018950	0,000000	GTTGA
19	0,013261	0,000000	GTTGG

Tabla 19. Asociaciones de alelos inferidas para la población bonaerense, sus frecuencias y desvío estándar.

Nombre	Frecuencia	Desviación estándar	Alelos asociados
A	0,975490	0,000000	ACGGG
B	0,009804	0,000000	ACTGA
C	0,014706	0,000000	ACTGG

Tabla 20. Asociaciones de alelos inferidas para la población africana, sus frecuencias y desviación estándar a partir de datos pertenecientes a Walsh, Liu *et al.* (2011).

Nombre	Frecuencia	Desviación estándar	Alelos asociados
I	0,045963	0,000000	ACGCA

II	0,226632	0,000000	ACGCG
III	0,056713	0,000000	ACGGG
IV	0,044880	0,000000	ACTCA
V	0,025234	0,000000	ACTCG
VI	0,014679	0,000000	ACTGA
VII	0,022959	0,000000	ACTGG
VIII	0,011934	0,000000	ATGCA
IX	0,019885	0,000000	ATGCG
X	0,005086	0,000000	ATGGA
XI	0,001262	0,000000	ATTCA
XII	0,004905	0,000000	ATTCG
XIII	0,003311	0,000000	ATTGG
XIV	0,086565	0,000000	GCGCA
XV	0,164869	0,000000	GCGCG
XVI	0,003830	0,000000	GCGGA
XVII	0,019836	0,000000	GCGGG
XVIII	0,055109	0,000000	GCTCA
XIX	0,143914	0,000000	GCTCG
XX	0,006035	0,000000	GCTGG
XXI	0,024250	0,000000	GTGCG
XXII	0,012148	0,000000	GTTC A

Tabla 21. Asociaciones de alelos inferidas para la población europea, sus frecuencias y desviación estándar a partir de datos pertenecientes a Walsh, Liu *et al.* (2011).

De las estimaciones realizadas, puede observarse que algunas de las asociaciones halladas se repiten en las poblaciones:

ACGCG 1=II
ACGGG 3=A=III
ACTCA 4=IV
ACTCG 5=V
ACTGA 6=B=VI
ACTGG 7=C=VII
ATGCG 8=IX
ATTGG 11=XIII
GCGCG 12=XV
GCGGA 13=XVI
GCGGG 14= XVII
GCTGG 16=XX

Estructura poblacional y estimación de ancestría (análisis sólo de datos genéticos, no fenotípicos)

Se realizaron varias comparaciones entre poblaciones con el programa Structure, bajo distintos supuestos de ancestría.

a- Análisis suponiendo que los individuos pueden tener ancestría mixta:

a.1- Se compararon las poblaciones africana, americana, europea y bonaerense. Se presenta el gráfico de líneas agrupado por población para K=3 (figura 43), donde se ve una diferenciación de la población bonaerense respecto de las demás.

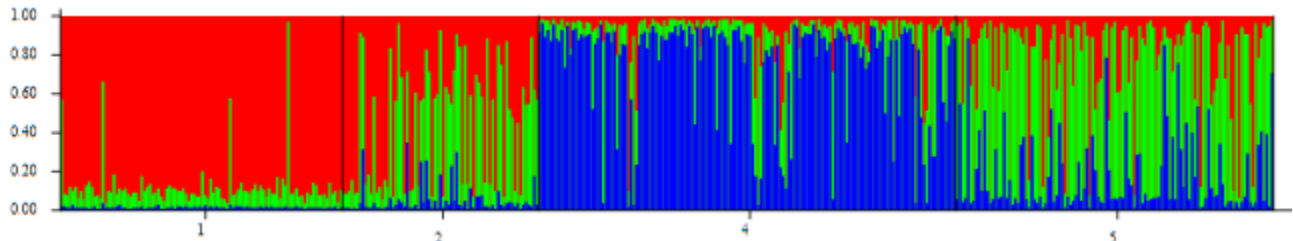


Figura 43. Gráfico de líneas agrupado por población para K=3; individuos con supuesta ancestría mixta. 1: población africana; 2: población americana; 4: población europea; 5: población bonaerense. Los resultados de individuos no bonaerenses se obtuvieron a partir de datos de Walsh, Liu *et al.* (2011).

En el gráfico triangular para K=3 (figura 44) se observan tres agrupamientos o *clusters*, uno de Buenos Aires, otro de Europa y otro de África, mientras que América se presenta más disperso con tendencia a concentrarse más hacia los grupos de Buenos Aires y de África.

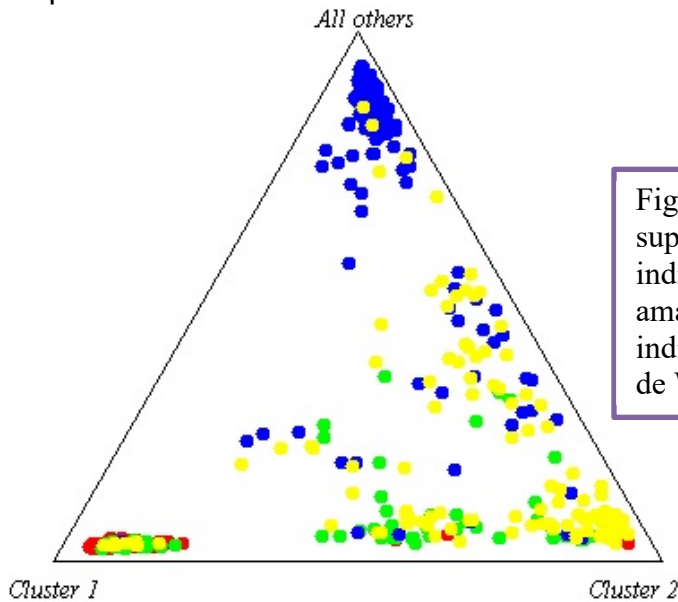


Figura 44. Gráfico triangular para K=3; individuos con supuesta ancestría mixta. Rojo: individuos africanos; verde: individuos americanos; azul: individuos europeos; amarillo: individuos bonaerenses. Los resultados de individuos no bonaerenses se obtuvieron a partir de datos de Walsh, Liu *et al.* (2011).

a.2- Se compararon las poblaciones americana, europea y bonaerense. Se presentan los gráficos de líneas agrupados por población para K=3 y K=4 (figuras 45 y 46), donde puede observarse una diferencia de la población bonaerense respecto a las demás; en K=4 se denota una gran mezcla de ancestrías en nuestra población.

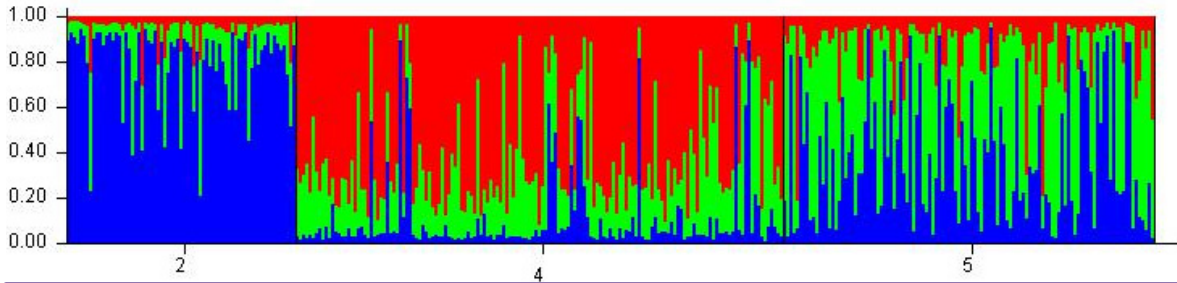


Figura 45. Gráfico de líneas agrupado por población para $K=3$; individuos con supuesta ancestría mixta. 2: población americana; 4: población europea; 5: población bonaerense. Los resultados de individuos no bonaerenses se obtuvieron a partir de datos de Walsh, Liu *et al.* (2011).

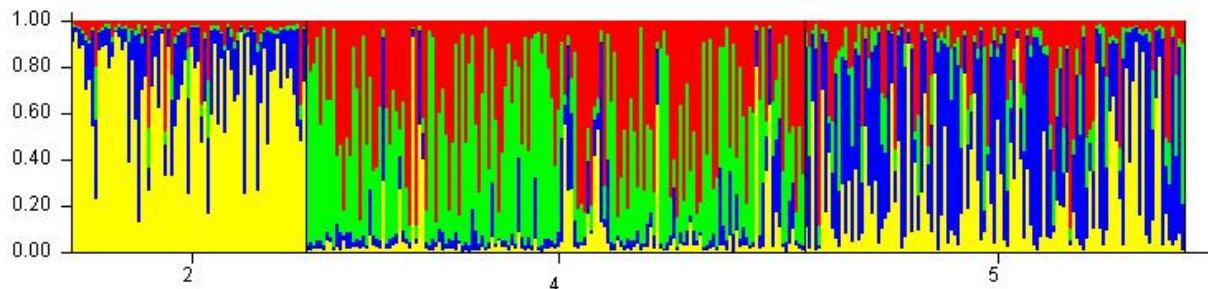


Figura 46. Gráfico de líneas agrupado por población para $K=4$; individuos con supuesta ancestría mixta. 2: población americana; 4: población europea; 5: población bonaerense. Los resultados de individuos no bonaerenses se obtuvieron a partir de datos de Walsh, Liu *et al.* (2011).

En el gráfico triangular para $K=3$ se ve una superposición entre la población americana y la bonaerense (figura 47) mientras que la población europea se encuentra formando un *cluster* más definido.

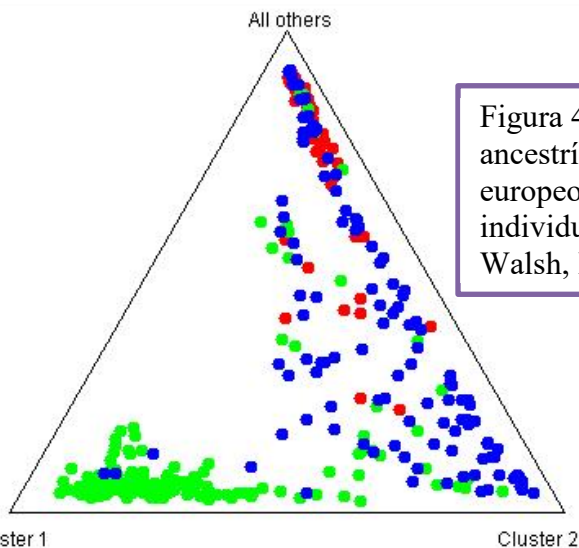


Figura 47. Gráfico triangular para $K=3$; individuos con supuesta ancestría mixta. Rojo: individuos americanos; verde: individuos europeos; azul: individuos bonaerenses. Los resultados de individuos no bonaerenses se obtuvieron a partir de datos de Walsh, Liu *et al.* (2011).

b- Análisis suponiendo que los individuos pertenecen a una población o a otra y no hay flujo génico -transferencia de genes- entre ellas.

b.1- Se compararon las poblaciones africana, americana, europea y bonaerense. Se presenta el gráfico de líneas agrupado por población para K=3 (figura 48), donde se ve una importante diferenciación de la población bonaerense respecto de las demás.

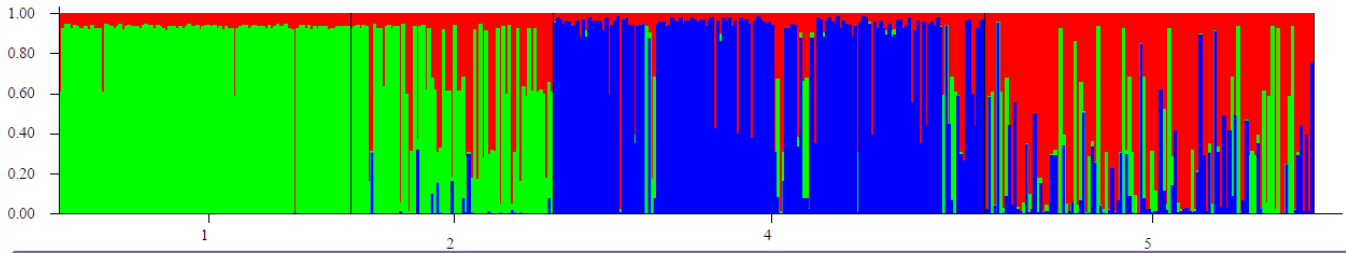


Figura 48. Gráfico de líneas agrupado por población para K=3; individuos sin ancestría mixta supuesta. 1: población africana; 2: población americana; 4: población europea; 5: población bonaerense. Los resultados de individuos no bonaerenses se obtuvieron a partir de datos de Walsh, Liu *et al.* (2011).

En el gráfico triangular para K=3 se observa una superposición entre América y Buenos Aires, y una diferenciación importante entre Buenos Aires y Europa (figura 49).

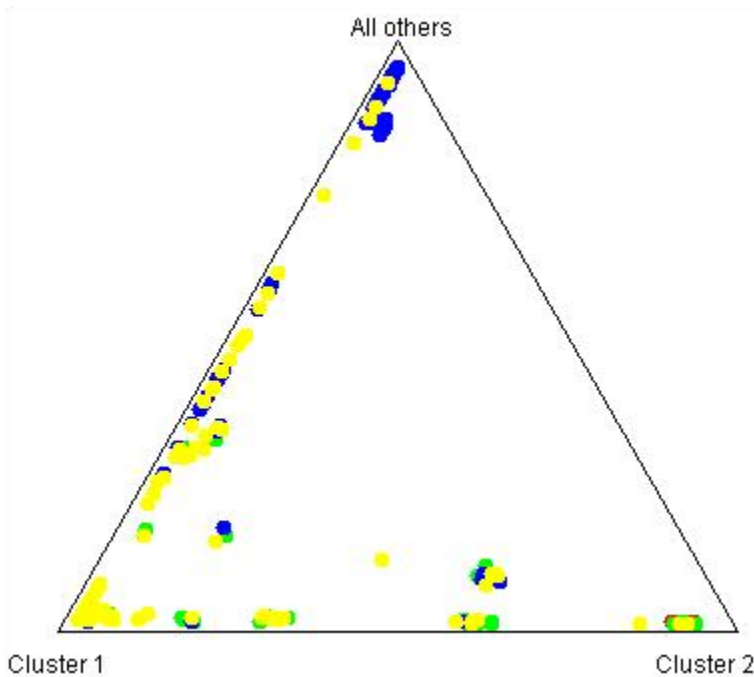


Figura 49. Gráfico triangular para K=3; individuos sin ancestría mixta supuesta. Rojo: individuos africanos; verde: individuos americanos; azul: individuos europeos; amarillo: individuos bonaerenses. Los resultados de individuos no bonaerenses se obtuvieron a partir de datos de Walsh, Liu *et al.* (2011).

b.2- Se compararon las poblaciones americana, europea y bonaerense. En los gráficos de líneas agrupados por población para K=3 y K=4 (figuras 50 y 51) se ve una diferencia de la

población bonaerense respecto a las demás; en K=4 se denota una gran mezcla de ancestrías en nuestra población.

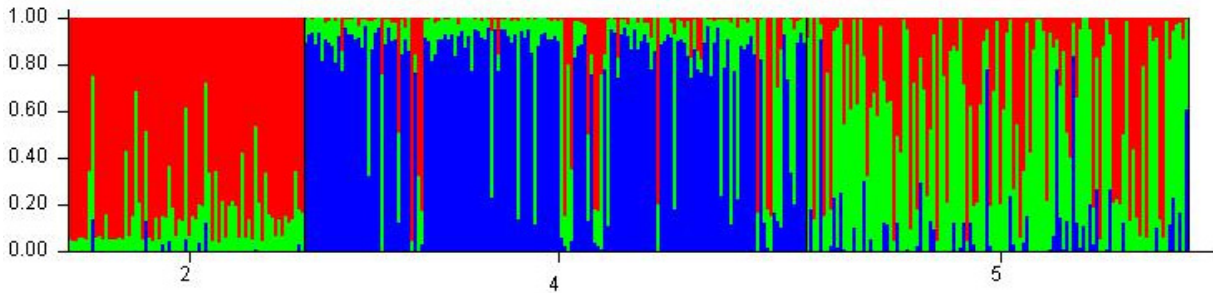


Figura 50. Gráfico de líneas agrupado por población para K=3; individuos sin ancestría mixta supuesta. 2: población americana; 4: población europea; 5: población bonaerense. Los resultados de individuos no bonaerenses se obtuvieron a partir de datos de Walsh, Liu *et al.* (2011).

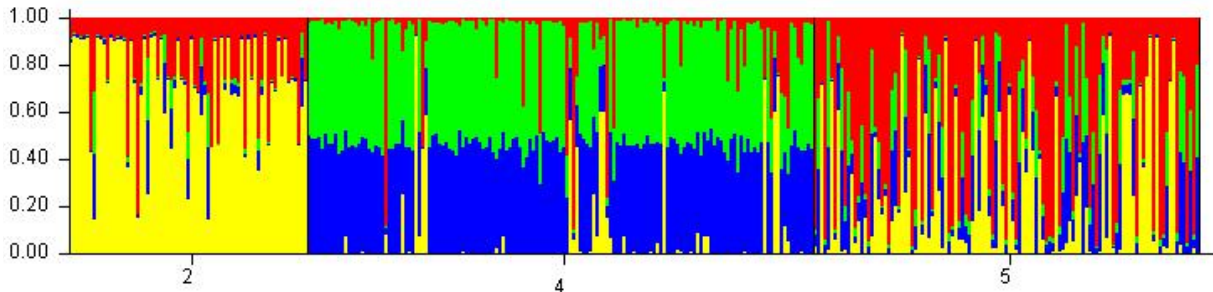


Figura 51. Gráfico de líneas agrupado por población para K=4; individuos sin ancestría mixta supuesta. 2: población americana; 4: población europea; 5: población bonaerense. Los resultados de individuos no bonaerenses se obtuvieron a partir de datos de Walsh, Liu *et al.* (2011).

En el gráfico triangular para K=3 se ve una superposición entre la población americana y la bonaerense (figura 52). A su vez, se observa a la población europea agrupada y muy separada de las demás.

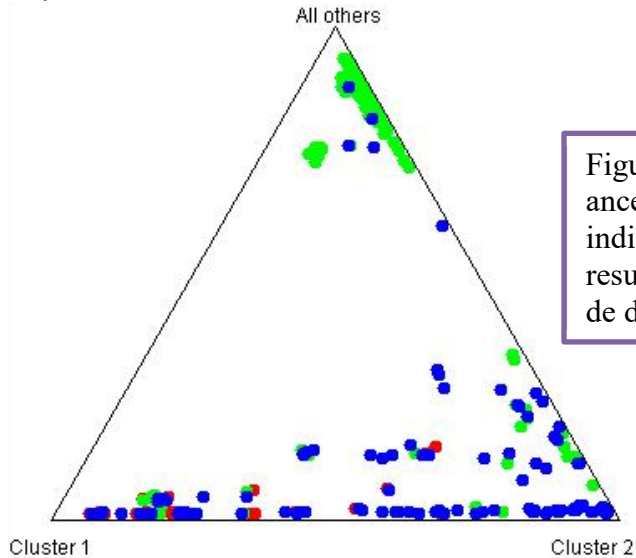


Figura 52. Gráfico triangular para K=3; individuos sin ancestría mixta supuesta. Rojo: individuos americanos; verde: individuos europeos; azul: individuos bonaerenses. Los resultados de individuos no bonaerenses se obtuvieron a partir de datos de Walsh, Liu *et al.* (2011).

Discusión

El color de los ojos es un carácter poligénico, lo que hace que la determinación de este fenotipo a partir del genotipo requiera del análisis de varios genes. Respecto a esto, en este estudio se analizaron cinco polimorfismos ubicados en distintos genes que han sido relacionados al color de los ojos por varios autores y que ya se han analizados en otras poblaciones distintas a la estudiada en este trabajo. De hecho, no hay estudios realizados en nuestro país sobre la relación entre el genotipo y esta característica fenotípica. Resulta importante este tipo de análisis para conocer la diferencia entre las frecuencias alélicas y genotípicas de los marcadores entre poblaciones, la posibilidad o no de aplicar los mismos criterios en la predicción del color del iris en distintas poblaciones a partir de datos genotípicos, la relevancia de los marcadores incluidos en su relación con el color del iris en el grupo estudiado, entre otras cuestiones.

Los cinco polimorfismos analizados en este trabajo (rs12913832, rs12896399, rs12203592, rs16891982 y rs1393350) se encuentran dentro de los primeros seis marcadores más importantes para la predicción del color del iris de un individuo a partir de datos genotípicos (Ruiz *et al.*, 2013).

Respecto al polimorfismo rs12913832 ubicado en el intrón 86 del gen *HERC2*, encontramos en la población bonaerense que el alelo A es más frecuente en individuos de ojos marrones y el alelo G en individuos de ojos azules, lo que se corresponde con los resultados de otras poblaciones, donde resultó estar asociado el alelo A a los ojos no azules y el alelo G a ojos no marrones (Beleza *et al.*, 2013; Sturm *et al.*, 2008; Sturm y Duffy, 2012; Liu *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2013; Hart *et al.*, 2013; Wilde *et al.*, 2014; Draus-Barini *et al.*, 2013; Valenzuela *et al.*, 2010; Lim y Oh, 2013; Kastelic *et al.*, 2013; Kastelic y Drobnič, 2012; Walsh, Lindenbergh *et al.*, 2011; Walsh, Liu *et al.*, 2011; Walsh *et al.* 2012; Eiberg *et al.*, 2008; Nan *et al.*, 2009; Mengel-From *et al.*, 2009; Spichenok *et al.*, 2011).

El alelo G resultó ser menos frecuente en nuestra población que en la población europea (frecuencia de 0,79 según Beleza *et al.* 2013, 0,71 según Wilde *et al.* 2014). Esto puede deberse a la variada composición étnica de la población bonaerense, ya que en la población africana este alelo no está presente (frecuencia igual a 0) según estos mismos autores. El genotipo homocigota G asociado a los ojos azules y el heterocigota, están casi exclusivamente restringidos a Europa y Asia Occidental, donde se espera que el color del iris sea principalmente azul e intermedio. Por otro lado, el genotipo homocigota A asociado a los ojos marrones se observa en todos los lugares del mundo y es casi el único presente en Oceanía, Asia Oriental y África sub-Sahariana, donde se espera que la población tenga color

de ojos marrón en su mayoría (Walsh, Liu, *et al.* 2011). En nuestra población las frecuencias más altas fueron para el genotipo homocigota A y el heterocigota, ya que hay una mayor presencia de color de ojos marrón. Sin embargo se observa una frecuencia significativa del genotipo homocigota G ya que el color azul también está presente debido al aporte migratorio desde otras partes del mundo, principalmente Europa. Debemos tener en cuenta que en la población analizada el número de individuos con ojos azules es menor que el de individuos de ojos marrones.

Respecto al polimorfismo rs12203592 del gen *IRF4*, se ha encontrado una asociación del alelo T con el color de ojos azul (Praetorius *et al.*, 2013). En este trabajo no se encontró una relación clara debido a la baja frecuencia del alelo T en la muestra, a pesar de denotarse una leve tendencia.

Según Walsh *et al.* (2012), el genotipo CC se asocia al color marrón y el genotipo homocigota T es más frecuente en los individuos de ojos azules. Nuevamente, en nuestra población no hemos visto esta relación, sino una tendencia leve del homocigota C a estar más presente en los casos de ojos marrones y del heterocigota en encontrarse más frecuentemente en los individuos de ojos azules.

La frecuencia global del alelo T es de 0,0367, menor que en nuestra población.

En un estudio realizado con seis poblaciones europeas (Ruiz *et al.*, 2013), este marcador no fue considerado un buen predictor del color de los ojos, debido a la baja frecuencia del alelo derivado. Esto pone en evidencia la importancia de examinar cada población en particular a la hora de utilizar los marcadores estudiados como base de la predicción del color del iris de los individuos, principalmente cuando no se trata de polimorfismos con una asociación alélica o genotípica muy marcada con dicho fenotipo.

En nuestros resultados se observó una caída de la heterocigosis observada respecto de la esperada para este marcador; a ello se debe el valor P bajo en el análisis de Hardy-Weinberg.

El polimorfismo rs12896399 de *SLC24A4* muestra una frecuencia levemente mayor del alelo G en individuos con ojos marrones y del alelo T en aquellos de ojos azules, tal como se ha visto en otros trabajos (Hart *et al.*, 2013; Sulem *et al.*, 2007; Martínez-Cadenas *et al.*, 2013). A su vez, el genotipo heterocigota se mostró más frecuente en el caso de los ojos marrones, mientras que el homocigota T se vio más en los ojos azules. Sin embargo, el genotipo homocigota G no presentó diferencia entre su frecuencia respecto de un color o el otro. Este polimorfismo presenta, en Europa, una frecuencia del alelo T de 0,57 según Lim y Oh (2013) o 0,60 según Sulem *et al.* (2007), y una frecuencia global mucho más baja, de 0,2608. En la población española el alelo G es el más común, con una frecuencia de 0,66 (Martínez-Cadenas *et al.*, 2013). En nuestra población, el alelo G resultó el más frecuente, como en la población española. El alelo T en la población bonaerense tiene una frecuencia similar a la global previamente informada. Esto puede deberse a la diversidad de nuestra población.

El polimorfismo rs16891982 perteneciente al gen *SLC45A2* tiene una frecuencia de 0,97 para el alelo G en Europa (Wilde *et al.* 2014). En la población bonaerense se encontró una frecuencia muy alta de este alelo respecto al alelo C. Esto puede explicarse por el aporte genético europeo en nuestra población. A su vez, varios autores lo asociaron a la baja pigmentación (Walsh *et al.* 2012, Wilde *et al.* 2014), lo cual se observa sólo como una tendencia en los resultados obtenidos en este trabajo.

El genotipo homocigota G asociado al color de ojos azul es más frecuente en Europa y Asia Occidental (Walsh, Liu, *et al.* 2011), el homocigota C puede observarse más comúnmente en el resto del mundo, y el heterocigota se encuentra en baja frecuencia según Walsh *et al.* (2011). En nuestra población, la frecuencia del genotipo homocigota G es muy alta y tendiente a estar más presente en los individuos de ojos azules.

Para el polimorfismo rs1393350 del gen *TYR* se observó en nuestra población una alta frecuencia del genotipo homocigota G en individuos con ojos de color marrón, tal como se ha visto en otras poblaciones (Walsh *et al.*, 2012). Sin embargo, los mismos autores han encontrado asociación del genotipo homocigota A con el color de ojos azul, mientras que en este estudio esa relación se da con el genotipo heterocigota. Esto puede deberse a una baja frecuencia del alelo A en nuestra muestra, además de un bajo número de individuos de ojos azules.

La frecuencia global del alelo A es de 0,0793, mucho menor que en nuestra muestra; esto puede deberse a la presencia de componente europeo en nuestra población.

Es importante aclarar que el color del iris depende en parte de las propiedades de absorción y reflexión de la luz de los componentes extracelulares en el estroma del iris (Prota *et al.*, 1998), siendo esto una posible explicación a la relación poco clara de ciertos polimorfismos con el color de los ojos. Además, en este trabajo no se clasificaron los ojos de color verde como categoría “intermedia”, pudiendo esto ser un factor que causa discrepancias con los resultados de algunos autores.

La diversidad nucleotídica presenta una desviación estándar alta porque cada sitio presenta sólo 2 alelos, es decir, son polimorfismos bialélicos.

Se esperaba que no hubiese asociación alélica importante entre los polimorfismos ya que los genes en cuestión se encuentran en cromosomas diferentes. La asociación encontrada entre rs16891982 y rs1393350 podría explicarse por la historia migratoria de nuestra población o, de lo contrario, deberse a un tamaño muestral bajo.

Todos los marcadores se ajustaron al equilibrio de Hardy-Weinberg, demostrando de esta forma que en la población actual de Buenos Aires podría descartarse la ocurrencia de procesos importantes de deriva, selección, migración y endogamia. De hecho, los valores de Fis obtenidos para los marcadores indican que la población no presenta endogamia. En el caso del marcador rs12203592 el valor de Fis de casi 20% se debería a la baja frecuencia del alelo T para este marcador y no a un proceso de endogamia.

Al comparar las posibles combinaciones de alelos en nuestra población con datos de otras (Walsh, Liu *et al.*, 2011), encontramos que 12 de las 19 combinaciones presentes en Buenos Aires también se encuentran en Europa. Esto podría explicarse por una subestructura de nuestra población, aunque las migraciones masivas desde el continente europeo no son recientes. A su vez, se observan sólo 3 combinaciones posibles en África debido a la baja diversidad fenotípica de la población para el color de ojos. En nuestra población encontramos 19 combinaciones, lo que demuestra una diversidad importante en la población bonaerense. De hecho, el valor de heterocigosis media en bonaerenses deja ver la variación presente en dicha población, siendo el valor muy similar al obtenido para la población europea.

A diferencia de otros estudios (Martínez-Cadenas *et al.*, 2013, 2014), en esta población no se encontró asociación entre el sexo de los individuos y el color del iris. Por el contrario, este resultado concuerda con el presentado por Liu *et al.* (2014).

Las conclusiones que se obtienen a partir del análisis de Fst y Amova se condicen; la población bonaerense analizada es genotípicamente distinta a otras poblaciones del mundo, reafirmando así la importancia de estudiar estos genes en nuestra población, para su aplicación en la identificación de personas en base al color del iris.

En las comparaciones entre poblaciones, la de Buenos Aires resultó más semejante a la población de otros países americanos y en segundo lugar a la población europea. Estos resultados pueden explicarse por los movimientos migratorios transoceánicos ocurridos hasta mitad del siglo XIX y aquellos más recientes desde países limítrofes, como se ha mencionado previamente. Sin embargo, se esperaría que la población bonaerense con la americana fuesen más similares; el resultado obtenido puede deberse a que los autores tomaron datos de Brasil, México y Colombia, países donde hay una menor frecuencia de ojos de color azul que en la provincia de Buenos Aires. Lo mismo se esperaría al comparar con Europa; lo que se obtuvo puede explicarse porque en nuestra población hay aporte nativo y de países limítrofes, además de un posible componente migratorio diferencial, contribuyendo a una tasa de color de ojos marrones mayor a la europea debido al país europeo de origen en este último caso, influyendo esto en las frecuencias alélicas de la población.

La diferenciación hallada entre poblaciones, aún ensayando distintos agrupamientos, se condice con el hecho de que estos marcadores se relacionan a un fenotipo con un importante valor adaptativo regional. Particularmente, el porcentaje de variación entre grupos mostrado en el primer análisis indica una diferencia entre las poblaciones presentadas, debiéndose esto a la distancia filogenética existente entre los grupos que se comparan, que se ve atenuada por el hecho de que la población americana en este análisis proviene de países con alto componente africano. En el segundo análisis se observa una disminución de la variación entre grupos porque no se incluye a la población africana. En el tercer análisis se observa que nuestra población es más similar a la población americana que a la europea, pudiendo deberse al componente nativo que aún se encuentra presente en las poblaciones urbanas de nuestro país.

Los resultados de estructura poblacional y ancestría también indican que nuestra población se diferencia notablemente de poblaciones de distintos lugares del mundo, manteniendo cercanía con las poblaciones americanas. Se evidencia así la importancia de estudiar estos marcadores en la población, no sólo bonaerense sino argentina, ya que se denota una posible influencia del componente nativo, ausente en las poblaciones europeas.

Por lo expuesto anteriormente, los distintos resultados obtenidos son coherentes entre sí en presentar a la población bonaerense con una identidad diferente de la de otras poblaciones del mundo, remarcando aún más la importancia de analizar la variación de estos genes y su relación con el color del iris en nuestra población en particular.

Conclusiones

- Este es el primer aporte que se realiza en Argentina sobre genética poblacional respecto a genes relacionados con el color de los ojos.
- La población bonaerense es muy diversa en la variación de genotipos relacionados con el color del iris; las frecuencias alélicas y genotípicas de estos marcadores responden a la historia migratoria de nuestro país, la miscegenación y el aporte de la población nativa.
- La población bonaerense se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinberg para los polimorfismos analizados.
- Genótipicamente, la población es distinta de las poblaciones del mundo con las que se comparó.
- Las relaciones (o tendencias en algunos casos) de cada alelo y genotipo con cierto color de iris es coherente con las asociaciones vistas en otros trabajos para otras poblaciones.
- En nuestra población se encontró que el marcador más importante en la definición del color del iris es el rs12913832, al igual que en otras poblaciones del mundo.
- El color del iris no se encontró asociado al sexo de los individuos.

Perspectivas

- Es posible que en nuestra población existan polimorfismos que no estén descritos en poblaciones europeas, que puedan provenir del aporte nativo, contribuyendo silenciosamente al acervo genético de nuestro país; estos podrían detectarse por medio de secuenciación, lo que se llevará a cabo en la siguiente etapa de este trabajo.
- Este estudio se completará aumentando el tamaño muestral y el número de marcadores, y se complementará con un análisis exhaustivo de asociación con el color de los ojos.
- Dado que no se ha estudiado anteriormente la relación entre el genotipo y el color del iris en nuestra población, es importante seguir realizando este estudio en individuos de distintas regiones de nuestro país para poder aplicar la predicción en muestras biológicas para identificación de personas.

Bibliografía

- Anderson M. G., Hawes N. L., Trantow C. M., et al. (2008). Iris phenotypes and pigment dispersion caused by genes influencing pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res.*, 21(5):565-578.
- Andrews G. R. (1989). Los afroargentinos de Buenos Aires. Buenos Aires, Ediciones de la Flor.
- Avena S., Goycochea A., Dugoujon J., et al. (2001). Análisis Antropogenético de los Aportes Indígena y Africano en Muestras Hospitalarias de la Ciudad de Buenos Aires. *Rev. Argent. Antropol. Biol.*, 3:79-99.
- Avena S. A., Goicochea A. S., Rey J., et al. (2006). Mezcla génica en una muestra poblacional de la ciudad de Buenos Aires. *MEDICINA (Buenos Aires)*, 66(2):113-118.
- Avena S., Via M., Ziv E., et al. (2012). Heterogeneity in Genetic Admixture across Different Regions of Argentina. *PLoS ONE*, 7(4),e34695.
- Beleza S., Johnson N. A., Candille S. I., et al. (2013). Genetic Architecture of Skin and Eye Color in an African-European Admixed Population. *PLoS Genet*, 9(3):e1003372.
- Corach D., Lao O., Bobillo C., et al. (2010). Inferring Continental Ancestry of Argentineans from Autosomal, Y-Chromosomal and Mitochondrial DNA. *Annals of Human Genetics*, 74:65-76.
- Draus-Barini J., Walsh S., Pośpiech E., et al. (2013). Bona fide colour: DNA prediction of human eye and hair colour from ancient and contemporary skeletal remains. *Investigative Genetics*, 4:3.
- Eiberg H., Troelsen J., Nielsen M., et al. (2008). Blue eye color in humans may be caused by a perfectly associated founder mutation in a regulatory element located within the HERC2 gene inhibiting OCA2 expression. *Hum Genet*, 123:177-187.
- es.wikipedia.org, (2015). *Composición étnica de Argentina*. [online]. Disponible en: https://es.wikipedia.org/wiki/Composici%C3%B3n_%C3%A9tnica_de_Argentina.
- es.wikipedia.org, (2015). *Ley de Hardy-Weinberg*. [online]. Disponible en: https://es.wikipedia.org/wiki/Ley_de_Hardy-Weinberg.
- es.wikipedia.org, (2015). *Melanina*. [online] Disponible en: <https://es.wikipedia.org/wiki/Melanina>.
- es.wikipedia.org, (2015). *Selección Natural*. [online]. Disponible en: https://es.wikipedia.org/wiki/Selecci%C3%B3n_natural.
- Excoffier L., Smouse P. E., Quattro J. M. (1992). Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics*, 131:479-491.
- Fernandes Durso D., Bydlowski S. P., Hutz M. H., et al. (2014). Association of Genetic Variants with Self-Assessed Color Categories in Brazilians. *PLoS ONE*, 9(1): e83926.
- Gaudet M., Fara A. G., Beritognolo I., et al. (2009). Allele-Specific PCR in SNP Genotyping. Single Nucleotide Polymorphisms. *Methods in Molecular Biology*, 578:415-424.
- Gemmel N., Akiyama S. (1996). An efficient method for the extraction of DNA from vertebrate tissues. *Trends in Genetics*, 12(9):338-339.
- Geneser, Finn. (2000). Histología sobre bases biomoleculares, tercera edición. Editorial médica Panamericana.
- Gillespie J. H. (1998). Population Genetics, A Concise Guide. *The Johns Hopkine University Press*.
- Griffiths A. J. F., Miller J. H., Suzuki D. T., et al. (2008). Genética 9a.ed. Madrid. McGraw-Hill Interamericana.

- Hart K., Kimura S., Mushailov V., et al. (2013). Improved eye- and skin-color prediction based on 8 SNPs. *Croat Med J.*, 54:248-56.
- Hedrick P.W. Genetics of populations. 2nd. Edition, Jones and Bartlett Publishers, 2000, 551 pp.
- Kastelic V., Drobnič K. (2012). A single-nucleotide polymorphism (SNP) multiplex system: the association of five SNPs with human eye and hair color in the Slovenian population and comparison using a Bayesian network and logistic regression model. *Croat Med J.*, 53:401-408.
- Kastelic V., Pošpiech E., Draus-Barini J., et al. (2013). Prediction of eye color in the Slovenian population using the IrisPlex SNPs. *Croat Med J.*, 54:381-386.
- Keating B., Bansal A. T., Walsh S., et al. (2013). First all-in-one diagnostic tool for DNA intelligence: genome-wide inference of biogeographic ancestry, appearance, relatedness, and sex with the Identitas v1 Forensic Chip. *Int J Legal Med*, 127:559-572.
- Krebs J., Goldstein E., Kilpatrick, S. (2012). Lewin. Genes: fundamentos. Segunda edición. Editorial Médica Panamericana.
- Librogen.com.ar, (2015). *Poblaciones*. [online]. Disponible en: <http://www.librogen.com.ar/poblaciones.htm>.
- Lim J., Oh B. (2013). Allelic Frequencies of 20 Visible Phenotype Variants in the Korean Population. *Genomics Inform*, 11(2):93-96.
- Liu F., Wollstein A., Hysi P. G., et al. (2010). Digital Quantification of Human Eye Color Highlights Genetic Association of Three New Loci. *PLoS Genet.*, 6(5): e1000934.
- Marino M., Sala A., Corach D. (2007). Genetic attributes of the YHRD minimal haplotype in 10 provinces of Argentina. *Forensic Science International: Genetics* 1:129–133.
- Martínez Marignac V.L., Bravi C. M., Lahitte H.B., et al. (1999). Estudio del ADN mitocondrial de una muestra de la ciudad de La Plata. *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 2(1):281-300.
- Martínez-Cadenas C., Peña-Chilet M., Ibarrola-Villava M., et al. (2013). Gender is a major factor explaining discrepancies in eye colour prediction based on HERC2/OCA2 genotype and the IrisPlex model. *Forensic Science International: Genetics*, 7:453-460.
- Martínez-Cadenas C., Peña-Chilet M., Llorca-Cardenosa M. J., et al. (2014). Gender and eye colour prediction discrepancies: A reply to criticisms. *Letter to the Editor / Forensic Science International: Genetics*, 9:e7-e9.
- Mengel-From J., Wong T. H., Morling N., et al. (2009). Genetic determinants of hair and eye colours in the Scottish and Danish populations. *BMC Genetics*, 10:88.
- Meyer W. K., Zhang S., Hayakawa S., et al. (2013). The Convergent Evolution of Blue Iris Pigmentation in Primates Took Distinct Molecular Paths. *American Journal of Physical Anthropology*, 151:398-407.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., et al. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 51:263-273.
- Nan H., Kraft P., Hunter D., et al. (2009). Genetic variants in pigmentation genes, pigmentary phenotypes, and risk of skin cancer in Caucasians. *Int J Cancer*, 125(4):909-917.
- Ochiai K., Maienschein-Cline M., Simonetti G. et al. (2013). Transcriptional regulation of germinal center B and plasma cell fates by dynamical control of IRF4. *Immunity*, 38(5):918-929.

- Parry D., Poulter J., Logan K., et al. (2013). Identification of Mutations in SLC24A4, Encoding a Potassium-Dependent Sodium/Calcium Exchanger, as a Cause of Amelogenesis Imperfecta. *The American Journal of Human Genetics*, 92:307-312.
- Praetorius C., Grill C., Stacey S.N., et al. (2013). A polymorphism in IRF4 affects human pigmentation through a tyrosinase-dependent MITF/TFAP2A pathway. *Cell*, 155(5):1022-1033.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155:945-959.
- Prota G., Hu D., Vincenzi M. et al. (1998). Characterization of Melanins in Human Irides and Cultured Uveal Melanocytes From Eyes of Different Colors. *Exp. Eye Res.*, 67:293-299.
- Raghavan M., Steinrücken M., Harris K., et al. (2015). POPULATION GENETICS. Genomic evidence for the Pleistocene and recent population history of Native Americans. *Science*, 349(6250).
- Ruiz Y., Phillips C., Gomez-Tato A., et al. (2013). Further development of forensic eye color predictive tests. *Forensic Science International: Genetics*, 7:28-40.
- Schneider S., Roessli D., Excoffier L. (2000). Arlequin: A software for population genetics data analysis. Version 2.000. *Geneva: University of Geneva*.
- Spichenok O., Budimlija Z. M., Mitchell A. A., et al. (2011). Prediction of eye and skin color in diverse populations using seven SNPs. *Forensic Science International: Genetics*, 5:472-478.
- Sturm R.A., Frudakis T.N. (2004). Eye colour: portals into pigmentation genes and ancestry. *TRENDS in Genetics*, 20(8):327-332.
- Sturm R., Duffy D., Zhao Z., et al. (2008) A Single SNP in an Evolutionary Conserved Region within Intron 86 of the HERC2 Gene Determines Human Blue-Brown Eye Color. *The American Journal of Human Genetics*, 82:424-431.
- Sturm R. A., Duffy D. L. (2012). Human pigmentation genes under environmental selection. *Genome Biology*, 13:248.
- Sulem P., Gudbjartsson D. F., Stacey S. N., et al. (2007). Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. *Nature Genetics*, 39(12):1443-1452.
- Sun H.P., Lin Y., Pan C. W. (2014). Iris color and associated pathological ocular complications: a review of epidemiologic studies. *Int J Ophthalmol*, 7(5):872-878.
- Valenzuela R., Henderson M., Walsh M., et al. (2010). Predicting Phenotype from Genotype: Normal Pigmentation. *J Forensic Sci.*, 55(2): 315-322.
- Visser M., Kayser M., Palstra R. (2012). HERC2 rs12913832 modulates human pigmentation by attenuating chromatin-loop formation between a long-range enhancer and the OCA2 promoter. *Genome Research*, 22:446-455.
- Walsh S., Liu F., Ballantyne K., et al. (2011). IrisPlex: A sensitive DNA tool for accurate prediction of blue and brown eye colour in the absence of ancestry information. *Forensic Science International: Genetics* 5:170-180.
- Walsh S., Lindenbergh A., Zuniga S. B., et al. (2011). Developmental validation of the IrisPlex system: Determination of blue and brown iris colour for forensic intelligence. *Forensic Science International: Genetics*, 5:464-471.
- Walsh S., Wollstein A., Liu F., et al. (2012). DNA-based eye colour prediction across Europe with the IrisPlex system. *Forensic Science International: Genetics*, 6:330-340.
- Walsh S., Liu F., Wollstein A., et al. (2013). The HirisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA. *Forensic Science International: Genetics*, 7:98-115

- Wilde S., Timpson A., Kirsanow K., et al. (2014). Direct evidence for positive selection of skin, hair, and eye pigmentation in Europeans during the last 5,000 years. *PNAS*, 111(13):4832-4837.

Anexo

Carta de información para los participantes de

“VARIACIÓN GENÉTICA DEL COLOR DEL IRIS EN LA POBLACIÓN BONAERENSE”

Lo invitamos a participar en una investigación que tiene por objetivo estudiar ciertas regiones de su ADN que son variables entre los individuos de una población.

En las poblaciones humanas los rasgos genéticos se van transmitiendo de una generación a otra. Algunos tienen un efecto visible, como en el color del cabello y los ojos, que se producen a partir de la información genética heredada de los padres. Para analizar esta información, se requieren técnicas de laboratorio.

En el Laboratorio de Genética Molecular del IMBICE (CICPBA/CONICET) utilizamos técnicas de laboratorio molecular para estudiar la variación del color del iris de los ojos. Para ello, le solicitamos su consentimiento para donar dos muestras de saliva.

Su participación no implica riesgos físicos ni morales para su persona, y su muestra será tratada de forma completamente anónima y confidencial. No existen beneficios para el donante, sino que el beneficio directo de este estudio es para la comunidad local, por el aporte al conocimiento de la variación genética de su población.

Su participación en esta investigación es absolutamente voluntaria, y Ud. puede abandonar el estudio en cualquier momento si así lo desea. Si Ud. acepta participar, tenga a bien completar y firmar el Consentimiento adjunto. La persona responsable de tomar la muestra, le informará sobre el proyecto y le aclarará todas sus dudas respondiendo claramente sus preguntas.

Teléfono de contacto: 0221-4210112

Correo electrónico de contacto: ccatanesi@imbice.gov.ar

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO “VARIACIÓN GENÉTICA DEL COLOR DEL IRIS EN LA POBLACIÓN BONAERENSE”

Yo,..... (nombres y apellidos completos), de.....años (edad), en calidad de donante de muestra biológica, declaro haber leído la Carta de Información “Variación genética del color del iris en la población bonaerense” y podido hacer preguntas sobre la investigación a (responsable de la toma de muestra).

Declaro haber entendido la carta y que mi participación es voluntaria, gratuita, anónima y confidencial. Comprendo que puedo retirarme de la investigación cuando quiera sin tener que dar explicaciones, y que puedo contar con los datos obtenidos si lo requiero.

Por ello, presto libre conformidad para que se tome una muestra de saliva de mi persona, para estudiar rasgos genéticos con fines poblacionales.

Entiendo que mi participación está limitada a los estudios especificados en la Cartilla de Información previa, y no otros, caso del que deberé ser informado y podré consentir o no. Con tal salvedad (marque lo que corresponda)

SI	NO
----	----

autorizo que al término del estudio se almacene mi muestra de ADN.

Lugar y fecha:

Firma y aclaración del donante:

Firma y aclaración del responsable de la toma de muestra:

Firma y aclaración del investigador responsable del proyecto:

Firma y aclaración de un testigo: